

Rozprawa Doktorska

mgr inż. Przemysław Podstawski

Analiza zmian profilu ekspresji genów komórek skóry pod wpływem obecności wybranych białek wirusa BPV w aspekcie występowania sarkoidów u koni

Praca wykonana pod kierunkiem dr hab. inż. Katarzyny Ropka-Molik, prof. IZ

Wstęp

Sarkoid należy do najczęściej występujących nowotworów skóry w rodzinie koniowatych. Mimo tego, że nie posiada on zdolności przerzutowania do innych organów może znacznie wpływać na dyskomfort i dobrostan zwierzęcia. Występowanie sarkoidu jest ściśle związane z obecnością wirusa brodawczaka krowiego (BPV) w tkance skórnej zwierzęcia. BPV należy do gatunkowo specyficznej rodziny papillomawirusów infekującej bydło, natomiast sarkoid jest jedynym udokumentowanym przypadkiem infekcji organizmu innego, jak organizm docelowego gospodarza. Genom papillomawirusów jest mocno konserwatywny w tej rodzinie, a w jego budowie można wyróżnić geny późne odpowiedzialne za budowę białek kapsydu oraz geny wczesne kodujące białka funkcjonalne wirusa. Do tej pory nie opracowano jednej skutecznej metody leczenia sarkoidu, a te istniejące cechują się zróżnicowaną skutecznością i mogą być uzależnione od miejsca występowania guza. Ponadto leczenie może wymagać dodatkowych procedur takich jak znieczulenie zwierzęcia. Stąd istotne jest dalsze prowadzenie badań nad genezą powstawania sarkoidów, co może się przyczynić do opracowania nowych metod leczenia. Jednym z wyzwań w badaniu sarkoidu jest poznanie molekularnego podłoża powstawania tego nowotworu. W tym celu posługiwano się różnymi modelami umożliwiającymi wgląd w procesy zmian, jakie zachodzą w modyfikowanej tkance lub komórkach. Niniejsza praca skupiała się na opracowaniu nowego modelu transfekowanych linii fibroblastów skóry końskiej konstruktem zawierającym sekwencję kodującą wybranych białek BPV. W kolejnych etapach badań, uzyskany model komórkowy, wykorzystano do poznania procesów molekularnych na poziomie zmian profilu ekspresji genów, zachodzących w skutek aktywności genów BPV, które może stanowić cenne źródło informacji o rozwoju sarkoidu.

Hipotezy i Cele badawcze

Na podstawie dostępnej literatury skomponowano następujące **hipotezy badawcze**:

1. Obecność pojedynczych białek BPV istotnie wpływa na profil ekspresji genów w komórkach fibroblastów skóry końskiej.
2. Linie transfekowanych fibroblastów skóry końskiej mogą stanowić cenny model badań rozwoju sarkoidu końskiego.

Na podstawie postawionych hipotez, opracowano następujące **cele badawcze**:

1. Określenie wpływu białek BPV na zmiany w transkryptomie fibroblastów skóry końskiej.
2. Określenie wpływu białek BPV na zmiany profilu ekspresji wybranych genów powiązanych z procesami przebudowy ECM.
3. Utworzenie nowego modelu *in vitro* umożliwiającego badanie procesu transformacji komórek skóry, w komórki o cechach sarkoidu na poziomie molekularnym.

Material i metody

1. Przygotowanie materiału do badań:
 - Biopsje tkanki skóry wykonano pośmiertnie z okolicy oczu.
 - Pozyskane tkanki poddano testowi na obecność DNA wirusa BPV. Próbkę z wynikiem pozytywnym usuwano z dalszych procedur.
 - W doświadczeniu wykorzystano tkanki sarkoidów końskich, znajdujących się w kolekcji Instytutu Zootechniki PIB w Balicach.
 - Dodatkowo jako etap wstępny do dalszych badań, wykorzystano dane z mikromacierzy cDNA porównujących różnice poziomu ekspresji genów zachodzące pomiędzy tkanką zdrowej skóry końskiej i tkanką sarkoidu.
 - Z pobranych tkanek wyprowadzono stabilne linie fibroblastów skóry końskiej.
2. Na podstawie danych w bazie PaVE zaprojektowano sekwencje kodujące analizowane białka: BPV1-E4, BPV1-E7 oraz białko fuzyjne BPV1-E1^{E4}.
3. Zaprojektowane sekwencje wprowadzono do właściwych plazmidów ekspresyjnych
4. Otrzymane plazmidy sklonowano w koloniach bakterii kompetentnych.
5. Plazmidy zawierające sekwencje kodujące poszczególne białka wprowadzono do fibroblastów końskich metodą nukleofekcji.
6. Z otrzymanych linii komórek transfekowanych wyizolowano RNA
7. Otrzymane RNA wykorzystano do sekwencjonowania metodą NGS oraz do analizy ekspresji genów metodą real-time PCR.

Wyniki

1. W przypadku sekwencji kodującej białko BPV1-E4 wykryto 1640 genów o istotnej różnicy w poziomie ekspresji (DEG), natomiast w przypadku sekwencji kodującej gen BPV1-E1^{E4} takich genów wykryto 3328.
2. Wykazano 910 DEGów wspólnych dla obu wariantów oraz 730 unikalnych genów dla sekwencji BPV-E4 i 2318 dla sekwencji BPV1-E1^{E4}.
3. Analiza szlaków metabolicznych metodą ontologii genów (GO), wykazała, że obecność sekwencji kodującej białko BPV1-E4 powoduje deregulację takich szlaków jak: ujemna regulacja proliferacji komórek, pozytywna regulacja migracji komórek, adhezja i migracja komórek, adhezja komórek do macierzy, organizacja cytoszkieletu aktynowego. Natomiast w przypadku sekwencji kodującej białko BPV1-E1^{E4} wytypowano następujące szlaki: adhezja ogniskowa, negatywna regulacja zewnątrzkomórkowej sygnalizacji apoptotycznej, sygnalizacja receptora transformującego czynnika wzrostu β , organizacja włókienek kolagenowych.

4. Analiza szlaków metabolicznych KEGG wykazała szlaki deregulowane w przypadku wprowadzenia obu wariantów sekwencji. Były to: kontrola cyklu komórkowego, regulacja cytoszkieletu aktynowego oraz adhezja komórek. Unikalnym szlakiem zaobserwowanym dla sekwencji kodującej białko BPV1-E4 były szlaki w nowotworach, natomiast w przypadku transfekcji konstruktami *BPV1-E1^ΔE4* unikalne były modyfikacje ekspresji genów powiązanych ze szlakami sygnałowymi, w których pośredniczą FoxO-, Rap1- i TNF oraz szlakiem proteoglikanów w komórkach nowotworowych.
5. Analiza wyników mikromacierzy (model *in vivo*) wykazała trzy istotnie deregulowane metaloproteinazy (*MMP2*, *MMP7* i *MMP23B*). W przypadku danych RNA-Seq (model *in vitro*), takich genów wykryto sześć (*MMP1*, -9, -12, -17, -19 i -27).
6. Analiza qPCR potwierdziła modyfikację aktywności transkrypcyjnej dla genów *MMP* zidentyfikowanych zarówno w modelu *in vitro*, jak i *in vivo*.
7. Badania umożliwiły identyfikację istotnych różnic w poziomach ekspresji genów *MMP2* i *MMP9* oraz *MMP17*, których transkrypcja okazała się być podwyższona w obu badanych modelach.
8. W przypadku modelu *in vitro* zidentyfikowano 30 DEGów należących do szlaku przebudowy macierzy ECM i 27 należących do szlaku adhezji komórkowej. W przypadku modelu *in vivo* takich genów było odpowiednio 29 i 44.
9. Siedem DEGów zaangażowanych w szlak adhezji komórek uznano za istotne, niezależnie od analizowanego modelu, podobnie sześć DEGów należących do szlaku przebudowy macierzy ECM.
10. Wybrano 9 genów kandydujących (*CADMI*, *CD99*, *CNTNAP1*, *FN1*, *JAM3*, *MPZL1*, *SDC1*, *SDC2*, *VCAMI*) do analizy qPCR, która potwierdziła ich deregulację w badanych układzie.
11. Analiza Gene Ontology (GO) badanych genów wykazujących zróżnicowaną ekspresję wskazała ich udział w szlakach: połączeniu przylegania komórek (ang. anchoring junction), kompleksie integryn i kompleksie białkowym w adhezji komórkowej, połączeniu przywęzłowym (ang. paranodal junction), połączeniu komórka-komórka i wiązaniu integryn.

Stwierdzenia i wnioski

1. Zastosowanie linii komórkowych transfekowanych konstruktami kodującymi pojedyncze białka wirusowe może stanowić nowy i efektywny model do badań molekularnego podłoża powstawania sarkoidu końskiego.
2. Zastosowanie modelu transfekowanych linii komórkowych umożliwia analizę różnic efektów aktywności różnych wariantów składania białek i wnioskowanie o funkcjach genów kodujących poszczególne fragmenty białek fuzyjnych.
3. Obecność w komórce konstruktów kodujących białko BPV1-E4 oraz BPV1-E1^ΔE4 wpływa na deregulację wielu szlaków komórkowych powiązanych z procesami proliferacji i mobilności komórki. Może to świadczyć o istotnej roli genu *E4* w procesach regulacji metastazy sarkoidu.

4. Poszczególne białka wirusowe pełnią odmienne funkcje w komórkach gospodarza o czym świadczą unikalne szlaki sygnałowe zidentyfikowane oddzielnie dla BPV1-E4 oraz BPV1-E1^{E4}.
5. Porównanie proponowanego modelu *in vitro* z modelem *in vivo* wykorzystującym materiał genetyczny pobrany bezpośrednio z tkanek, wskazuje na częściowe pokrycie profili ekspresyjnych pozyskanych tymi metodami. Może to wynikać z wykorzystania konstruktów kodujących tylko jedno białko wirusowe, przez co nie ma efektu interakcji występujących pomiędzy wszystkimi białkami biorącymi udział w procesie powstawania sarkoidu.
6. Analiza modelu *in vitro* wykazała, że obecność konstruktów kodujących białko fuzyjne BPV1-E1^{E4} powoduje zmianę ekspresji 16 genów kodujących metaloproteiny, przy wykryciu deregulacji 21 tych genów w modelu *in vivo*. Świadczy to może o znaczącym wpływie obecności tego białka na gospodarkę metaloproteinaz w komórce.
7. Porównanie ilości zidentyfikowanych genów poddanych różnicowej ekspresji między modelami *in vitro* i *in vivo* pozwala wnioskować, że gen *BPV1-E4* może pełnić istotną rolę regulacji procesów migracji komórki gospodarza.
8. Zastosowanie proponowanego modelu *in vitro* może cechować się wysoką śmiertelnością transfekowanych komórek (jak w przypadku sekwencji kodującej białko BPV1-E7), najprawdopodobniej ze względu na wysoką toksyczność zastosowanego konstruktów.