

Zapalenie gruczołu sutkowego krów powoduje zmiany w składzie chemicznym mleka i przyczynia się do powstania strat ekonomicznych, zarówno w chowie krów mlecznych jak i w przemyśle mleczarskim. Obecność bakterii w mleku, zwłaszcza bakterii chorobotwórczych, produkujących termostabilne toksyny, które nie są niszczone w procesie pasteryzacji, stanowi zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Straty spowodowane stanami zapalnymi wymion krów mlecznych sięgają miliardów dolarów i euro w USA i w Europie w skali roku. Wymion nie jest jednak bezbronne w stosunku do czynników chorobotwórczych. Ochrona gruczołu sutkowego przed patogenami jest możliwa dzięki mechanizmom odporności immunologicznej, które nadzorowane są przez różne populacje komórek i mediatory przez nie wydzielane. Charakterystyka profilu genów układu immunologicznego w tkankach gruczołu sutkowego krów, pochodzących od zwierząt zdrowych jak i charakteryzujących się obecnością w mleku różnych rodzajów bakterii, może pomóc w wyjaśnieniu mechanizmów immunologicznych i szczegółowo wskazać jakie, tkankowo specyficzne, procesy fizjologiczne i szlaki biochemiczne biorą udział w odpowiedzi na różne rodzaje zakażenia. Zmiany epigenetyczne, w tym metylacja DNA i profil ekspresji niekodującego RNA (w tym mikroRNA) mają kluczowe znaczenie w mechanizmach regulacji ekspresji genów.

Termin epigenetyka odnosi się do nauki o cechach, których ekspresja nie zależy od sekwencji DNA. Zmiany te są odziedziczone, ale odwracalne. Metylacja DNA to przyłączenie grup metylowych (-CH₃) głównie do cytozyny przy udziale specyficznych enzymów. Przyłączenie grup metylowych następuje do cytozyn występujących w tzw. wyspach CpG (dinukleotydach) leżących w promotorach genów. Rejony promotorowe mają istotne znaczenie regulatorowe dla ekspresji danego genu. Przyłączenie grup metylowych wpływa na obniżenie ekspresji danego genu. Z kolei mikroRNA to krótkie (ok. 20 nukleotydów), jednoniciowe, niekodujące cząsteczki RNA, ale regulujące (regulacja negatywna) ekspresję innych genów.

Pierwsze odkrycia dotyczące metylacji genów związane były ze starzeniem się organizmów – im starsze zwierzę/człowiek tym niższy poziom metylacji. Ponadto, nieprawidłowy wzór metylacji prowadzi do szybszego starzenia się organizmu. W tkance ma swój charakterystyczny wzór metylacyjny, więc zjawisko to wykorzystywane jest m.in. do diagnozy chorób (w tym nowotworów) i do oceny wieku biologicznego, szczególnie ludzi (zegar biologiczny).

W badaniach prowadzonych na koniach i bydło mlecznym udokumentowano znaczenie mikroflory bakteryjnej w rozwoju nabytej odporności u koni do trzeciego miesiąca życia poprzez mechanizm epigenetyczny. Wykazano, że obecność patogenów w środowisku wychowawczym jest jednym z czynników powodujących spadek metylacji promotora genu kodującego interferon gamma, skorelowanego ze wzrostem jego ekspresji. Wykazano również, że poziom metylacji genu alfaS1-kazeiny rośnie wraz z upływem laktacji oraz dinukleotydy CpG ulegają metylacji podczas zapalenia spowodowanego przez *E. coli*. Ponadto, poziom metylacji tego genu jest podobny u jałówek w trakcie dojrzewania, u krów nielaktujących oraz u krów ze stwierdzonym stanem zapalnym wymienia (ang. mastitis). Jest to zgodne z powszechną wiedzą, że zawartość białek kazeinowych w mleku pochodziącym z wiarstek objętych (pod)klinikcznym stanem zapalnym drastycznie spada na korzyść białek serwatkowych, a tym samym spada przydatność technologiczna takiego mleka powodując straty ekonomiczne w przetwórstwie.

Jak dotychczas niewiele jest informacji dotyczących wpływu zakażeń bakteryjnych na wzorec metylacji DNA. Dlatego celem projektu jest określenie wpływu zakażenia tkanki wydzielniczej wymienia krów mlecznych gronkowcami koagulazo-ujemnymi i koagulazo-dodatnimi na metylację wybranych genów i wzór ekspresji mikroRNA.

Założeniem projektu jest, że zakażenia bakteryjne wywołują zmiany w poziomie ekspresji genów związanych z odpowiedzią immunologiczną na zakażenie poprzez specyficzne metylacje ich regulatorowych rejonów. Ponadto, że zakażenia bakteryjne wpływają na profil ekspresji niekodującego RNA, który wpływa na metylację DNA i reguluje ekspresję genów. Dzięki temu możliwe będzie określenie wpływu zakażenia gronkowcami koagulazo-ujemnymi i koagulazo-dodatnimi na regulacje epigenetyczne genów związanych z odpowiedzią immunologiczną na zakażenie, z procesami starzenia się organizmu i genów produkcyjnych.

Projekt będzie realizowany w ramach czterech, ściśle uzupełniających się, analiz:

- 1) Charakterystyka poziomu metylacji: Poprzez tzw. pirosekwencjonowanie zostanie przeprowadzona analiza metylacji. Zostanie oceniony stopień metylacji znanych wysp CpG w promotorach wybranych genów.
- 2) Charakterystyka miRNA wybranych genów: Ze względu na to, że poziom mRNA oraz poziom metylacji DNA jest ściśle związany z aktywnością specyficznego niekodującego RNA, zostanie przeprowadzona analiza profilu mikroRNA.
- 3) określenie stężenia produktów białkowych wybranych genów za pomocą testów ELISA.
- 4) oszacowanie związku między profilem miRNA i poziomem metylacji wybranych genów a poziomem ich ekspresji na poziomie białka i mRNA z użyciem metod statystycznych.