

Konie są zwierzętami ważnymi w produkcji zwierzęcej, rekreacji, hipoterapii oraz jako zwierzęta pracujące w krajach słabo rozwiniętych. Sarkoid jest istotnym problemem w dermatologii i hodowli koni. Jest to miejscowo złośliwy nowotwór skóry, który może stanowić aż 67% wszystkich zdiagnozowanych nowotworów. Sarkoidy są wysoce lokalnie inwazyjne i charakteryzują się tendencją do agresywnego rozrostu. Ponadto zazwyczaj nie są podatne na leczenie i mają silną tendencję do nawrotów. Sarkoidy mogą znacząco zagrażać dobrostanowi koniowatych i utrudniać ich użytkowanie, natomiast nieudane, przedłużające się leczenie może prowadzić do eutanazji zwierzęcia, powodując straty ekonomiczne. Ogólnie przyjmuje się, że przyczyną rozwoju tego typu zmian jest zakażenie wirusem brodawczaka bydła (Bovine Papillomavirus; BPV), jednak nadal nie jest jasne, dlaczego infekcja BPV u koniowatych prowadzi do powstania nowotworu i jakie dokładnie mechanizmy za tym stoją.

Wśród sekwencji, które mogą być zaangażowane w takie mechanizmy znajdują się mikroRNA (miRNA). Są to krótkie sekwencje RNA, które mają zdolność do regulowania ilości innych sekwencji w komórkach. MikroRNA wpływają na bardzo wiele kluczowych procesów biologicznych, co czyni je ważnymi regulatorami komórkowymi. Ustalono również, że miRNA odgrywają znaczącą rolę w onkogenezie, pełniąc rolę dwojakie tj. przyczyniając się do jej postępu lub zahamowania. Dlatego też są one obiektem licznych badań oraz wykazują się dużym potencjałem jako biomarkery przydatne do diagnostyki różnych typów nowotworów oraz prognozowania przebiegu choroby. Ostatnio w ludzkich nowotworach wykryto również nieprawidłowe poziomy innego typu małych RNA, a mianowicie piRNA. Po raz pierwszy wykryto je w komórkach rozrodczych i uznano za specyficzne dla tych właśnie tkanek. Jednak coraz większa liczba doniesień wskazuje na ich rolę w tkankach somatycznych. Dotychczas wykazano, że biorą udział w szeregu istotnych z punktu widzenia funkcjonowania komórek procesów biologicznych związanych, podobnie jak w przypadku miRNA, z regulacją ilości innych sekwencji. Jednakże dokładna rola poszczególnych piRNA i ich mechanizmy działania są nadal badane.

W naszych poprzednich badaniach wykazaliśmy nieprawidłowe poziomy miRNA w próbkach tkanki sarkoidowej. Analiza bioinformatyczna wykazała, że są one zaangażowane w istotne dla nowotworzenia sarkoidów końskich procesy komórkowe związane m.in. z infekcją wirusową i inwazją komórek. Ponadto po raz pierwszy wykryliśmy obecność sekwencji piRNA w sarkoidzie końskim. Jednak dokładne funkcje zidentyfikowanych miRNA i piRNA oraz ich zaangażowanie w transformację nowotworową sarkoidów końskich i interakcje wirus-gospodarz nie zostały scharakteryzowane. W związku z tym w niniejszym projekcie postawiliśmy hipotezę, że zidentyfikowane w naszych poprzednich badaniach mikroRNA i piRNA mają wpływ na funkcjonowanie komórek sarkoidu poprzez modulację procesów zaangażowanych w infekcję wirusową i inwazję komórkową, co odbywa się poprzez mechanizmy wyciszania genów, w tym regulację metylacji DNA.

Celem proponowanych badań będzie scharakteryzowanie ról i mechanizmów działania wybranych mikroRNA i piRNA w onkogenezie sarkoidów. Aby go zrealizować zastosujemy kompleksowe podejście analityczne, składające się z następujących kroków. W pierwszym etapie, wyprowadzimy pierwotne hodowle komórek sarkoidów stransfekowane *in vitro* z wykorzystaniem badanych małych RNA. Następnie, przeprowadzimy globalną analizę profilu genów, miRNA i metylacji DNA tych komórek z wykorzystaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania następnej generacji, które ujawni sekwencje regulowane przez badane małe RNA. Dzięki zastosowaniu takiego wielopoziomowego globalnego podejścia oraz integracji uzyskanych danych możliwe będzie wskazanie najbardziej znaczących sekwencji kandydujących, o dużym potencjale regulacyjnym. Uzyskane wyniki zostaną zweryfikowane z zastosowaniem dodatkowych metod m.in. na poziomie ekspresji białek, aby ocenić czy wykryte zmiany genetyczne mają bezpośredni wpływ na funkcjonowanie komórek sarkoidu. Dodatkowo, dzięki zastosowaniu technologii wektorów reporterowych z genem lucyferazy, możliwe będzie scharakteryzowanie natury zidentyfikowanych wzajemnych relacji między badanymi małymi RNA a wykrytymi regulowanymi sekwencjami, a tym samym mechanizmu ich wyciszania.

Proponowany projekt przyczyni się do lepszego zrozumienia mechanizmów molekularnych związanych z funkcjonowaniem małych RNA, leżących u podstaw karcynogenezy sarkoidów końskich. Jest to szczególnie istotne z uwagi na fakt, iż badania dotyczące funkcji piRNA w nowotworach, zwłaszcza zwierzęcych, są aktualnie w powijakach. Ponadto, uzyskane wyniki przybliżą nas do określenia wpływ wirusa BPV na organizm gospodarza na poziomie molekularnym oraz poznania strategii przez niego stosowanych w przebiegu infekcji, prowadzących do powstawania guzów sarkoidowych. Uzyskane rezultaty wypełnią lukę w wiedzy na temat tego typu nowotworu i dadzą podstawy do opracowania skuteczniejszej diagnozy, prognozowania i leczenia tego schorzenia w przyszłości.