

# STRESZCZENIE

---

Badania ostatnich lat doprowadziły do znacznego poszerzenia istniejącej wiedzy na temat epigenetycznej regulacji ekspresji genów, w tym kluczowego znaczenia przestrzennej organizacji interfazowej chromatyny. Intensywny rozwój tej dziedziny dostarczył informacji na temat interakcji materiału genetycznego z elementami strukturalnymi jądra komórkowego jak jąderko, laminy czy pory jądrowe. Dodatkowo wykazano znaczenie otoczenia sekwencji DNA w trójwymiarowej przestrzeni jądra.

W niniejszej pracy przeprowadzono badania obejmujące: (1) porównanie profilów ekspresji mioblastów oraz miotub przy zastosowaniu mikromacierzy ekspresyjnych, (2) ocenę zmian morfologii jąder komórkowych zachodzących na skutek różnicowania, (3) ocenę zmian lokalizacji obszarów centromerowych wybranych chromosomów oraz wyselekcjonowanych genów podczas procesu różnicowania, (4) ocenę istniejących zależności zmian poziomu ekspresji genów podczas różnicowania mioblastów ze zmianami położenia poszczególnych fragmentów chromatyny. W ramach badań wykorzystano analizę profilów ekspresji mikromacierzami GeneChip Human Gene ST 1.0. Ponadto lokalizację oceniano techniką trójwymiarowej fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (3D FISH), a także immunoFISH. W początkowym etapie badań korzystano także z technik cytometrii przepływowej. Ważnym elementem pracy była analiza informatyczna otrzymanych danych.

Wykazano statystycznie istotną różnicę w kształcie i objętości jąder komórkowych w zróżnicowanych miotubach. Obserwowane jądra były mniejsze i bardziej spłaszczone ( $p < 0,001$ ) od jąder mioblastów. Jednocześnie w globalnej analizie ekspresji wykazano, że mniejsza liczba genów ( $n = 117$ ) była aktywowana podczas tego procesu w stosunku do liczby genów o obniżonej ekspresji ( $n = 132$ ) w komórkach zróżnicowanych.

Spośród analizowanych chromosomów, centromery chromosomów 1, 2 i 17 wykazywały znamiennej statystycznie zmianę rozkładu. W przypadku chromosomu 1, jego obecność w komórkach zróżnicowanych była zaznaczona najmocniej pośrodku odległości między centrum jądra, a peryferium. Rozkłady odległości chromosomów 2 i 17 zaznaczały się silniej w kierunku peryferium. Pozostawało to w zgodzie z wynikami analizy profilów ekspresji genów według której we wszystkich przypadkach większa liczba genów na danym chromosomie ulegała wyciszeniu, w stosunku do genów ulegających aktywacji. Ponadto, wszystkie chromosomy o istotnej zmianie położenia

centromerów należały jednocześnie do grupy o największej zmienności globalnej ekspresji.

Zwiększony poziom ekspresji w komórkach zróżnicowanych wykazywały geny *MYH2*, *ACTN2* oraz *VCAM1* ( $p < 0,001$ ). Produkty genów *MYH2* i *ACTN2* są podstawowymi białkami aparatu kurczliwego, podczas gdy *VCAM1* jest receptorem błonowym biorącym udział w fuzji i utrzymaniu miotub. Obniżoną ekspresję natomiast wykazywały geny *MYF5* i *DPP4* ( $p < 0,001$ ). *MYF5* uczestniczy we wczesnych fazach miogenezy zanikając na późniejszych etapach, *DPP4* natomiast jest białkiem błonowym biorącym udział w regulacji ekspresji insuliny. Mimo znacznej zmiany ekspresji genów *MYOG* i *MYF6* nie zaobserwowano w ich przypadku istotności statystycznej, choć oba geny pełnią istotną funkcję w miogenezie. Podobny poziom ekspresji przed i po różnicowaniu wykazywały geny *NCAM1* – białko powierzchniowe występujące m.in. w błonie komórek mięśniowych, *HPRT1* – należący do genów metabolizmu podstawowego, o jednorodnej ekspresji w większości tkanek, a także *ACTN3*. Produkt *ACTN3* występuje jedynie we włóknach mięśniowych szybkich i jest nieobecny u niektórych osobników.

W większości przypadków zaobserwowano także zaistnienie tzw. klastrów ekspresji. W przypadku niektórych klastrów (dla genów: *MYH2*, *ACTN3*, *HPRT1*, *NCAM1*) obserwowano aktywność transkrypcyjną otoczenia adekwatną do zmian aktywności badanego genu, ulegając bądź silnej aktywacji razem z obserwowanym genem (*MYH2*), czy też nie wykazując znaczących różnic ekspresji żadnego transkryptu w danym klastrze (*ACTN3*, *HPRT1*, *NCAM1*)

Stwierdzono istnienie zależności pomiędzy zmianami ekspresji genów *VCAM1*, *MYH2* oraz *DPP4*, a zmianami ich fizycznej lokalizacji w trakcie różnicowania. Sekwencje aktywowane w czasie różnicowania komórkowego lokalizowały się w połowie odległości pomiędzy centrum, a peryferium jądra komórkowego miotub. Z kolei badania genów o obniżonej ekspresji w miotubach (np. *DPP4*), wykazały lokalizację w bliskiej odległości od lamin jądrowych (co potwierdzono również poprzez badania kolokalizacji z laminami A i C) oraz regionów heterochromatynowych centromerów, choć nie zawsze efekty te były zuniformizowane (jednorodne).

Podsumowując, zastosowanie wielkoskalowej analizy ekspresji umożliwiło ocenę zmian ogólnej aktywności transkrypcyjnej, jednocześnie pozwalając na wyselekcjonowanie genów o wysokiej zmienności ekspresji podczas procesu różnicowania. Obserwowane zmiany lokalizacji wybranych sekwencji wykazywały wzajemną spójność, sugerując istnienie określonych mechanizmów przestrzennej regulacji ekspresji w skali całego jądra.

---