

STRESZCZENIE

Chłoniaki skórne T-komórkowe (ang. cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)) to duża, heterogenna grupa nowotworów złośliwych charakteryzująca się nieprawidłowym nagromadzeniem złośliwych komórek T w skórze. Spośród wielu podtypów CTCL, dwoma najczęstszymi wariantami klinicznymi są Zespół Sézary'ego (ang. Sézary Syndrome (SS)) i ziarniniak grzybiasty (ang. mycosis fungoides (MF)). Pomimo wielu badań, które wykazały dużą różnorodność aberracji chromosomalnych i mutacji genowych, przyczyna SS pozostaje niezidentyfikowana. W CTCL odnotowano wiele zmian genetycznych i rozregulowanie szlaków sygnałowych, jednak dokładny mechanizm molekularny patogenezy jest nadal nieznan. Z powodu braku dostępnego markera diagnostycznego i różnorodnego obrazu klinicznego choroby, rozpoznanie CTCL jest trudne, co skutkuje średnio 6-letnim czasem diagnozy. Co więcej, do tej pory nie wynaleziono skutecznej terapii przeciwko CTCL, a leczenie koncentruje się głównie na łagodzeniu objawów i opóźnianiu postępów choroby. W związku z tym istnieje potrzeba dalszych intensywnych badań nie tylko w celu zrozumienia biologii tego chłoniaka, ale także znalezienia potencjalnego markera diagnostycznego, czy wprowadzenia nowych strategii terapeutycznych. Na podstawie własnych badań wykazano ektopową ekspresję genu kodującego białko transbłonowe 244 (ang. *transmembrane protein gene 244*, (*TMEM244*)) u wszystkich pacjentów z SS, liniach komórkowych pochodzących z SS oraz w mniejszym stopniu, w MF i w części chłoniaków z komórek T, ale nie w nowotworach z komórek B oraz komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cells (PBMC)) zdrowych osób. W związku z tym, celem niniejszej rozprawy doktorskiej było scharakteryzowanie mechanizmów związanych z ekspresją i funkcją genu *TMEM244* w biologii CTCL w celu lepszego zrozumienia tej choroby.

Pierwszym zagadnieniem podjętym w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej była identyfikacja mechanizmu odpowiedzialnego za aktywację genu *TMEM244*. Dane literaturowe wskazują, że deregulacja epigenetyczna odgrywa ważną rolę w rozwoju i progresji SS, w związku z tym, że komórki SS charakteryzują się licznymi zmianami w metylacji DNA. Przedstawione wyniki wykazały ujemną korelację między ekspresją genu *TMEM244*, a metylacją DNA jego regionu promotorowego w próbkach pozyskanych od pacjentów oraz w liniach komórkowych z limfocytów T. Ponadto za pomocą systemu edycji epigenomu CRISPR-dCas9 wykazano, że demetylacja wybranych wysp CpG w regionie promotorowym *TMEM244* aktywuje jego ekspresję w badanych liniach komórkowych, co sugeruje, że metylacja jest mechanizmem odpowiedzialnym za regulację jego ekspresji.

Biorąc pod uwagę indukcję ekspresji genu *TMEM244* u pacjentów z CTCL oraz fakt, że rola genu *TMEM244* nie została jak dotąd zbadana, celem drugiej części badań było zidentyfikowanie funkcji i potencjału kodujący genu *TMEM244*. Za pomocą testu kompetycji wzrostu komórek z białkiem zielonej fluorescencji (ang. green fluorescent protein (GFP)) wykazano, że ekspresja genu *TMEM244* jest niezbędna do wzrostu komórek w liniach z tej grupy chłoniaków, co pokazuje zasadność uznania go za nowy potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu CTCL. Ponadto, stosując qRT-PCR poprzedzony frakcjonowaniem RNA, a także fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (ang. fluorescent *in situ* hybridization (FISH)), potwierdzono cytoplazmatyczną lokalizację transkryptu genu *TMEM244*. Pomimo, że transkrypt genu *TMEM244* zlokalizowany jest w cytoplazmie, przy pomocy metody Western Blot wykazano, że nie koduje on białka, ale jest raczej długim niekodującym RNA (ang. long non-coding RNA (lncRNA)), którego dokładna funkcja wciąż pozostaje do ustalenia.

W trzeciej części prowadzonych badań postanowiono sprawdzić ekspresję *TMEM244* w subpopulacjach krwi zdrowych osób oraz ustalić, czy ekspresja tego genu może służyć jako łatwe narzędzie diagnostyczne dla SS. Za pomocą cytometrii przepływowej i qRT-PCR w prawidłowych komórkach PBMC zaobserwowano wyższą ekspresję *TMEM244* zarówno w podgrupach CD4+, jak i CD8+ komórek pamięci (CD4RO+), co jest zgodne z immunofenotypem komórek Sezary'ego. Dodatkowo, jak wykazano stosując qRT-PCR, ekspresja *TMEM244* zarówno w limfocytach T CD4+, jak i w całej populacji PBMC pacjentów z SS, może być wykorzystana do odróżnienia SS od chorób o podobnym obrazie klinicznym, jak MF i erytrodermii nienowotworowej, a w rezultacie znacząco poprawić diagnostykę tej jednostki chorobowej.

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały, że metylacja DNA jest odpowiedzialna za regulację ekspresji genu *TMEM244*. Co więcej, udowodniono, że ekspresja genu *TMEM244* ma wpływ na wzrost komórek CTCL, a gen ten pomimo swojej adnotacji nie koduje białka, lecz jest prawdopodobnie długim niekodującym RNA. Badania eksperymentalne pozwoliły wykazać, że analiza ekspresji genu *TMEM244* może być wykorzystana jako łatwy i tani marker diagnostyczny z krwi służący do odróżnienia SS od chorób o podobnym obrazie klinicznym. Dodatkowo na podstawie dostępnej literatury usystematyzowano aktualny stan wiedzy na temat heterogenności komórek nowotworowych w tej grupie chłoniaków.