



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Imię i nazwisko autora rozprawy: Justyna Podolak-Popinigis

Dyscyplina naukowa: Biotechnologia

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Epigenetyczne i transkryptomyczne podstawy potencjału regeneracyjnego ssaków. Badania na modelach skóry płodowej i dorosłej myszy MRL/MpJ.

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Epigenetic and transcriptomic basis of mammalian regeneration potential. The studies on the models of foetal skin and the adult MRL/MpJ mouse.

Promotor

Podpis

Dr hab. inż. Paweł Sachadyn

Gdańsk, rok 2015

*Pragnę podziękować wszystkim
bez których niniejsza praca nie mogłaby powstać.*

*Serdeczne podziękowania składam mojemu Promotorowi,
Panu dr hab. inż. Pawłowi Sachadynowi,
za okazaną pomoc w realizacji pracy,
cenne uwagi merytoryczne,
życzliwość oraz naukową inspirację.*

*Dziękuję również Panu Prof. dr hab. Józefowi Kur
oraz Pracownikom, Koleżankom i Kolegom
z Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii
za stworzenie przyjemnej atmosfery pracy oraz za wspólnie spędzony czas.*

Rodzicom dziękuję za okazane wsparcie.

*Szczególne podziękowania składam mojemu mężowi -Arkowi
za cierpliwość, wyrozumiałość,
oraz wiarę we mnie.*

Spis treści

1. Streszczenie	6
Abstract	8
2. Wstęp	10
2.1. Proces regeneracji - organizmy modelowe	10
2.2. Mysz MRL/MpJ	11
2.3. Mysz AIRmax oraz mysz naga jako inne przykłady szczepów myszy o podwyższonych zdolnościach regeneracyjnych.....	18
2.4. Bezbliznowe gojenie ran skóry w trakcie rozwoju embrionalnego	19
2.4.1. Czynniki regulujące zdolność do bezbliznowego gojenia ran skóry płodowej.....	20
2.5. Epigenetyczna regulacja ekspresji genów - metylacja DNA	25
2.6. Wpływ regulacji epigenetycznej na rozwój organizmu i proces regeneracji.....	28
2.7. Badanie globalnego poziomu metylacji i ekspresji genów	30
3. Cel pracy	33
4. Materiały i metody	34
4.1. Materiały	34
4.1.1. Tkanki.....	34
4.1.2. Odczynniki stosowane do izolacji DNA genomowego.....	35
4.1.3. Odczynniki stosowane do izolacji RNA.....	35
4.1.4. Odczynniki stosowane do odwrotnej transkrypcji	35
4.1.5. Odczynniki stosowane do oczyszczania ds cDNA.....	36
4.1.6. Odczynniki stosowane do trawienia DNA genomowego enzymami wrażliwymi na metylację (<i>HpaII</i>).....	36
4.1.7. Odczynniki stosowane do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.....	36
4.1.8. Odczynniki stosowane do reakcji PCR	39
4.1.9. Konwersja wodorosiarczynowa.....	39
4.1.10. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym	40
4.1.11. Markery wielkości DNA	40
4.1.12. Pozostałe bufony i roztwory	40
4.2. Metody	41
4.2.1. Izolacja genomowego DNA	41
4.2.2. Izolacja RNA.....	41
4.2.3. Wyznaczanie stężenia DNA, RNA i ds cDNA	41
4.2.4. Odwrotna transkrypcja	42

4.2.5. Oczyszczanie ds cDNA	43
4.2.6. Trawienie DNA genomowego enzymami wrażliwymi na metylację.....	43
4.2.7. Ilościowa analiza PCR w czasie rzeczywistym.....	44
4.2.8. Amplifikacja fragmentu DNA przy zastosowaniu reakcji PCR.....	46
4.2.9. Konwersja wodorosiarczynowa DNA.....	47
4.2.10. Rozdział elektroforetyczny DNA i RNA w żelu agarozowym	47
4.2.11. Izolacja DNA z prążka żelu agarozowego	47
4.2.12. Mikromacierz metylacyjna.....	48
4.2.13. Mikromacierz ekspresyjna	48
4.2.14. Sekwencjonowanie drugiej generacji (NGS)	49
4.2.15. Stężenie retinolu w pełnej krwi myszy.....	49
4.2.16. Sekwencjonowanie DNA	50
4.2.17. Programy komputerowe i bazy danych	50

5. Wyniki..... 52

5.1. Globalne profile ekspresji genów myszy MRL/MpJ oraz szczepów kontrolnych myszy C57BL/6J oraz BALB/c	52
5.1.1. Analiza wyników otrzymanych przy zastosowaniu mikromacierzy ekspresyjnej.....	52
5.1.2. Liczba genów wykazujących różnice w poziomie ekspresji.....	56
5.1.3. Analiza ontologiczna w programie DAVID dla wyników uzyskanych przy zastosowaniu mikromacierzy ekspresyjnej	59
5.1.4. Sekwencjonowanie drugiej generacji	67
5.1.5. Pomiar stężenia kwasu retinowego we krwi myszy MRL/MpJ oraz C57BL/6J ..	69
5.1.6. Porównanie profili ekspresji genów w sercach dorosłych myszy MRL/MpJ oraz sercach embrionalnych i noworodkowych myszy C57BL/6J	70
5.1.7. Analiza poziomu ekspresji wybranych genów metodą PCR w czasie rzeczywistym	73
5.2. Badanie profili metylacji wybranych genów myszy MRL/MpJ	75
5.3. Zmiany w poziomie metylacji i ekspresji genów zachodzące w trakcie rozwoju embrionalnego myszy szczepu C57BL/6J	83
5.3.1. Określenie płci płodów.....	83
5.3.2. Analiza zmian w poziomie metylacji genomowego DNA w trakcie rozwoju embrionalnego w skórze grzbietowej myszy	85
5.3.3. Analiza zmian w poziomie globalnej ekspresji genów w trakcie rozwoju embrionalnego w skórze grzbietowej myszy	88
5.3.4. Korelacje pomiędzy poziomem metylacji i ekspresji genów	89
5.3.5. Odpowiedź na zranienie i odpowiedź zapalna	94

5.3.6. Analiza poziomu metylacji i ekspresji wybranych genów metodą PCR w czasie rzeczywistym	97
6. Omówienie wyników i dyskusja.....	101
6.1. Model myszy MRL/MpJ	101
6.2. Wpływ regulacji epigenetycznej na bezbliznowe gojenie ran skóry płodowej myszy	106
7. Podsumowanie.....	111
8. Dorobek naukowy	113
9. Spis symboli i skrótów	116
10. Literatura.....	117

1. Streszczenie

Regeneracja jest to zdolność do odbudowy uszkodzonych lub utraconych tkanek, kończyn oraz narządów. Efektywne procesy regeneracji obserwowane są u prymitywnych kręgowców, u których mogą przejawiać się w tak spektakularnych zjawiskach jak odtworzenie całych kończyn po ich amputacji. U wyższych kręgowców zdolności regeneracyjne są znacznie bardziej ograniczone. Rozwój metod umożliwiających badanie globalnych profili ekspresji i metylacji genów pozwala na nowe spojrzenie na problem regeneracji u ssaków.

W niniejszej pracy skupiono się na charakterystyce molekularnych podstaw potencjału regeneracyjnego ssaków w oparciu o dwa modele charakteryzujące się podwyższoną odpowiedzią regeneracyjną: mysz MRL/MpJ oraz skóra piętnastodniowych embrionów (E15) myszy C57BL/6J. Myszy MRL/MpJ i skóra płodowa są ważnymi modelami badawczymi w dziedzinie regeneracji. Myszy MRL/MpJ wzbudza zainteresowanie z uwagi na podwyższoną odpowiedź regeneracyjną obserwowaną w różnych tkankach u dorosłego ssaka, natomiast skóra płodowa ze względu na zdolność do idealnego bezbliznowego gojenia ran występującą do początku trzeciego trymestru ciąży. Myszy MRL/MpJ, to szczep wsobny, który posiada szereg charakterystycznych nietypowych cech genetycznych podczas gdy bezbliznowe gojenie ran skóry płodu obserwuje się u różnych ssaków.

Porównanie genomowych profili transkrypcji pięciu badanych tkanek u myszy MRL/MpJ oraz dwóch kontrolnych szczepów myszy - C57BL/6J i BALB/c wykazało występowanie znacznych różnic w poziomie ekspresji wielu genów. Pośród genów o obniżonym, w stosunku do dwóch szczepów kontrolnych, poziomie ekspresji u myszy MRL/MpJ, nadreprezentację wykazywały transkrypty związane z odpowiedzią immunologiczną. Wśród transkryptów wykazujących podwyższony poziom ekspresji charakterystyczna była nadreprezentacja genów uczestniczących w szlaku metabolizmu retinolu lub wiązania retinoidów obserwowana we wszystkich analizowanych tkankach. Pośród transkryptów o podwyższonym poziomie ekspresji w sercu myszy MRL/MpJ nadreprezentację wykazywały także geny związane ze szlakiem PPAR (ang. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*). Ponadto, profile ekspresji genów w sercu dorosłej myszy MRL/MpJ przejawiają pewne podobieństwo do serc noworodkowych i embrionalnych.

Analiza zmian w globalnych profilach metylacji i ekspresji w skórze grzbietowej płodów piętnastodniowych (E15) w porównaniu do osiemnastodniowych i dziewiętnastodniowych płodów oraz dorosłych myszy, czyli przed i po utracie zdolności do bezbliznowego gojenia ran, umożliwiła identyfikację grupy genów, które zmieniają status metylacji i ekspresji po dniu E15. W tej grupie nadreprezentowane były geny związane z odpowiedzią immunologiczną oraz morfogenezą embrionalną, jak np. geny homeotyczne. Geny o podwyższonym poziomie metylacji i obniżonym poziomie ekspresji w embrionalnym dniu 15 były związane z odpowiedzią immunologiczną, zaś geny wykazujące obniżony poziom metylacji i podwyższoną ekspresję były zaangażowane w rozwój organizmu i funkcjonowanie synaps. Powyższe rezultaty wskazują, że zmiany w profilach metylacji DNA zachodzące po embrionalnym dniu 15 mogą przyczyniać się do utraty podwyższonych zdolności regeneracyjnych skóry grzbietowej płodów.

Cechą wspólną myszy MRL/MpJ oraz skóry grzbietowej płodów w dniu embrionalnym 15 była podwyższona ekspresja genów homeotycznych oraz obniżona odpowiedź układu immunologicznego. Wskazuje to na kluczową rolę tych dwóch czynników w odpowiedzi regeneracyjnej.

Podsumowując, wyniki moich prac badawczych poszerzają dotychczasową wiedzę o molekularnych podstawach regeneracji ssaków. Efektem tych badań jest uzyskanie po raz pierwszy w świecie globalnych profili metylacji genów w skórze grzbietowej myszy na różnych etapach rozwoju oraz unikalna porównawcza analiza transkryptomyczna wykonana dla pięciu różnych tkanek myszy MRL/MpJ i dwóch szczepów kontrolnych. W szczególności, rezultaty powyższych badań dostarczają dowodów na epigenetyczne uwarunkowania zdolności do bezbliznowego gojenia ran skóry płodowej oraz wskazują szlak metabolizmu retinolu jako potencjalny cel do farmakologicznej stymulacji regeneracji u dorosłych ssaków.

Abstract

Regeneration is the ability to self-repair damaged or lost tissues, limbs and organs. Efficient regeneration processes are observed in primitive vertebrates where they could be manifested with such spectacular phenomena as the restoration of whole limbs following amputation. In higher vertebrates, regeneration abilities are rather limited. The development of methods for global gene expression and methylation profiling allows new insights into regeneration in mammals.

This work was focused on the characteristics of the molecular mechanism of mammalian regeneration potential based on two models displaying increased regenerative response, the MRL/MpJ mouse and the skin of murine foetus at embryonic day 15 (E15) of the C57BL/6J strain. The MRL/MpJ mouse and the foetal skin are considered as important models of regeneration, the first one as an adult mammal displaying enhanced healing in different tissues, the latter one, owing to perfect scar-free healing of skin wounds observed in the foetus till the beginning of the third trimester of pregnancy. While the MRL/MpJ mouse is an inbred strain exhibiting a number of distinctive metabolic and genetic traits, scar-free foetal skin wound healing is observed in different mammals.

The results obtained from global gene expression profiling in five different tissues of the MRL/MpJ mouse and two control, non-regenerative murine strains, C57BL/6J and BALB/c, revealed multiple genes which show different expression levels between the strains. Among the transcripts which were down-regulated in the MRL/MpJ mouse, there were overrepresented genes involved in immune response. The up-regulated transcripts in the MRL/MpJ mouse, were greatly enriched with genes associated with retinol metabolism or retinoid binding pathways in all examined tissues. Moreover, among the transcripts up-regulated in the heart of the MRL/MpJ mouse, there were also those involved in PPAR signalling pathway (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*). Furthermore, there were remarkable similarities between the expression patterns in the neonatal and embryonic hearts and in those of adult MRL/MpJ mouse.

The analysis of transcriptomes and DNA methylomes in the dorsal skin of 15-day-old embryos compared to those of 18-19-day-old ones and those of adults, which is to say, before and after the decline of scarless healing, revealed a number of genes displaying changes in their methylation and expression profiles following

embryonic day 15. Among the differentially methylated and expressed genes, there were those responsible for immune response and embryonic morphogenesis, including the Hox genes. While the genes showing increased methylation and reduced expression at embryonic day 15 were related to immune response, those displaying elevated expression and decreased methylation were associated with developmental processes and synapse functions. The observations indicate that the changes in DNA methylation profiles, after embryonic day 15 may contribute to the loss of ability to heal dorsal skin wounds without scarring.

The common features of the MRL/MpJ mouse strain and the dorsal skin of foetuses at embryonic day 15 were the elevated expression of Hox genes and decreased immune system response. This implicates the crucial role of immune response and embryonic morphogenesis genes in regenerative response.

In conclusion, my studies should add to the knowledge on the molecular basis of regenerative potential in mammals. The results of my works include the first global gene methylation profiling in mouse dorsal skin in the course of development as well as a unique comparative transcriptomic analysis in five different tissues in the MRL/MpJ mouse and two reference strains. In particular, my results reveal the epigenetic basis of regenerative skin wound healing in the foetus as well as they indicate retinol metabolism pathway as a possible target for pharmacological stimulation of regeneration in adult mammals.

2. Wstęp

2.1. Proces regeneracji - organizmy modelowe

Wśród organizmów wyższych wyróżnia się dwa procesy będące odpowiedzią na zranienia tkanek, narządów oraz kończyn: regenerację oraz gojenie ran. Proces regeneracji jest to zdolność do odtworzenia utraconych struktur tkankowych z ich pełną funkcjonalnością oraz architekturą. Natomiast w procesie gojenia ran obserwuje się powstawanie włóknistej tkanki łącznej oraz odkładanie się kolagenu w niezorganizowanej formie, co skutkuje powstaniem blizny [1]. Zdolność do bezbliznowego gojenia ran jest najczęściej obserwowana u organizmów niższych takich jak płazy ogoniaste, ryby kostnoszkieletowe czy robaki płaskie (ang. *planarian flatworm*).

Jednymi z najlepiej zbadanych organizmów wykazujących podwyższone zdolności regeneracyjne są płazy ogoniaste (ang. *Urodele amphibians*), takie jak traszki czy aksolotl meksykański. Płazy ogoniaste wykazują zdolność do odbudowy uszkodzonych tkanek i narządów na każdym etapie swojego życia. W trakcie procesu regeneracji kończyn u tych organizmów wyróżnia się kilka kluczowych etapów. Jednym z nich jest podwyższona aktywność metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *Matrix Metalloproteinases*, MMPs) w miejscu zranienia, które poprzez usuwanie komórek mezodermy umożliwiają powstawanie populacji komórek niezróżnicowanych, w tym multipotentnych komórek mezenchymalnych. Proliferyjujące komórki mezenchymalne tworzą blastemę, czyli masę odróżnicowanych komórek, z których rozwinię się nowa kończyna [2]. Traszki mogą także przetrwać wycięcie dużej części ich serca oraz zregenerować brakujący fragment tego narządu w ciągu 2-3 miesięcy od resekcji [3]. Zdecydowanie bardziej ograniczone zdolności regeneracyjne mają płazy bezogoniaste, takie jak żaba *Xenopus laevis*, która wykazuje zdolność do odtworzenia utraconej tkanki tylko na pewnym etapie rozwoju. Żaba na etapie kijanki, przed metamorfozą, wykazuje zdolność do pełnej regeneracji, podobnie jak płazy ogoniaste. Natomiast w stadium dojrzałym, żaba po amputacji kończyny, wytwarza kikut zamiast w pełni funkcjonalnego narządu ruchu [4, 5]. Innym przykładem organizmu modelowego, bardzo dobrze zbadanego i wykazującego podwyższoną zdolność do regeneracji jest ryba Danio pręgowany (łac. *Danio rerio*). Po amputacji płetwy ogonowej ryba ta, podobnie jak inne ryby kostnoszkieletowe,

a w odróżnieniu od chrzęstnoszkieletowych, potrafi odtworzyć wszystkie rodzaje tkanek budujących płetwę. Wydaje się, że komórki macierzyste zachowują zdolność do odtworzenia oryginalnej morfologii płetwy ogonowej [6].

Również w przypadku jednodniowych noworodków myszy wykazano zdolność do podwyższonej regeneracji serca po jego uszkodzeniu. Zdolności tej nie obserwuje się już w siódmym dniu życia myszy [7].

W tym rozdziale wymieniono tylko niektóre modele regeneracji znane z literatury naukowej. Poniżej zaprezentowane zostaną dwa modele badań regeneracyjnych, które są przedmiotem niniejszej pracy, czyli dorosła mysz MRL/MpJ oraz ssacze modele embrionalne, ze szczególnym uwzględnieniem modelu skóry płodowej.

2.2. Mysz MRL/MpJ

Szczep myszy MRL/MpJ został wyprowadzony w wyniku krzyżowania czterech wsobnych szczepów myszy C57BL/6J (0,3%), C3H/HeDi (12,1%), AKR/J (12,6%) i LG/J (75%) (<http://jaxmice.jax.org/strain/000486.html>). Mysz MRL/MpJ wykorzystywana jest często jako model badania nad rumieniowatym toczniem układowym, gdyż wraz z wiekiem wykazuje ona skłonność do chorób układu immunologicznego [1, 8]. W latach 90-tych ubiegłego wieku w laboratorium prof. E. Heber-Katz wykazano, że mysz MRL/MpJ posiada zdolność do bezbliznowego gojenia otworów o średnicy 2 mm wyciętych w małżowinie usznej. Już około 30 dni od zranienia następuje doskonale odtworzenie architektury tkanek, w tym skóry, mięśni, nerwów obwodowych oraz naczyń krwionośnych. W zregenerowanym obszarze pojawiają się też mieszki włosowe i gruczoły łojowe, choć nie ustalono czy rozwijają się od początku, czy ich obecność jest efektem przemieszczenia z sąsiadujących obszarów nieuszkodzonych. W miejscu zranienia obserwowano także powstawanie struktury podobnej do blastemy, która umożliwia procesy regeneracji m.in. u kijanki żaby *Xenopus laevis* czy też salamander i traszek [1, 9].

Późniejsze badania pokazały, że jeden z przodków myszy MRL/MpJ, mysz LG/J wykazuje podobną zdolność do zamykania otworów w małżowinie usznej [10], co wskazuje, że zdolności regeneracyjne myszy MRL/MpJ są odziedziczone po myszy LG/J, ale pochodzenie tej ostatniej jest nieznane.

Regeneracja otworów wyciętych w małżowinie usznej myszy MRL/MpJ

Powszechnym, chociaż w ostatnich latach coraz rzadziej stosowanym, sposobem trwałego znakowania myszy laboratoryjnych jest wycinanie otworów w małżowinie usznej o średnicy 2 mm, które z reguły nie zarastają do końca życia myszy. Technika ta umożliwia pewne i trwałe znakowanie zwierząt. W trakcie badań nad szczepem myszy MRL/MpJ okazało się, że otwory wycięte w uszach tej myszy ulegają pełnemu, bezbliznowemu zamknięciu w ciągu około czterech tygodni od zranienia, przy czym następuje wytworzenie normalnej architektury tkanki. W przeciwieństwie do myszy MRL/MpJ lub MRL/lpr (wariant szczepu, u którego szybciej niż u myszy MRL/MpJ występują symptomy chorób autoimmunologicznych), u myszy kontrolnej C57BL/6J otwory wycięte w małżowinie usznej nie zarastają do końca życia, aczkolwiek w ciągu miesiąca po uszkodzeniu ich średnica zmniejsza się około dwukrotnie [1].

Pierwszego dnia po wycięciu otworów w małżowinie usznej u obu szczepów myszy można zaobserwować zamykanie brzegów zranienia oraz pojawienie się odczynu zapalnego [11]. Różnice histologiczne w trakcie gojenia ran pomiędzy obydwoma szczepami myszy są widoczne już drugiego dnia po zranieniu. Różnice obserwowane w tym procesie dotycząc odmiennej szybkości odtwarzania nabłonka, pojawienia się pierścieniowego obrzęku, angiogenezy, proliferacji tkanki łącznej i chondrogenezy [1].

Badania wykazały, że formowanie się struktury podobnej do blastemy u myszy MRL/MpJ umożliwia jej bezbliznową regenerację w miejscu zranienia, podobnie jak w procesie regeneracji u płazów ogoniastych [1]. Odbudowa nerwów obwodowych jest kluczowa w tym procesie, gdyż stymuluje formowanie się blastemy i umożliwia dalszą regenerację. Wykazano, iż u myszy MRL/MpJ, w porównaniu do myszy C57BL/6J, w przypadku uszkodzeń małżowiny usznej, w 14 dniu po zranieniu, kiedy powstaje struktura podobna do blastemy, obserwowana jest podwyższona regeneracja nerwów obwodowych w małżowinie usznej [9]. Jest zatem możliwe, że większa liczebność regenerujących się nerwów obecnych w uszkodzonym uchu myszy MRL/MpJ, w porównaniu z myszą kontrolną, aktywuje regenerację tkanek przez uwolnienie większej ilości czynników mitogennych oraz umożliwia angiogenezę [9].

Pomimo całkowitej regeneracji obserwowanej w małżowinie usznej myszy MRL/MpJ, badany szczep nie posiada jednak zdolności do bezbliznowego gojenia ran utworzonych w wyniku nacięcia (5 mm) bądź wycięcia kawałka skóry (2 mm²)

z grzbietu zwierzęcia. Po 14 dniach od daty uszkodzenia następuje całkowite zamknięcie rany utworzonej na skórze grzbietowej z wytworzeniem wyczuwalnej i zauważalnej blizny u myszy MRL/MpJ [12].

Uszkodzenia mięśnia sercowego myszy MRL/MpJ

Mysz MRL/MpJ wykazuje także, według niektórych badań, podwyższoną zdolność do regeneracji mięśnia sercowego, która przejawia się niemal bezbliznowym gojeniem w ciągu około 60 dni od kriou uszkodzenia oraz mniejszym obszarem blizny po wczesnych zawałach serca [13-16].

W trakcie pierwszego tygodnia po zranieniu, w tkance serca myszy MRL/MpJ można zaobserwować występowanie kardiomiocytów w miejscu zranienia wraz z pojawiającymi się miejscowo komórkami fibroblastów. Do 15 dnia po zranieniu u myszy MRL/MpJ tworzy się nowa tkanka łączna zawierająca bogatą sieć naczyń krwionośnych oraz odtwarza się normalna struktura mięśnia sercowego. U szczepu kontrolnego C57BL/6J, w tym samym czasie, obserwowano jedynie niewielkie odtworzenie mięśnia sercowego w miejscu zranienia. Do 60 dnia po zranieniu, serce myszy MRL/MpJ wykazuje całkowite zamknięcie rany z niewielką blizną lub bez blizny, w przeciwieństwie do szczepu myszy C57BL/6J, gdzie serce po uszkodzeniu zawierało rozległe blizny [13]. Inne badania potwierdziły podwyższoną zdolność do regeneracji serca myszy MRL/MpJ [14-16]. Funkcjonalną regenerację potwierdziły badania echokardiograficzne.

W innych niezależnych badaniach nie zaobserwowano zdolności do regeneracji serca myszy MRL/MpJ zarówno po kriou uszkodzeniach sondą jak również po zawałach serca [17-21].

Regeneracja w innych tkankach myszy MRL/MpJ

Według innych badań mysz MRL/MpJ wykazuje także podwyższoną odpowiedź regeneracyjną po hemisekcji rdzenia kręgowego [22], szybszy wzrost koniuszków palca po amputacji [23, 24], zwiększoną regenerację siatkówki oka oraz nabłonka barwnikowego siatkówki oka [25, 26], przyspieszone gojenie rogówki oka po oparzeniach środkami zasadowymi [27] oraz odbudowę chrząstki stawowej [28, 29] i ścięgien po uszkodzeniach [30].

Reasumując, podwyższone zdolności regeneracyjne u myszy MRL/MpJ są manifestowane przez regeneracyjne zarastanie otworów w małżowinie usznej, co zbadano w kilku laboratoriach, w wielu niezależnych eksperymentach [1, 9, 11, 31]. Szereg innych badań pokazuje, że te podwyższone zdolności do regeneracji można zaobserwować w innych tkankach, natomiast nie w skórze grzbietowej, ale w odniesieniu do poszczególnych tkanek, wyniki są opublikowane tylko w jednym lub dwóch artykułach. Kwestia regeneracji serca u myszy MRL/MpJ w świetle sprzecznych danych literaturowych wymaga wyjaśnienia.

Molekularne podstawy odpowiedzi regeneracyjnej myszy MRL/MpJ

Dotychczasowe badania wykazały, że ważnym aspektem bezbliznowego gojenia ran u myszy MRL/MpJ jest jej zdolność do niszczenia błony podstawnej (ang. *basement membrane*), która tworzy się podczas oraz po procesie pokrywania miejsca zranienia przez nablonek. U myszy C57BL/6J błona podstawna jest cały czas obecna w trakcie gojenia rany. Zanik błony podstawnej u myszy MRL/MpJ jest analogiczny jak w przypadku odpowiedzi regeneracyjnej obserwowanej u płazów, gdzie błona podstawna w ogóle nie powstaje lub zanika bardzo szybko [16]. Okazuje się, że aktywowanie powstawania błony podstawnej w amputowanych kończynach u płazów powoduje zahamowanie odpowiedzi regeneracyjnej i formowanie blizny w miejscu amputacji [16].

Za niszczenie błony podstawnej odpowiedzialne są metaloproteinazy macierzy (ang. *Matrix Metalloproteinases*, MMPs), należące do systemu proteaz odgrywających ważną rolę w degradacji macierzy pozakomórkowej. Głównymi proteazami odpowiedzialnymi za procesy gojenia ran oraz regenerację są metaloproteinazy MMP-2 oraz MMP-9. Wykazano, że u myszy MRL/MpJ jest więcej aktywnych form MMPs niż u szczepu kontrolnego myszy C57BL/6J [16, 32]. Niszczenie błony podstawnej w obrębie miejsca zranienia u myszy MRL/MpJ umożliwia tworzenie się struktury podobnej do blastemy, która daje początek odtworzonym tkankom [16].

Mechanizm regeneracji myszy MRL/MpJ próbowano również wyjaśnić poprzez mapowanie QTL (ang. *Quantitative Trait locus*, *locus* cechy ilościowej) w celu znalezienia genów odpowiedzialnych za gojenie ran i regenerację tkanek. W badaniach QTL krzyżowano szczep myszy MRL/MpJ ze szczepami o niższej zdolności regeneracyjnej takimi jak C57BL/6, CAST/Ei oraz SJL/J [31, 33-35]. Dzięki temu

zidentyfikowano kilkanaście QTL prawdopodobnie odpowiedzialnych za proces regeneracji [31, 33-35]. Udowodniono, że zdolność do bezbliznowego gojenia ran myszy MRL/MpJ jest cechą wielogenową, jednak jednoznacznie nie udało się określić genotypu regeneracyjnego.

Dorośla mysz MRL/MpJ wykazuje ponadto wiele cech biochemicznych i metabolicznych, charakterystycznych dla etapu embrionalnego. Wśród tych cech można wyróżnić tzw. tlenowy metabolizm glikolityczny (charakterystyczny dla płodów i guzów nowotworowych), podwyższone utlenianie glutaminianu, zredukowaną wydajność utleniania kwasów tłuszczowych. Tkanki MRL/MpJ, włączając serce, wątrobę oraz regenerujące „obrzeża” ran w małżowinie usznej, wykazują spadek transmembranowego potencjału mitochondrialnego, spadek poziomu aktywnych związków tlenu (ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*), obniżoną fosforylację oksydacyjną oraz wzrost ilości DNA mitochondrialnego [36]. Ponadto w sercu dorosłej myszy MRL/MpJ znajdują się komórki, w których podwyższonej ekspresji ulegają geny uznawane za markery pluripotencji takie jak *Nanog*, *Islet-1* czy *Sox2*. Wymienione markery są produkowane na stosunkowo niskim poziomie w komórkach nieuszkodzonego serca myszy MRL/MpJ (ale wyższym niż u myszy kontrolnej), natomiast po uszkodzeniu narządu ich ekspresja gwałtownie wzrasta [36].

Również badania przeprowadzone w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej wykazały, że u myszy MRL/MpJ wiele regionów promotorowych genów odpowiadających za rozwój embrionalny wykazuje obniżony poziom metylacji w porównaniu do kontrolnego szczepu myszy [37] (Tab.1).

Tab. 1. Analiza ontologiczna genów o obniżonym poziomie metylacji u myszy MRL/MpJ w porównaniu do szczepu kontrolnego myszy C57BL/6J.

Analiza przedstawia grupy genów należące do kategorii nadreprezentowanych wśród genów wykazujących obniżony status metylacji. Istotność statystyczną wyników oszacowano za pomocą dokładnego testu Fishera przy wartości $p < 0,05$. Wyniki istotne statystycznie po korekcie Benjaminiego zaznaczono pogrubioną czcionką [37].

Grupy genów wykazujące nadreprezentację wśród genów o obniżonym poziomie metylacji u myszy MRL/MpJ	Liczba genów o obniżonym poziomie metylacji u myszy MRL/MpJ		
	<i>Serce</i>	<i>Wątroba</i>	<i>Śledziona</i>
Homeobox	-	39	20
GO:0048562~embryonic organ morphogenesis	6	23	9
developmental protein	-	79	27
GO:0001501~skeletal system development	-	-	12
GO:0001568~blood vessel development	8	30	-
GO:0001654~eye development	6	-	-
GO:0001655~urogenital system development	6	-	-
GO:0001944~vasculature development	8	30	-
GO:0002088~lens development in camera-type eye	3	-	-
GO:0007423~sensory organ development	12	-	11
GO:0007507~heart development	-	24	-
GO:0009792~embryonic development ending in birth or egg hatching	-	39	15
GO:0014031~mesenchymal cell development		12	5
GO:0021510~spinal cord development	-	9	5
GO:0021517~ventral spinal cord development	-	-	4
GO:0030879~mammary gland development	4	-	-
GO:0030900~forebrain development	-	20	-
GO:0030902~hindbrain development	-	-	6
GO:0031175~neuron projection development	-	-	10
GO:0035270~endocrine system development	-	12	-
GO:0035295~tube development	-	32	-
GO:0043009~chordate embryonic development	-	39	14
GO:0043010~camera-type eye development	6	-	-
GO:0043583~ear development	6	-	-
GO:0048568~embryonic organ development	-	35	11
GO:0048598~embryonic morphogenesis	-	45	14
GO:0048666~neuron development	-	-	13
GO:0048706~embryonic skeletal system development	-	-	6
GO:0048732~gland development	6	22	-
GO:0048839~inner ear development	5	-	-
GO:0060429~epithelium development	-	-	11
GO:0060485~mesenchyme development	-	12	5

Ponadto nietypową cechą myszy MRL/MpJ jest obniżony poziom albo brak białka p21 w małżowinie usznej. Białko p21 jest inhibitorem cyklu komórkowego. W związku z tym, komórki podobne do fibroblastów (ang. *fibroblast-like cells*) myszy MRL/MpJ wykazują większe nagromadzenie w fazie cyklu komórkowego G2/M co powoduje podwyższoną odpowiedź komórkową na naprawę/uszkodzenia DNA w regenerującej się tkance. Podobną odpowiedź komórkową obserwuje się w embrionalnych komórkach macierzystych ssaków oraz u organizmów posiadających podwyższone zdolności regeneracyjne [38].

Analiza zmian w globalnym poziomie ekspresji genów u myszy MRL/MpJ w trakcie procesu regeneracji

Dotychczas opublikowano wyniki kilku badań transkryptomicznych, które miały na celu zbadanie zmian w globalnym poziomie ekspresji genów u myszy MRL/MpJ w trakcie procesu regeneracji w porównaniu do kontrolnych szczepów myszy.

Wykazano, iż w trakcie procesu bezbliznowego gojenia ran serca u myszy MRL/MpJ, w porównaniu do myszy C57BL/6J, podwyższonej ekspresji ulegały geny kodujące białka strukturalne serca, czynniki wzrostu oraz geny związane z procesami tworzenia naczyń krwionośnych oraz regulujące cykl komórkowy [15]. Inne badania wykazały, że geny związane z odpowiedzią immunologiczną oraz apoptozą ulegają obniżonej ekspresji w tkance uszkodzonego serca myszy MRL/MpJ, w porównaniu do szczepu kontrolnego, zaś podwyższonej ekspresji ulegają geny związane z procesem gojenia ran [14].

Różnice w poziomie ekspresji genów obserwowano także w trakcie naprawy amputowanego fragmentu palca u myszy MRL/MpJ w porównaniu do dwóch kontrolnych szczepów myszy - CBA oraz C57BL/6J. Wykazano, iż grupa 75 genów ulega odmiennej ekspresji u myszy MRL/MpJ, w porównaniu do dwóch kontrolnych szczepów. Pośród tych genów podwyższonej ekspresji ulegały między innymi geny odpowiedzialne za morfogenezę kończyn i naprawę centralnego układu nerwowego [23]. Badania Masinde i wsp. pozwoliły na zidentyfikowanie 36 różnie eksprymowanych genów w trakcie procesu gojenia ran wyciętych w małżowinie usznej u myszy MRL/MpJ w porównaniu do szczepu myszy C57BL/6J. Wśród genów o odmiennej ekspresji występowały transkrypty związane z procesem gojenia ran [39]. Inna analiza zmian w profilach ekspresji genów w trakcie gojenia ran utworzonych

w małżowinie usznej dowiodła, iż znacząca liczba genów o podwyższonej ekspresji u szczepu myszy kontrolnej C57BL/6J, w porównaniu do myszy MRL/MpJ, kodowała geny związane z odpowiedzią zapalną. Natomiast u myszy MRL/MpJ obserwowano podwyższony poziom ekspresji genów kodujących białka odpowiedzialne za naprawę uszkodzonej tkanki [40].

Powyższe badania wykazały, że u myszy MRL/MpJ w trakcie procesu gojenia ran podwyższonej ekspresji ulegają geny odpowiedzialne za proliferację i naprawę uszkodzonej tkanki, podczas gdy obniżoną ekspresję wykazywały transkrypty związane z odpowiedzią immunologiczną. Wiadomo, iż podwyższone zdolności regeneracyjne myszy MRL/MpJ są cechą wielogenową, jednak na podstawie dotychczasowych badań nie można jednoznacznie wskazać nadrzędnego czynnika odpowiedzialnego za te zdolności. Z wyników dotychczasowych badań transkryptomicznych nie można wyprowadzić charakterystycznego dla myszy MRL/MpJ profilu transkryptomicznego.

2.3. Mysz AIRmax oraz mysz naga jako inne przykłady szczepów myszy o podwyższonych zdolnościach regeneracyjnych

Oprócz myszy MRL/MpJ w badaniach nad procesami regeneracyjnymi wykorzystywane są także inne modele myszy. Linia myszy AIRmax (*maximum Acute Inflammatory Reactivity*), wykazująca maksymalną ostrą odpowiedź zapalną, została wyselekcjonowana przez krzyżowanie ośmiu szczepów myszy (A/J, DBA/2J, P/J, SWR/J, SJL/J, CBA/J, BALB/cJ oraz C57BL/6J). Wykazano, iż szczep myszy AIRmax posiada zdolność do szybkiego, bezbliznowego gojenia otworów wyciętych w małżowinie usznej, co przypomina proces obserwowany u myszy MRL/MpJ oraz LG/J. Globalna analiza poziomu ekspresji genów dowiodła, że kluczowa dla procesu regeneracji u myszy AIRmax jest wczesna aktywacja genów zaangażowanych w odpowiedź zapalną i zahamowanie ekspresji genów związanych z kontrakcją mięśni. Wykazano, iż szybka aktywacji odpowiedzi zapalnej, już po 48 h od momentu zranienia, sprzyja procesowi regeneracji w przypadku szczepu myszy AIRmax [41].

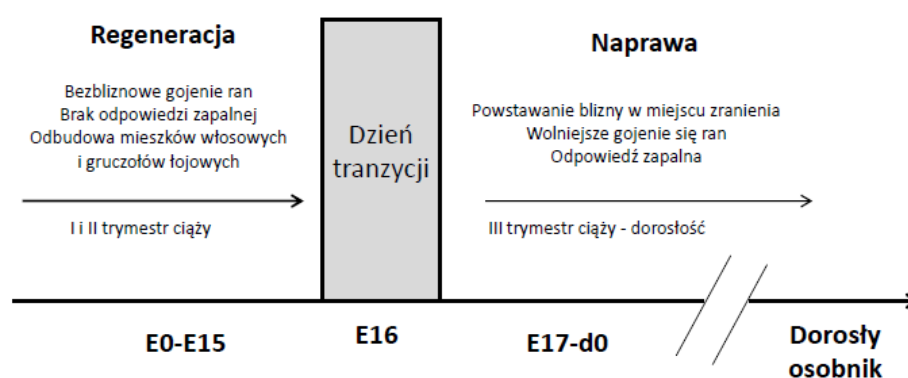
Również szczep myszy z deficytem genu *Foxn1* (myszy nagie, bez grasicy, wykazujące niedobór limfocytów T) jest zdolny do bezbliznowego gojenia ran skóry i otworów wyciętych w małżowinie usznej [42]. Wykazano, że wpływ na podwyższone zdolności regeneracyjne myszy nagich może mieć wyższa ekspresja genów kodujących metaloproteinazy macierzy MMP-9 i MMP-13 w miejscu zranienia skóry [43, 44].



Metaloproteiny uczestniczą w wielu biologicznych procesach takich jak morfogeneza, gojenie ran czy regeneracja. Uwalnianie metaloproteinaz w miejscu zranienia przez komórki fibroblastów wpływa najprawdopodobniej na przebudowę struktury kolagenu w trakcie późniejszej fazy gojenia ran i umożliwia zamknięcie rany bez powstania blizny u myszy nagich [44].

2.4. Bezbliźnowe gojenie ran skóry w trakcie rozwoju embrionalnego

W trakcie rozwoju embrionalnego skóra płodów, w zależności od wieku ciążowego, wykazuje różną odpowiedź na zranienia. W trakcie pierwszego i drugiego trymestru ciąży, płody posiadają zdolność do szybkiego gojenia ran skóry grzbietowej bez powstawania odpowiedzi zapalnej oraz blizny. Blisko początku trzeciego trymestru zdolności płodu do bezbliźnowego gojenia ran skóry są już tracone. W tym okresie rany goją się zdecydowanie wolniej, a w miejscu zranienia można zaobserwować nagromadzenie kolagenu, co skutkuje powstaniem blizny [45]. Wykazano, że u ludzi bezbliźnowe gojenie ran skóry grzbietowej płodów jest obserwowane do 22-24 tygodnia ciąży [45, 46]. W przypadku myszy ostatnim dniem, w którym obserwuje się zdolność do bezbliźnowego gojenia ran jest dzień embrionalny 16 (E16, zwany dalej dniem tranzycji, Rys. 1) [47] lub według innych źródeł embrionalny dzień 17 [48].



Rys. 1. Schemat przedstawiający okresy rozwoju embrionalnego myszy.

E0-E17 - dni embrionalne, d0 - dzień narodzenia (rysunek przygotowany na podstawie Wilgus, 2007 [45]).

2.4.1. Czynniki regulujące zdolność do bezbliznowego gojenia ran skóry płodowej

Składniki macierzy zewnątrzkomórkowej

Macierz zewnątrzkomórkowa (ECM, ang. *ExtraCellular Matrix*) pełni ważną rolę w trakcie gojenia ran, gdyż może regulować czynniki wzrostu oraz cytokiny [49]. Badania *in vitro* wykazały, że fibroblasty płodów produkują większą ilość całkowitego kolagenu, przy czym w komórkach jest wyższy stosunek kolagenu typu III i IV niż w fibroblastach skóry dorosłej. Dorosła skóra zawiera głównie kolagen typu I. Ocenia się, że większa ilość kolagenu typu III w skórze płodów, przed etapem tranzycji, przyczynia się w znacznym stopniu, do tego że po uszkodzeniu skóra regeneruje się bezbliznowo [50]. W przeciwieństwie do fibroblastów dorosłej skóry, fibroblasty płodów wykazują ponadto zdolność do szybszej migracji i do jednoczesnej syntezy kolagenu i proliferacji [50].

Ponadto dowiedziono, iż w ranach płodowych występuje podwyższony poziom glikozaminoglikanów takich jak siarczan chondroityny czy kwas hialuronowy (HA, ang. *hyaluronic acid*), które występują na powierzchni komórki lub w ECM [50]. Kwas hialuronowy występuje w wyższym stężeniu i dłużej utrzymuje się w ranach skóry płodu w porównaniu do dorosłych osobników [51]. Jest to najprawdopodobniej spowodowane obniżoną aktywnością hialuronidazy u płodów oraz podwyższoną ekspresją receptora kwasu hialuronowego (CD44), w porównaniu do dorosłych fibroblastów [52]. Badania *in vitro* wykazały, że podawanie HA przeciwdziała formowaniu się blizny w tkankach uszkodzonej kończyny myszy po etapie tranzycji (po dniu E16) [53].

Odpowiedź zapalna

Inną cechą charakterystyczną skóry płodów, przed początkiem trzeciego trymestru ciąży, jest zmniejszona odpowiedź zapalna na zranienia skóry. Dowiedziono, że płytki krwi płodów wykazują zmniejszoną agregację w odpowiedzi na kolagen, składnik macierzy zewnątrzkomórkowej, który stymuluje agregację płytek krwi w trakcie gojenia ran u dorosłych. Ponadto płytki krwi płodów uwalniają mniejszą ilość cytokin, które są odpowiedzialne za odpowiedź zapalną w miejscu uszkodzenia tkanki

[45]. Również w ranach gojącej się bezbliznowo skóry płodów, w porównaniu do skóry dorosłych ssaków, obserwuje się mniejszą ilość innych komórek układu immunologicznego, które są aktywowane w trakcie gojenia ran takich jak makrofagi, limfocyty T i B [54]. W skórze embrionów przed trzecim trymestrem ciąży na niższym poziomie ulegają ekspresji geny kodujące interleukinę 6 (IL-6) [55] oraz IL-8 [56], natomiast na wyższym poziomie jest produkowana IL-10 [57]. Inhibicja ekspresji genu *IL-10* w trakcie gojenia ran skóry płodowej [57] lub wprowadzenie rekombinantowej IL-6 skutkuje zahamowaniem procesu regeneracji oraz powstaniem blizny [55]. Także ilość transformujących czynników wzrostu (TGF- β) jest różna w ranach skóry płodu oraz u dorosłych osobników. W ranach skóry płodowej ilość TGF- β 3 jest większa, natomiast u dorosłych ssaków obserwuje się podwyższoną ekspresję *Tgf- β 1* i *Tgf- β 2* [58]. W wyniku niedokrwienia, w obszarze rany występują warunki hipoksji (niska zawartość tlenu), natomiast u płodów obserwuje się podwyższony poziom ekspresji czynnika *Hif1 α* (czynnik transkrypcji aktywowany w warunkach hipoksji), który oddziałując z TGF- β 3 może opóźnić odpowiedź układu immunologicznego [50]. Jednak trzeba dodać, że próby kliniczne zastosowania rekombinantowego czynnika TGF- β 3, znanego jako avotermin lub juvista, w celu stymulacji bezbliznowego gojenia ran skóry, nie były udane, gdyż nie uzyskano znaczącej statystycznie różnicy w ocenie jakości blizny w porównaniu z *placebo* w badaniach przeprowadzonych na 350 pacjentach (www.fiercebiotech.com/press-releases/juvista-eu-phase-3-trial-results).

Poziom ekspresji genów

Wykazano, że zdolność do bezbliznowego gojenia ran skóry płodów wynika również z odmiennego poziomu ekspresji genów należących do rodziny genów homeotycznych. Geny te odgrywają ważną rolę w trakcie różnicowania komórek na etapie wczesnego rozwoju embrionalnego [50]. Pośród 39 dobrze poznanych genów homeotycznych wykazano, że geny *HOXA4*, *HOXA5*, *HOXA7*, *HOXB13*, *PRX-2* ulegają odmiennej ekspresji w skórze płodów ludzkich przed początkiem trzeciego trymestru ciąży w porównaniu do skóry dorosłych osobników. Również geny *MSX-1*, *MSX-2*, *MOX-1*, nie należące do rodziny genów homeotycznych, wykazywały podwyższony poziom ekspresji w skórze płodów [59-61].

Ponadto, inny profil ekspresji wykazują geny, związane z proliferacją i wzrostem komórki, w uszkodzonej skórze płodu przed początkiem trzeciego trymestru

cięży oraz u jednodniowych myszy. W skórze płodu większość genów jest aktywowana zaraz po zranieniu, po czym ich poziom ekspresji stopniowo spada. W przypadku młodych myszy, po zranieniu skóry, nie obserwuje się nagłej aktywacji ekspresji genów. Dopiero po 24 h większość genów, o podwyższonym poziomie ekspresji w skórze płodowej, zostaje aktywowana w skórze noworodkowej. Opóźniona indukcja ekspresji genów w skórze dorosłych myszy może wiązać się z utratą zdolności do bezbliznowego gojenia ran [48].

Inne badania porównujące zmiany w globalnych profilach ekspresji genów w keratynocytach i fibroblastach nieuszkodzonej skóry embrionów z dnia 16 i 18 dowiodły, że 546 genów wykazywało co najmniej 2-krotne różnice w poziomie ekspresji pomiędzy tymi dniami. Analiza ontologiczna dla genów o różnym poziomie ekspresji wykazała, że podwyższonej ekspresji w dniu E18, w porównaniu do dnia E16, ulegały transkrypty związane ze szlakiem sygnalizacyjnym WNT oraz PDGF. Natomiast podwyższonej ekspresji w fibroblastach embrionów z dnia E16 ulegały geny związane z degradacją wolnych rodników [62].

Komórki tuczne

Komórki tuczne ulegają szybkiej degranulacji w wyniku uszkodzenia tkanki skóry, uwalniając wiele czynników pro-zapalnych. W trakcie gojenia ran, komórki tuczne migrują do miejsca uszkodzenia, zwiększając swoją ilość. Związki uwalniane przez komórki tuczne wpływają na odczyn zapalny w miejscu zranienia, produkcję kolagenu oraz angiogenezę. Ostatnie badania dowiodły, że ilość dojrzałych komórek tucznych w skórze płodowej myszy w dniu E15 jest zdecydowanie niższa niż u embrionów w dniu E18, u których rany goją się z powstaniem blizny. Ponadto wprowadzenie lizatu komórek tucznych do ran skóry płodów z dnia embrionalnego 15 skutkuje powstaniem blizny w miejscu uszkodzenia. Również w przypadku mutantów embrionów myszy w dniu E18, u których nie były produkowane komórki tuczne, obserwowano zmniejszenie obszaru blizny w miejscu uszkodzenia skóry. Powyższe wyniki wskazują na to, że komórki tuczne mogą odgrywać istotną rolę w odpowiedzi na zranienie prowadzącej do powstawania blizny po dniu E15 [63].

Wpływ środowiska życia embrionów na bezbliznowe gojenie ran skóry

Płody rozwijają się w środowisku o obniżonej zawartości tlenu, sterylnym, bogatym w płyny owodniowe i składniki odżywcze. W związku z tym sprawdzono wpływ środowiska życia embrionów na zdolność do bezbliznowego gojenia ran. Przeszczepiono fragment skóry z podbrzusza dorosłej owcy w 60 dniu ciąży do płodu jagnięcia (okres ciąży u owiec wynosi 145 dni) i po 40 dniach od przeszczepu wykonano nacięcie zarówno na skórze przeszczepionej jak i płodowej. Okazało się, że fragment przeszczepionej dorosłej skóry goił się wolniej, co skutkowało powstaniem blizny, podczas gdy uszkodzona skóra płodu goiła się bezbliznowo [64]. Środowisko życia embrionów nie ma więc decydującego wpływu na zdolność do bezbliznowego gojenia ran skóry płodu przed trzecim trymestrem ciąży [64]. Ponadto podwyższone zdolności regeneracyjne są obserwowane w liniach komórkowych wyprowadzonych ze skóry płodowej przed dniem tranzycji [65, 66]. W związku z powyższym, najprawdopodobniej na różnice w sposobie gojenia ran wpływają endogenne właściwości skóry płodowej .

Pomimo licznych badań (Tab. 2) nie udało się w pełni wyjaśnić molekularnych podstaw regeneracji skóry płodu przed początkiem trzeciego trymestru ciąży. Zmiany epigenetyczne są kluczowe w trakcie rozwoju embrionalnego i mogą mieć wpływ na różnice w poziomie ekspresji genów odpowiedzialnych za bezbliznowe gojenie ran.

Tab. 2. Porównanie czynników odpowiadających za bezbliznowe gojenie ran skóry płodów i dorosłych ssaków.

Cecha	Skóra embrionalna (przed 17 dniem embrionalnym)	Skóra dorosłych ssaków
<i>Gojenie ran</i>	bezbliznowe	powstaje blizna
Macierz zewnątrzkomórkowa (ECM)		
<i>Kwas hialuronowy [51]</i>	podwyższony	obniżony
<i>Receptor kwasu hialuronowego CD44 [52]</i>	podwyższony	obniżony
<i>Dekoryna [67]</i>	obniżona	podwyższona
<i>Fibromodulina [68]</i>	podwyższona	obniżona
<i>Stosunek MMP (metaloproteinaz macierzy) do TIMP (inhibitorów metaloproteinaz macierzy)[52]</i>	podwyższony	obniżony
<i>Tenascyna C [69, 70]</i>	wcześniejsze odkładanie	późniejsze odkładanie
Odpowiedź zapalna		
<i>Poziom komórek odpowiadających za odpowiedź zapalną [54, 63, 71]</i>	niski	wysoki
<i>Poziom cyklooksygenazy 2 (Cox2) i prostaglandyny 2 (PGE-2)[72]</i>	niski	wysoki
<i>Poziom ekspresji interleukiny 6 (IL6)[55] i interleukiny 8 (IL8)[56]</i>	obniżony	podwyższony
Poziom czynników wzrostu		
<i>PDGF [52]</i>	podwyższony (szybsze usuwanie z miejsca zranienia)	obniżony
<i>VEGF[73]</i>	obniżony (wg niektórych źródeł)	podwyższony
<i>FGF7/FGF10/FGF2 [52]</i>	obniżony/obniżony/ podwyższony	podwyższony/ podwyższony/obniżony
<i>Stosunek TGFβ3 do TGFβ1 i TGFβ2 [58]</i>	podwyższony	Obniżony
Pozostałe czynniki		
<i>Geny homeotyczne [59-61]</i>	odmienny poziom ekspresji wybranych genów	

2.5. Epigenetyczna regulacja ekspresji genów - metylacja DNA

Wśród zmian epigenetycznych można wyróżnić kondensację chromatyny i związane z tym zjawiskiem procesy metylacji i hydroksymetylacji DNA oraz kowalencyjne modyfikacje histonów takie jak metylacja, acetylacja, fosforylacja czy ubikwitynacja [74]. Również krótkie, niekodujące, jednoniciowe mikroRNA (miRNA) mogą być zaliczane do mechanizmów regulacji epigenetycznej wpływając na proces translacji lub stabilności mRNA [75]. Modyfikacje epigenetyczne generalnie wpływają na poziom ekspresji genów, nie powodując zmian w sekwencji DNA. Jedną z najczęściej badanych modyfikacji epigenetycznych jest metylacja DNA.

U kręgowców metylacja DNA z reguły zachodzi na węglu 5 reszty cytozyny występującej w dinukleotydach CpG, często określanymi mianem wysp CpG [76]. Wyspy CpG są definiowane jako regiony DNA genomowego, o długości minimum 500 pb i częstości występowania nukleotydów CpG powyżej 65% [77]. Wyspy CpG są głównie zlokalizowane w regionach promotorowych i egzonowych ssaczych genów [78].

Oprócz metylacji w obrębie dinukleotydów CpG, grupa metylowa może zostać także dodana do reszty cytozyny występującej w dinukleotydach CpA, CpT czy CpC. Ten rodzaj modyfikacji epigenetycznej określane jest mianem metylacji "non-CpG". Znaczący poziom metylacji "non-CpG" zidentyfikowano w embrionalnych komórkach macierzystych oraz w zróżnicowanych komórkach ludzkich mięśni szkieletowych czy mózgu. Metylacja cytozyny w dinukleotydach CpA, CpT i CpC najprawdopodobniej, tak jak w przypadku metylacji w obrębie sekwencji CpG, odpowiada za hamowanie procesu transkrypcji, poprzez zmniejszenie wiązania czynników transkrypcyjnych do sekwencji regionów promotorowych genów [79].

Heterochromatyna i euchromatyna

Epigenetyczne modyfikacje, wpływając na strukturę chromatyny, regulują poziom ekspresji genów. Regiony DNA genomowego, ze względu na regulację epigenetyczną ekspresji genów, są zorganizowane w dwa podstawowe typy chromatyny: euchromatynę i heterochromatynę. Termin euchromatyna odnosi się do rozluźnionej struktury chromatyny, zawierającej głównie geny aktywne transkrypcyjnie np. geny metabolizmu podstawowego. W regionach promotorowych genów aktywnych

transkrypcyjnie miejsca CpG są z reguły niemetylowane, zaś dochodzi do potrójnej metylacji reszty lizyny 4 (Lys4) histonu H3 (H3K4me3), co powoduje rozluźnienie struktury chromatyny. Heterochromatyna natomiast, która jest wzbogacona w metylowane DNA oraz reszty histonowe pozbawione acetylacji, dzieli się na dwie podgrupy: konstytutywną i fakultatywną. Konstytutywna heterochromatyna zawiera silnie skondensowane regiony genomu nieaktywne transkrypcyjnie, które są wzbogacone w metylację lizyny 9 histonu 3 (H3K9), do których należą centromery. Fakultatywna heterochromatyna odnosi się do regionów genomu, które są wyciszone, ale mogą być aktywowane transkrypcyjnie w pewnych sytuacjach lub typach komórek, a więc są podatne na regulację. W obszarach tych występują głównie geny regulujące rozwój organizmu [80].

Metylotransferazy DNA

Za proces metylacji DNA odpowiedzialne są enzymy zwane metylotransferazami DNA (DNMTs, ang. *DNA Nucleotide Methyltransferases*). Powyższe enzymy katalizują transfer grupy metylowej z cząsteczki S-adenozylu-L-metioniny (AdoMet lub SAM) na węgiel 5 reszty cytozyny. W wyniku tej reakcji powstaje 5-metylocytozyna oraz produkt poboczny S-adenozylu-L-homocysteina. Grupa metylowa cytozyny umiejscowiona jest w dużej bruzdzie nici DNA, gdzie może być efektywnie rozpoznawana przez białka wykazujące powinowactwo do metylowanych sekwencji DNA [74]. Wśród ssaczych metylotransferaz DNA możemy wyróżnić sześć najlepiej poznanych enzymów (Dnmt1, Dnmt1o, Dnmt2, Dnmt3a, Dnmt3b oraz Dnmt3L) [81]. Dnmt1, metylotransferaza DNA 1 wykazuje powinowactwo względem hemimetylowanego DNA i odpowiada za utrzymanie wzoru metylacyjnego w trakcie procesu replikacji oraz naprawy DNA (metylacja bierna lub zachowawcza) [74, 76, 82]. Dnmt1 jest produkowana zarówno w komórkach embrjonalnych oraz dorosłych ssaków i jest główną metylotransferazą obecną w komórkach somatycznych [82, 83]. Enzym Dnmt1o jest izoformą białka Dnmt1, aktywną do stadium blastocysty [84]. Metylotransferazy Dnmt3a i Dnmt3b wykazują powinowactwo względem niemetylowanych oraz hemimetylowanych sekwencji DNA i odpowiadają za tak zwaną *de novo* metylację chromatyny na wczesnych etapach rozwoju embrjonalnego i w komórkach rozrodczych [74]. Ich poziom ekspresji w dorosłych komórkach ssaczych jest stosunkowo niski w porównaniu do komórek embrjonalnych [83]. Należąca do tej samej rodziny metylotransferaza

Dnmt3L nie posiada właściwości katalitycznych, natomiast oddziałuje z enzymami Dnmt3a i Dnmt3b wzmacniając ich aktywność [76]. Metylotransferazy Dnmt3a, Dnmt3b oraz Dnmt3L najprawdopodobniej odpowiadają też, za metylację cytozyny w dinukleotydach "non-CpG" [79]. Białko Dnmt2 zostało zaliczone do rodziny metylotransferaz DNA ze względu na jego wysoką homologię strukturalną i sekwencyjną do pozostałych metylotransferaz DNA. Badania wykazały jednak, że enzym Dnmt2 jest odpowiedzialny za metylację 38 reszty cytozyny w antykodonowej pętli tRNA kwasu asparaginowego [85].

Białka TET (*Ten-Eleven Translocation*)

Białka należące do rodziny TET (TET1, TET2, TET3) są dioksygenazami zależnymi od tlenu, żelaza i 2-oksoglutaranu zdolnymi do utleniania 5-metylocytozyny (5-mC) do 5-hydroksymetylocytozyny (5-hmC), następnie do 5-formylocytozyny (5-fC) i 5-karboksylocytozyny (5-caC). Białka TET najprawdopodobniej poprzez modyfikację 5-mC uczestniczą w aktywnej demetylacji reszty cytozyny. Zakłada się, że do demetylacji reszty 5-metylocytozyny dochodzi poprzez aktywację enzymu glikozylazy tymidynowej DNA, który rozpoznając 5-fC oraz 5-caC aktywuje system naprawy DNA BER (ang. *Base-Excision Repair*). Powoduje to wycięcie z nici DNA 5-fC lub 5-caC oraz wstawianie w ich miejsce niemodyfikowanej reszty cytozyny [86]. Wysoki poziom 5-hmC występuje w embrionalnych komórkach macierzystych i jest pozytywnie skorelowany z ich zdolnościami do pluripotencji [87]. W dorosłym organizmie 5-hmC jest obecna w regionach promotorowych genów w neuronach [88].

Metylacja DNA w regionie promotorowym i wewnątrz genu

Proces metylacji DNA może zachodzić zarówno w regionach promotorowych genów jak również wewnątrz genów w miejscach intronowo-egzonowych. Wykazano, że metylacja DNA w regionie promotorowym genu (w obrębie TSS), głównie wpływa na wyciszenie ekspresji genu, poprzez bezpośrednie hamowanie przez 5-mC wiązania czynników transkrypcyjnych do regionów promotorowych genów lub poprzez wiązanie do 5-metylocytozyn białek MBD (ang. *Methyl-CpG Binding Domain proteins*). MBDs aktywują kompleks białek modyfikujących chromatynę do formy nieaktywnej transkrypcyjnie [89].

Natomiast metylacja wewnątrz sekwencji genu nie blokuje jego ekspresji i może nawet stymulować proces elongacji w trakcie transkrypcji. Pozytywną korelację pomiędzy metylacją DNA a aktywną transkrypcją potwierdzono między innymi w trakcie badania procesu transkrypcji genów z aktywnego chromosomu X oraz za pomocą sekwencjonowania wodorosiarczynowego genomów zwierząt i roślin. Ponadto wykazano, iż z reguły miejsca egzonowe posiadają wyższy stopień metylacji niż miejsca intronowe genów [90]. Najczęściej zmiana w stopniu metylacji zachodzi na granicy miejsc intronowo-egzonowych, co sugeruje wpływ metylacji DNA na regulację składania egzonów z pre-mRNA w procesie splicingu [90] oraz stymulację procesu elongacji w trakcie transkrypcji [89].

2.6. Wpływ regulacji epigenetycznej na rozwój organizmu i proces regeneracji

Regulacja epigenetyczna odgrywa kluczową rolę w zjawisku piętnowania genomowego, wyciszaniu ekspresji określonych grup genów w różnicowaniu tkanek i komórek oraz w lionizacji, czyli inaktywacji jednego z chromosomów X u kobiet. Ponadto metylacja DNA jest także związana z procesem naprawy DNA oraz wyciszaniem elementów transpozycyjnych i retrowirusowych w genomie ssaków [76].

Zmiany we wzorze i poziomie globalnej metylacji wpływają na proces embriogenezy i prawidłowego rozwoju organizmu. Już na etapie gametogenezy dochodzi do specyficznej zmiany wzoru metylacyjnego DNA określonych sekwencji nukleotydowych zarówno w męskich jak i żeńskich komórkach rozrodczych. Drugie ważne przeprogramowanie wzoru metylacyjnego DNA zachodzi na etapie wczesnego zarodka. Wiele sekwencji DNA jest aktywnie demetylowanych w zygocie. Następnie metylotransferazy DNMT3A i DNMT3B przeprowadzają proces *de novo* metylacji DNA. W wyniku powtórnej metylacji regionów promotorowych genów w trakcie rozwoju embrionalnego dochodzi do wyciszenia ekspresji genów będących markerami pluripotencji takich jak *Nanog*, *Oct4* czy *Lefty1* [91]. Metylacja regionów promotorowych tych genów może wpływać na utratę zdolności do regeneracji w dorosłych organizmach ssaczy.

Embrionalne komórki macierzyste wykazują zdolność do samoodnowy i mogą różnicować się do każdego typu komórek dorosłych. Ich zdolność do pluripotencji wynika z obecności biwalentnego stanu epigenetycznego w regionach promotorowych

genów odpowiedzialnych za rozwój organizmu. W obrębie miejsca transkrypcji tych genów występuje jednocześnie potrójna metylacja lizyny 27 (represja ekspresji) oraz lizyny 4 (aktywacja ekspresji) histonu 3. Współistnienie tych antagonistycznych znaków epigenetycznych w obrębie początku startu transkrypcji pozwala na aktywację transkrypcji kluczowych genów w trakcie rozwoju organizmu. Komórki macierzyste w dorosłym organizmie mogą występować w różnych tkankach i pośredniczyć w procesach różnicowania komórek oraz regeneracji w odpowiedzi na zranienia. Somatyczne komórki macierzyste mogą się odnawiać i różnicować jedynie do pewnej ograniczonej liczby typów komórek określonej dla rodzaju komórek wyjściowych. Takie komórki zidentyfikowano między innymi w tkankach krwi, mózgu, mięśni, skóry oraz jelita. Badania wykazały, że w tkankach, które posiadają zdolność do regeneracji, regiony promotorowe genów kluczowych dla tego procesu posiadają biwalentny stan epigenetyczny, analogicznie do embrionalnych komórek macierzystych [80]. Liczba takich tkanek w naszym organizmie jest jednak ograniczona i kręgowce wyższe, w tym ludzie, posiadają często bardzo ograniczone zdolności regeneracyjne.

Innym przykładem wskazującym na związek pomiędzy metylacją DNA a zdolnością regeneracyjną jest odbudowa uszkodzonych w wyniku kontuzji mięśni u ssaków. W mięśniach ssaków występują komórki satelitarne, pełniące funkcję podobną do embrionalnych komórek macierzystych, które są prekursorami komórek miogennych. Do regeneracji mięśni konieczna jest aktywacja genów *Myf5* i *MyoD*. Aktywacja ekspresji tych genów, poprzez demetylację ich regionów promotorowych umożliwia proliferację komórek satelitarnych, ich późniejsze różnicowanie i w konsekwencji regenerację uszkodzonej tkanki mięśniowej [92].

Przykładem bardziej ograniczonych zdolności regeneracyjnych, obecnych tylko na pewnym etapie rozwoju, jest kijanka żaby *Xenopus laevis*. Wykazano, że utrata zdolności do regeneracji kończyn u dorosłej żaby jest związana z metylacją sekwencji wzmacniającej ekspresję genu *Shh* (ang. *Sonic hedgehog*) - morfogenu odpowiedzialnego za prawidłowy rozwój kończyn. W blastemie kijanek żaby, gdzie dochodzi do ekspresji genu *Shh*, sekwencja wzmacniająca jego ekspresję - MFCS1, jest hipometylowana, natomiast po metamorfozie kijanki dochodzi do metylacji tego regionu regulatorowego [4].

Dowodzono także wpływ regulacji epigenetycznej na naprawę centralnego układu nerwowego. Szlak kwasu foliowego odgrywa ważną rolę w naprawie

centralnego układu nerwowego po uszkodzeniach. Wykazano, że taka naprawa zachodzi przynajmniej częściowo przez regulację metylacji DNA. U gryzoni z urazem nerwu kulszowego regeneracja aksonów centralnego układu nerwowego, w której pośredniczą foliany, zależy od aktywacji receptora 1 kwasu foliowego (*Folr1*). Badania wykazały, że wpływ folianów na regenerację doprowadzających neuronów rdzenia był ściśle skorelowany z zakresem dawek kwasu foliowego oraz z globalną i genowo-specyficzną metylacją DNA, ekspresją zarówno receptora kwasu foliowego *Folr1* jak i *de novo* metylotransferaz DNA [93].

Również muszka owocowa *Drosophila* wykazuje podwyższoną zdolność do regeneracji w stadium larwalnym dzięki obecności tkanki zawiązkowej (primordium) zwanej tarczami imaginalnymi (ang. *imaginal discs*). Wykazano zdolność do regeneracji dysków imaginalnych u muszki owocowej po uszkodzeniach spowodowanych naświetlaniem promieniowaniem X. Dowiedziono, że obniżona aktywność kompleksu białek polycomb (PcG, ang. *Polycomb repressive complexes 1 i 2* (PRC1, PRC2)), które katalizują, między innymi, wyciszenie ekspresji genów poprzez potrójną metylację lizyny 27 histonu 3 (H3K27me3), może odpowiadać za zdolność do odbudowy utraconych kończyn u larw muszki owocowej [94].

Powyższe badania wskazują, iż regulacja epigenetyczna nie tylko odgrywa kluczową rolę w trakcie rozwoju organizmu i embriogenezy, pozwalając na prawidłowe różnicowanie komórek i budujących je tkanek, ale również za procesy regeneracyjne.

W odniesieniu do skóry płodu znamienne jest natomiast zachowanie zdolności tej tkanki do bezbliznowego gojenia po przeszczepie do dorosłego organizmu, co sugeruje epigenetyczną determinację tego fenomenu. W związku z powyższym ustalenie zmian we wzorze metylacyjnym DNA przed i po 16 dniu embrionalnym myszy w skórze grzbietowej może przyczynić się do wyjaśnienia molekularnych podstaw regeneracji ssaków.

2.7. Badanie globalnego poziomu metylacji i ekspresji genów

Opracowano wiele metod umożliwiających badanie poziomu metylacji i ekspresji genów na skalę genomową. Z reguły są one oparte o system mikromacierzy lub sekwencjonowanie drugiej generacji (NGS, ang. *Next-Generation Sequencing*).

Pośród technik służących do badania zmian w globalnych profilach metylacji DNA możemy wyróżnić technikę opartą o immunoprecypitację metylowanego DNA (MeDIP, ang. *Methylated DNA ImmunoPrecipitation*), w której stosuje się przeciwciała specyficzne wobec reszty 5-metylocytozyny do precypitacji fragmentów DNA zawierających metylowane regiony CpG [95] lub inne białka wiążące 5-mC (np. MBD). Inną metodą jest technika oparta na konwersji wodorosiarczynowej DNA, a następnie sekwencjonowaniu drugiej generacji [96]. W przypadku metody MeDIP, DNA genomowe jest najpierw fragmentowane poprzez sonikację, denaturowane i precypitowane za pomocą przeciwciał specyficznych wobec metylowanej reszty cytozyny. Następnie, badane i kontrolne DNA jest znakowane za pomocą różnych barwników (z reguły cyjanianów) i poddane hybrydyzacji na mikromacierzach, zawierających sondy specyficzne wobec określonych *loci* genowych. Pojedyncze *loci* genowe mogą być natomiast analizowane poprzez standardowe metody takie jak ilościowy PCR w czasie rzeczywistym [97].

W przypadku techniki NGS, przed wykonaniem sekwencjonowania, zagęszcza się frakcję DNA bogatą w miejsca CpG. Najczęściej stosuje się do tego celu technikę RRBS (ang. *Reduced Representation Bisulphite Sequencing*). W metodzie RRBS DNA genomowe zostaje, na początku, poddane trawieniu przy zastosowaniu enzymów restrykcyjnych (np. *MspI*) [98]. Następnie fragmenty DNA o odpowiedniej wielkości, z przyłączonym adaptorem, są poddawane konwersji wodorosiarczynowej, w wyniku której niemetylowana reszta cytozyny jest przekształcana do uracylu [99]. Tak otrzymana matryca jest następnie poddawana sekwencjonowaniu [100].

Metoda NGS, w porównaniu do MeDIP-chip, zapewnia rozdzielczości z dokładnością do jednego nukleotydu. Natomiast zaletą metody MeDIP-chip jest badanie DNA bez etapu konwersji chemicznej i związanych z tym problemów niepełnej konwersji, degradacji oraz eliminacji cytozyn z sekwencji nukleotydowej, co zwiększa poziom niejednoznaczności w sekwencji nukleotydowej.

W przypadku badań transkryptomycznych również najczęściej stosuje się metodę opartą na hybrydyzacji cDNA do mikromacierzy lub metodę NGS. Pomimo tego, iż technologie mikromacierzowe są bardzo często wykorzystywane w badaniach transkryptomycznych, mają one pewne ograniczenia. Na przykład, duże tło hybrydyzacji ogranicza możliwość wykrycia transkryptów, które są ekspresjonowane na niskim poziomie. Ponadto, sondy różnią się w swoich właściwościach hybrydyzacyjnych

i za pomocą macierzy możemy zbadać poziom ekspresji tylko tych transkryptów, dla których są zaprojektowane sondy. Technika NGS daje większe możliwości w przypadku badania transkryptomu. Umożliwia wykrycie istotnych różnic w poziomie ekspresji wszystkich genów oraz wykazuje większą czułość. Dodatkowo, ułatwia znalezienie nowych wariantów transkrypcyjnych, ponieważ nie jest ograniczona jedynie do sekwencji określonych sond [101]. Za atut metod macierzowych można uznać oprócz niższych kosztów, także znacznie łatwiejszą analizę wyników.

3. Cel pracy

Głównym celem pracy była próba określenia potencjalnych molekularnych mechanizmów, a w szczególności różnic w profilach metylacji i ekspresji genów, odpowiadających za podwyższone zdolności regeneracyjne ssaków w oparciu o dwa modele: dorosłej myszy MRL/MpJ oraz skóry embrionów myszy posiadających zdolność do bezbliznowego gojenia ran.

4. Materiały i metody

4.1. Materiały

4.1.1. Tkanki

- Tkanki serca, śledziony, małżowiny usznej, wątroby (pobrane na odczynnik stabilizujący RNA, RNAlater), szpiku kostnego i krwi (pobranej na EDTA) pochodzące od ośmiotygodniowych samic myszy MRL/MpJ (nr kat. #000486) oraz C57BL/6J (nr kat. #000664) zostały dostarczone przez The Jackson Laboratory (Stany Zjednoczone), natomiast tkanki pochodzące od myszy BALB/c oraz serca pochodzące od embrionów i noworodków myszy C57BL/6J zostały zakupione w Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarńi Doświadczalnej (Gdański Uniwersytet Medyczny).
- Tkanki serca, śledziony i wątroby pochodzące od pięcioletniowych samców myszy MRL/MpJ (nr kat. #000486) oraz C57BL/6J (nr kat. #000664) zostały dostarczone przez The Jackson Laboratory (Stany Zjednoczone).
- Skóra grzbietowa, serca embrionów z dnia embrionalnego E15, E16, E18, E19 oraz z dorosłych myszy szczepu C57BL/6J w wieku 3 miesiące zostały pobrane w Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarńi Doświadczalnej (Gdański Uniwersytet Medyczny). Wiek embrionów myszy został określony na podstawie utworzenia czopu waginalnego po zapłodnieniu u samic (dzień zapłodnienia został oznaczony jako E0). Dodatkowo wykonano ocenę cech morfologicznych określonych wg skali Theilera. Samice myszy w wieku ciążowym E15, E16, E18, E19 zostały uśpione przy zastosowaniu izofluranu i poddane eutanazji poprzez przerwanie rdzenia kręgowego. Następnie embriony zostały usunięte z macicy samicy myszy, uśmiercone i pobrano z nich skórę grzbietową oraz serca. Doświadczenia zostały wykonane za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach nr 3 w Gdańsku (nr MPK 667, nr pozwolenia 5/2013).

Pobrane tkanki były stabilizowane w roztworze RNAlater (Qiagen, nr kat. 76104) i przechowywane w temperaturze -80°C.

4.1.2. Odczynniki stosowane do izolacji DNA genomowego

Izolacja genomowego DNA była prowadzona za pomocą zestawów DNeasy Blood and Tissue firmy Qiagen (nr kat. 69504).

4.1.3. Odczynniki stosowane do izolacji RNA

Izolacja całkowitego RNA była prowadzona za pomocą zestawów RNeasy Mini firmy Qiagen (nr kat. 74104). W celu usunięcia genomowego DNA z próbki, użyto zestawu wolnej od RNaz DNazy (ang. *RNase-free DNase Set*) firmy Qiagen, zawierający DNazę I (2,7 U/ μ l).

4.1.4. Odczynniki stosowane do odwrotnej transkrypcji

A) Synteza pierwszej nici cDNA

- Całkowite RNA (ang. *total RNA*)
- Roztwór trifosforanów deoksyrybonukleozydów (po 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- Odwrotna transkryptaza Maxima Reverse Transcriptase 200 U/ μ l (Thermo Scientific, nr kat. EP0742)
- 5x stężony bufor do odwrotnej transkryptazy (Thermo Scientific, nr kat. EP0742)
- Oligonukleotydy dT₍₂₀₎ 100 μ M (Genomed, Polska)

B) Synteza dwuniciowego cDNA (zestaw cDNA Synthesis System, Roche, nr kat. 11 117 831 001)

- jednoniciowe cDNA (z etapu 4.1.4. A)
- 5x stężony bufor do syntezy drugiej nici
- Roztwór trifosforanów deoksyrybonukleozydów (po 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- mieszanka enzymów do syntezy drugiej nici cDNA (mieszanka polimerazy I DNA, ligazy *E. coli*, RNazy H)

- polimeraza T4 DNA 1 U/ μ l
- RNaza I 10 U/ μ l
- proteinaza K 50 U/ μ l

4.1.5. Odczynniki stosowane do oczyszczania ds cDNA

Oczyszczanie ds cDNA było prowadzone za pomocą zestawów High Pure PCR Product Purification firmy Roche (nr kat. 11732668001).

4.1.6. Odczynniki stosowane do trawienia DNA genomowego enzymami wrażliwymi na metylację (*HpaII*)

Trawienie DNA genomowego za pomocą enzymów restrykcyjnych (*HpaII/MspI*) było prowadzone przy użyciu zestawu EpiJET DNA Methylation Analysis Kit (Thermo Scientific, nr kat. K1441).

- Enzymy restrykcyjne *MspI* i *HpaII*
- 10x stężony bufor reakcyjny Epi
- Niemetylowana kontrola pUC19/*SmaI* DNA (0,5 μ g/ μ l)
- Metylowna kontrola pUC19/*SmaI* DNA (0,5 μ g/ μ l)

Enzym	Sekwencja rozpoznania	Temperatura działania enzymu
<i>HpaII</i>	$5' \dots \overset{\blacktriangledown}{C} \text{CGG} \dots 3'$ $3' \dots \text{GGC} \overset{\blacktriangle}{C} \dots 5'$ Brak trawienia, gdy C w obrębie dinukleotydu CG jest metylowana	37°C
<i>MspI</i>	$5' \dots \overset{\blacktriangledown}{C} \text{CGG} \dots 3'$ $3' \dots \text{GGC} \overset{\blacktriangle}{C} \dots 5'$ Niewrażliwy na metylację C	37°C

4.1.7. Odczynniki stosowane do reakcji PCR w czasie rzeczywistym

- Zestaw Fast Essential DNA Green Master (Roche, nr kat. 06402712001);
- jednoniciowe cDNA lub DNA genomowe poddane lub niepoddane trawieniu enzymem restrykcyjnym *HpaII*;

- Startery o sekwencji nukleotydowej z nici sensownej (F) i antysensownej (R) (10 μ M):

Startery zaprojektowano w oparciu o sekwencje nukleotydowe pozyskane z baz danych ENSEMBL, UCSC Genome Browser lub NCBI. Startery te są komplementarne tylko do sekwencji nukleotydowej badanych regionów DNA. Specyficzność starterów potwierdzono przy użyciu programu Primer Blast. W celu eliminacji sygnałów pochodzących od amplifikacji fragmentów genomowego DNA, startery do analizy poziomu ekspresji zostały zlokalizowane na granicy pomiędzy egzonami, wykluczając miejsca intronowe.

A) Sekwencje starterów służących do analizy poziomu ekspresji (t) genów metodą qPCR zaprojektowane na podstawie wyników uzyskanych z mikromacierzy ekspresyjnej dla szczepów myszy MRL/MpJ, C57BL/6J oraz BALB/c (ośmiotygodniowe samice)				
Numer genu (transkryptu) wg NCBI	Gen/Loci genowe	Długość produktu reakcji (pz)	Nazwa startera	Sekwencja startera (5'-3')
NM_029975	<i>Ulbp1</i>	168	tUlbp1-168-F	TAAAGAAGACTACAGAGGGCGA
			tUlbp1-168-R	GTCTTAATTTACAAGAGACTCCGAA
BC032877	<i>Wisp2</i>	121	tWisp2-121-F	CCCAGGAGAATACAGGTGCCAG
			tWisp2-121-R	GAGTGACAAGGGCAGAAAGTTG
BC028770	<i>Adipoq</i>	152	tAdipoq-152-F	TCCTGGAGAGAAGGGAGAGAAA
			tAdipoq-152-R	GATACACATAAGCGGCTTCTCC
BC119177	<i>Lbx1</i>	142	tLbx1-142-F	CAAGACCTTTAAGGGGCTGGAG
			tLbx1-142-R	CAACTCGTAGATCTGGTGGTTG
BC046991	<i>Mmp9</i>	138	tMmp9-138-F	TAAAGACGACATAGACGGCATC
			tMmp9-138-R	GAGGTATAGTGGGACACATAGT
BC091751	<i>Rbp1</i>	136	tRbp1-136-F	TCGGAACTATATCATGGACTTCCAA
			tRbp1-136-R	CTCCTTCTCTCCCTTCTGCACA
BC049592	<i>Fgf21</i>	148	tFgf21-148-F	TCATTCAAATCCTGGGTGTCAAA
			tFgf21-148-R	GCTTCAGACTGGTACACATTGTAA
BC042773	<i>Mamdc2</i>	136	tMamdc2-136-F	TTTGATAGAAGGTGTCCTGGGA
			tMamdc2-136-R	GAACCAGTTCACATTGGGATTC
BC062902	<i>Gpc1</i>	123	tGpc1-123-F	ATCTACGGGGCTAAGGGCTTTA
			tGpc1-123-R	GGCCAAATTCTCCTCCATCTCA
NM_007393	<i>Actb</i> (sekwencje starterów z artykułu [102])	500	tActb-500-F	TCAGAAGGACTCCTATGTGG
			tActb-500-R	TCTCTTTGATGTCACGCACG

B) Sekwencje starterów służących do analizy poziomu metylacji (g) i ekspresji (t) genów metodą qPCR, zaprojektowane na podstawie wyników uzyskanych z mikromacierzy metylacyjnej dla szczepów myszy MRL/MpJ i C57BL/6J (pięciotygodniowe samce)

Numer genu wg NCBI	Gen/Loci genowe	Długość produktu reakcji (pz)	Nazwa startera	Sekwencja startera (5'-3')
NM_019446	<i>Barhl1</i>	189	gBarhl1-189F	TTTTAAAGGGGACTCACCCACG
			gBarhl1-189R	ATGAAAGCAAACGTGTGTGGAAATC
NM_019446	<i>Barhl1</i>	126	tBarhl1-126F	TAGCTTCGAGCGGCAGAAATA
			tBarhl1-126R	GTCTGTCGCTTCCATTTAGTC
NM_018859	<i>Akr1e1</i>	189	gAkr1e1-189-F	GTCTGGGGGAAAACCTTAATCA
			gAkr1e1-189-R	GGAACCATGGAAAACATCCCTA
NM_018859.2	<i>Akr1e1</i>	134	tAkr1e1-134-F	TTACTTATACCACAATGAGAGC
			tAkr1e1-134-R	TTTTACCAATGACTTCTTGTG
NM_025289	<i>Tbrg1</i>	339	tTbrg1-339F	CAGAATACCATCGTCGGCTCC
			tTbrg1-339R	TTCGTGTGTCAGGAACTCTGGC

C) Startery służące do analizy poziomu metylacji (g) lub ekspresji genów (t) metodą qPCR, zaprojektowane na podstawie wyników uzyskanych z mikromacierzy metylacyjnych i ekspresyjnych dla tkanek skóry grzbietowej embrionów i dorosłych osobników szczepu myszy C57BL/6J

Numer genu (transkryptu) wg NCBI	Gen/Loci genowe	Długość produktu reakcji (pz)	Nazwa startera	Sekwencja startera (5'-3')
NM_010455	<i>Hoxa7</i>	159	gHoxa7-159-F	TATTGGGCTTGGAGACTATGTC
			gHoxa7-159-R	TTCGCTGCTGAGAGGTTTTTCA
NM_001025560	<i>Sox6</i>	300	gSox6-300-F	TGGTCAGTCTTCTAGCCAGG
			gSox6-300-R	GGTAGGAGAGGGAACCCTGAA
NM_010451	<i>Hoxa2</i>	223	gHoxa2-223-F	GTGCGGGGGAATGGAGAGGA
			gHoxa2-223-R	GATAGAGGCCGCGGTTTTCAA
NM_130893	<i>Scrt1</i>	202	gScrt1-202-F	GTGGTGACCTTATACGGACTGG
			gScrt1-202-R	GGAGCGAAGTCGCTAACATAAA
BC021636	<i>Hyal1</i>	133	tHyal1-133-F	CTACGTCCAGATCTTCTATGAAAT
			tHyal1-133-R	GGTACTTGTTTTGTCTGAGCTTA
BC099373	<i>Fn1</i>	142	tFn1-142-F	CAAATCGTGCAGCCTCAATC
			tFn1-142-R	TTCTCCATAGCAGGTACAAAC
BC119517	<i>Il1f8</i>	128	tIl1f8-128-F	GAAACTACAGGGTTCATGACTC
			tIl1f8-128-R	TTCCGTGTCTCTACATGCTATC
BC103666 BC103615	<i>Krt16</i>	133	tKrt16-133-F	TGAAGATCCGGGACTGGTACCA
			tKrt16-133-R	TGCAAAGTGAACGTGCATTCT
BC116916	<i>Dapl1</i>	121	tDapl1-121-F	GGATGCGAATCTCCAAAAACAA
			tDapl1-121-R	GTCAGAGCATCCAACATCTGTA
BC127068	<i>Tert</i>	157	tTert-157-F	CCATTGTGAACATGAGTTATAGC
			tTert-157-R	TTCATACCCAGTACAGAAGACC
BC132454	<i>Krt17</i>	120	tKrt17-120-F	CGCTTATTACCATACCATTGAGG
			tKrt17-120-R	TTGGTACGGAAGTCATCGGC

4.1.8. Odczynniki stosowane do reakcji PCR

- DNA genomowe lub DNA genomowe poddane konwersji wodorosiarczynowej
- Roztwór chlorku magnezu (50 mM)
- Roztwór trifosforanów deoksyrybonukleozydów (po 2,0 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- Polimeraza DNA HotStart *Taq* 5 U/ μ l (Thermo Scientific, nr kat. EP0602)
- 10x stężony bufor do reakcji PCR dla polimerazy HotStart *Taq* (Thermo Scientific, nr kat. EP0602)
- Startery (10 μ M):

A). Określanie płci płodów myszy

Gen/Loci genowe	Nazwa startera	Sekwencja startera (5'-3')	Uwagi
<i>Sly / Xlr</i>	SX-F	GATGATTTGAGTGGAAATGTGAGGTA	Sekwencje starterów zaczerpnięte z publikacji [103]; amplifikacja na chromosomie X daje produkty o wielkości 480 pz, 660 pz i 685 pz; amplifikacja na chromosomie Y -produkt o wielkości 280pz
	SX-R	CTTATGTTTATAGGCATGCACCATGTA	

B). Sekwencjonowanie wodorosiarczynowe

Gen/Loci genowe (długość produktu pz)	Nazwa startera	Sekwencja startera (5'-3')	Obszar amplifikowanego piku metylacyjnego
<i>Tbrg1</i> (271)	bTbrg1-271-F	TTTTTTTATTATTTATATGAAGAGGGAT	chr9:37,467,581-37,467,851
	bTbrg1-271-R	CCAAATTACCTTCTAATCTCCATACA	
<i>Akr1e1</i> (234)	bAkr1e1-234-F	TTTTAGGATTATAGGAGAGAGAGTTT	chr13:4,608,144-4,608,377
	bAkr1e1-234-R	AAAAAACCATAAAAAACATCCCTA	

4.1.9. Konwersja wodorosiarczynowa

Chemiczna konwersja (ang. *bisulphite conversion*) genomowego DNA była prowadzona za pomocą zestawów EZ DNA Methylation™ Kit (Zymo Research, nr kat. D5001).

4.1.10. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Rozdział elektroforetyczny DNA oraz RNA przeprowadzany był w żelu agarozowym o stężeniu 1% lub 2%, w buforze 1xTAE z dodatkiem bromku etydyny o stężeniu 0,1 µg/ml. Do próbek dodawano bufor obciążający 6X Green Gel Loading Dye (DNA Gdańsk, Polska).

4.1.11. Markery wielkości DNA

Marker M1 (pUC19/MspI) (DNA Gdańsk, nr kat. MR11) – wielkość fragmentów: 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110 pz.

4.1.12. Pozostałe bufony i roztwory

- Bufor TE (pH 8,0): 10 mM Tris, 1 mM EDTA
- Bufor 50xTAE (pH 8,3): 242 g Tris, 57,1 ml lodowatego kwasu octowego, 100 ml 0,5 M EDTA, woda destylowana do 1000 ml
- Bufor Tris (pH 8,5): 10 mM Tris-HCl
- EDTA 0,2 M (pH 8,0)

4.2. Metody

4.2.1. Izolacja genomowego DNA

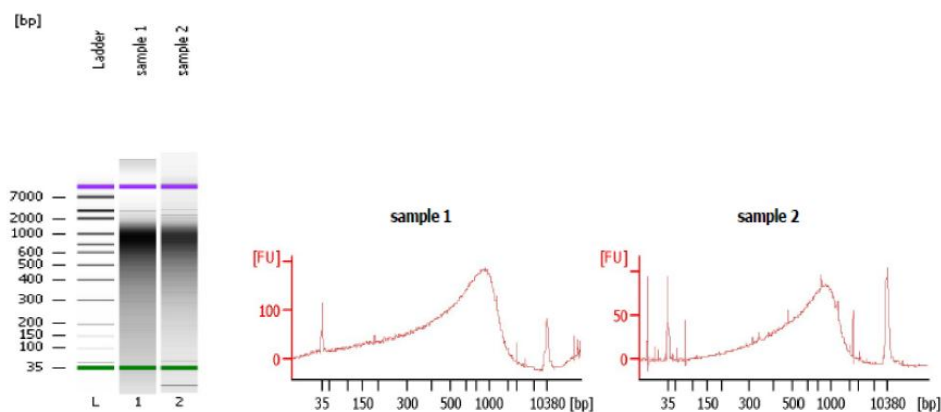
Izolację DNA genomowego (4.1.2) przeprowadzano z zastosowaniem zestawu DNeasy Blood and Tissue firmy Qiagen (nr kat. 69504), zgodnie z procedurą załączoną przez producenta. Wyizolowane DNA genomowe było przechowywane w temperaturze -20°C .

4.2.2. Izolacja RNA

Izolację całkowitego RNA przeprowadzano przy zastosowaniu zestawu RNeasy Mini (nr kat. 74104) z trawieniem DNA na kolumnie (nr kat. 79254) (4.1.3) zgodnie z procedurą załączoną przez firmę Qiagen do zestawu. Wyizolowane RNA było przechowywane w temperaturze -20°C .

4.2.3. Wyznaczanie stężenia DNA, RNA i ds cDNA

Stężenie DNA genomowego, RNA oraz dwuniciowego cDNA wyznaczono używając spektrofotometru NanoDrop Thermo Scientific. Jakość dwuniciowego cDNA sprawdzano także używając Bioanalyzer Agilent 2100 (Rys. 2) (Corelab, Pracownia Analiz Mikromacierzy, Warszawa).



Rys. 2. Przykładowy elektroforegram, otrzymany dla próbek ds cDNA po analizie na bioanalizatorze Agilent 2100, służący do oceny jakości ds cDNA używanego do hybrydyzacji do mikromacierzy ekspresyjnej.

FU- jednostka fluorescencji; Sample 1- ds cDNA E15; Sample 2- ds cDNA E18.

4.2.4. Odwrotna transkrypcja

A) Skład pierwszej mieszaniny reakcyjnej (4.1.4 A):

Do syntezy pierwszej nici cDNA zastosowano RNA, wyizolowane z tkanek pochodzenia embrionalnego oraz dorosłych myszy szczepu C57BL/6J, MRL/MpJ oraz BALB/c (4.1.1). Do późniejszej syntezy dwuniciowego cDNA, używanego do hybrydyzacji do mikromacierzy ekspresyjnej, wyizolowane RNA pochodzące od trzech osobników w tym samym wieku lub od tego samego szczepu myszy, łączono w równych ilościach (po 1000 ng). Syntezę cDNA używanego w reakcji qPCR przeprowadzano w objętości 20 μ l, zaś syntezę cDNA wykorzystywanego dalej do syntezy ds cDNA przeprowadzano w objętości 40 μ l.

Składnik	Objętość (na 20 μ l/40 μ l)
Całkowite RNA	200 ng/3000 ng
Oligo dT ₍₂₀₎ (100 μ M)	1 μ l/2 μ l
dNTPs (10 mM każdego z dNTPs)	1 μ l/2 μ l
Woda	do 14,5 μ l/29 μ l

Tak otrzymaną mieszaninę reakcyjną inkubowano w 65°C przez 600 s. Następnie do mieszaniny dodawano:

Składnik	Objętość
5x bufor do odwrotnej transkryptazy	4 μ l/8 μ l
Inhibitor RNaz	0,5 μ l/1 μ l
Odwrotna transkryptaza Maxima Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)	1 μ l/2 μ l
Woda	do 20 μ l/40 μ l

Następnie mieszaninę inkubowano zgodnie z poniższym profilem temperaturowo - czasowym:

Temperatura [°C]	Czas [s]
50	1800
85	300

Otrzymane cDNA przechowywano w temperaturze -20°C lub wykorzystano bezpośrednio do syntezy drugiej nici cDNA.

B) Skład mieszaniny reakcyjnej do syntezy drugiej nici cDNA (zestaw cDNA Synthesis System, Roche, nr kat. 11 117 831 001, 4.1.4 B):

Składnik	Objętość (na 150µl)
cDNA	40 µl
Bufor do syntezy drugiej nici cDNA	30 µl
dNTPs (10 mM każdego z dNTPs)	1,5 µl
Mieszanina eznymów do syntezy drugiej nici	6,5 µl
Woda	72 µl

Następnie tak sporządzoną mieszaninę inkubowano przez 2h w 16°C. Po tym czasie dodano 20 µl (20 U) polimerazy DNA T4 i inkubowano mieszaninę przez kolejne 5 min w temperaturze 16°C. Reakcję syntezy drugiej nici cDNA zatrzymano przez dodanie 17 µl 0,2 M EDTA o pH 8,0 (4.1.12).

Po reakcji syntezy ds cDNA, w celu usunięcia pozostałego całkowitego RNA, dodano do próbki 1,5 µl (15 U) RNazy I i inkubowano mieszaninę przez 30 min w temperaturze 37°C. Następnie dodano 5 µl (0,25 U) rekombinantowej proteiny K i inkubowano próbkę przez kolejne 30 min w 37°C. Tak otrzymane ds cDNA było następnie oczyszczane na kolumnach ze złożem silikonowym (4.1.5).

4.2.5. Oczyszczanie ds cDNA

Dwuniciowe cDNA (ds cDNA) było oczyszczane z zastosowaniem zestawu High Pure PCR Product Purification (Roche, nr kat. 11732668001) (4.1.5) zgodnie z protokołem dołączonym przez firmę Roche do zestawu. Dwuniciowe cDNA eluowano z kolumny 50 µl buforu do elucji (Tris-HCl, pH 8,5). Oczyszczone ds cDNA było przechowywane w temperaturze -80°C.

4.2.6. Trawienie DNA genomowego enzymami wrażliwymi na metylację

Reakcję trawienia DNA genomowego przy użyciu enzymów *HpaII* i *MspI* (4.1.6) przeprowadzano zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu EpiJET DNA Methylation Analysis Kit (ThermoScientific, nr kat. K1441). Do reakcji używano po 200 ng DNA genomowego. Reakcja kontrolna była wykonywana w celu sprawdzenia braku inhibicji przez jakikolwiek czynnik w trakcie trawienia DNA.

Skład mieszaniny reakcyjnej dla 1 próbki (20 µl):

Składnik	Objętość [µl]
DNA genomowe (25 ng/µl)	8
Epi <i>HpaII</i>	1
10X stężony bufor Epi	2
Woda	9

Skład mieszaniny reakcyjnej dla 1 próbki (20 µl) mieszaniny kontrolnej:

Składnik	Objętość [µl]
DNA genomowe (25 ng/µl)	8
pUC19/ <i>SmaI</i> DNA niemetylowane (0,5 µg/ µl) lub pUC19/ <i>SmaI</i> DNA CpG metylowane (0,5 µg/ µl)	1
Epi <i>MspI</i> lub <i>HpaII</i>	1
10X stężony bufor Epi	2
Woda	8

Profil temperaturowo – czasowy

Temperatura [°C]	Czas [s]
37	3600
90	600

4.2.7. Ilościowa analiza PCR w czasie rzeczywistym

Do reakcji qPCR (4.1.7) używano po 5 ng cDNA lub DNA genomowego kontrolnego/trawionego enzymem *HpaII*. Dla każdej matrycy reakcję wykonywano w trzech powtórzeniach. Jako gen referencyjny, w przypadku analizy poziomu ekspresji genów, stosowano startery (4.1.7) komplementarne do transkryptu genu β -aktyny [102]. Do analizy poziomu metylacji jako matrycę referencyjną stosowano DNA genomowe nie poddane trawieniu enzymem restrykcyjnym *HpaII*. Względny poziom ekspresji/metylacji genu badanego obliczano zgodnie ze wzorem (1):

$$\Delta Ct(\text{próbka badana}) = Ct \text{ genu badanego} - Ct \text{ genu referencyjnego}$$

$$\Delta Ct(\text{próbka kontrolna}) = Ct \text{ genu badanego} - Ct \text{ genu referencyjnego}$$

Obliczanie względnego poziomu ekspresji/metylacji badanego genu w próbce nieznanego wzgledem kalibratora przeprowadzano według wzoru:

$$\text{Stosunek } \frac{\text{Gen}}{\text{Actb}} \text{ lub } \left(\frac{\text{DNA genomowe trawione enzymem HpaII}}{\text{DNA genomowe kontrolne (nietrawione)}} \right) = 2^{-\Delta Ct} \quad (1)$$

gdzie,

Ct– cykl progowy (Ct) po którym kinetyka reakcji wchodzi w fazę logarytmicznego wzrostu.

Obliczanie znormalizowanego względnego poziomu ekspresji badanego genu w próbie nieznanego względem kalibratora przeprowadzono według wzoru:

$$\text{Stosunek} \frac{\text{próbka badana}}{\text{próbka kontrolna}} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (2)$$

Specyficzność reakcji PCR potwierdzono przez analizę krzywych topnienia ampliconów po reakcji.

Istotność statystyczną wyników reakcji PCR w czasie rzeczywistym obliczono stosując niesparowany dwustronny test t-Studenta heteroskedastyczny (analiza dla trzech badanych próbek) lub nieparametryczny test Manna-Whitneya (więcej niż trzy badane próbki). Błędy pomiaru oszacowano przez wyznaczenie wartości odchylenia standardowego.

Skład mieszaniny reakcyjnej (na jedną próbkę - 20 µl) (4.1.7):

Składnik	Objętość [µl]
cDNA/DNA genomowe (5 ng)	2
FastStart Essential DNA Green Master, 2x stężony	10
Starter F (10 µM)	0,5
Starter R (10 µM)	0,5
Woda	7

Rodzaj używanych starterów w zależności od rodzaju ampliconu oraz temperatura ich przyłączenia:

Amplicon	Temperatura przyłączenia starterów [°C]
<i>tTbrg1</i>	57
<i>tAdipoq, tMmp9, tRbp1, tMamdc2, tWisp2, tUlbpl, tLbx1, gHoxa7, tHyal1, tIl1f8, tDapl1, Tert, tKrt17, tAkr1e1, gBarhl1</i>	60
<i>tFgf21, tGpc1, gSox6, gScrt1, tFn1, tKrt16, tBarhl1, gAkr1e1</i>	62
<i>gHoxa2</i>	64

Profil czasowo – temperaturowy reakcji:

Etap	Temperatura [°C]	Szybkość zmiany temperatury [°C/s]	Czas [s]	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	95	4	600	1
Denaturacja	95	5	20	45
Przyłączanie starterów	W zależności od amplikonu	4	20	
Wydłużanie	72	4	30	
Denaturacja	95	5	60	1
Analiza HRM Wstępny etap	60	4	20	1
Analiza HRM Końcowy etap	95	0,05	20	1
Chłodzenie	40	5	60	1

4.2.8. Amplifikacja fragmentu DNA przy zastosowaniu reakcji PCR

Skład mieszaniny reakcyjnej (na jedną próbkę – 50 µl) (4.1.8):

Składnik	Objętość [µl]
DNA genomowe (20 ng)	1,0
Starter F (10 µM)	1,0
Starter R (10 µM)	1,0
MgCl ₂ (50 mM)	2,0
dNTPs (2 mM każdego z dNTPs)	5,0
Bufor HotStart <i>Taq</i> 10x	5,0
Polimeraza DNA HotStart <i>Taq</i> (5 U/µl)	0,4
Woda	34,6

A) Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR dla starterów SX (4.1. 8 A) - określanie płci płodów myszy

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	94	120	1
Denaturacja	94	30	35
Przyłączanie starterów	57	30	
Wydłużanie	72	30	
Wydłużanie końcowe	72	300	1
Chłodzenie	4	∞	1

**B) Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR dla starterów *Tbgr1* i *Akr1e1*
(4.1.8 B) - sekwencjonowanie wodorosiarczynowe**

Amplikon	<i>Tbgr1</i>	<i>Akr1e1</i>
Starter F	bTbgr1-271-F	bAkr1e1-234-F
Starter R	bTbgr1-271-R	bAkr1e1-234-R
Temperatura przyłączenia starterów [°C]	52	56

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	95	300	1
Denaturacja	95	20	45
Przyłączenie starterów	w zależności od rodzaju amplikonu	20	
Wydłużanie	72	30	
Wydłużanie końcowe	72	360	1
Chłodzenie	4	∞	1

4.2.9. Konwersja wodorosiarczynowa DNA

Konwersję wodorosiarczynową (4.1.9) DNA genomowego w ilości 1 µg przeprowadzano zgodnie z protokołem załączonym do zestawu EZ DNA Methylation™ Kit (Zymo Research, nr kat. D5001).

4.2.10. Rozdział elektroforetyczny DNA i RNA w żelu agarozowym

Żel agarozowy o odpowiednim stężeniu (4.1.10) umieszczano w aparacie do elektroforezy agarozowej zawierającym bufor 1xTAE (4.1.12). Do studzienek żelu nanoszono po 5-50 µl próbki DNA lub RNA wymieszanej z buforem obciążającym 6X Green Gel Loading Dye (DNA Gdańsk). Następnie prowadzono rozdział elektroforetyczny przez około 50 minut przy napięciu 5-10 V na 1 cm długości żelu. Wynik rozdziału DNA lub RNA obserwowano w świetle lampy UV.

4.2.11. Izolacja DNA z prążka żelu agarozowego

Izolację DNA z prążków żelu agarozowego przeprowadzono z zastosowaniem zestawów Isolate PCR and Gel Kit firmy Bionline i postępowano zgodnie z procedurą dołączoną przez producenta do zestawu.

4.2.12. Mikromacierz metylacyjna

DNA genomowe izolowano (4.2.1) z tkanek skóry (4.1.1) pochodzących od płodów w wieku E15, E16, E18, E19 oraz dorosłych myszy szczepu C57BL/6J w wieku 3 miesięcy. Stężenie genomowego DNA mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop (4.2.3). DNA genomowe pochodzące od trzech samic (płeć płodów potwierdzona reakcją PCR (4.2.8 A)) z każdego dnia embrionalnego i myszy dorosłych zostało połączone w równych ilościach (po 2334 ng od każdej z trzech myszy) przed hybrydyzacją. Oznaczenia z wykorzystaniem mikromacierzy metylacyjnej firmy NimbleGen (Roche, Mouse DNA Methylation 3x720K CpG Island Plus RefSeq Promoter Arrays) zostały wykonane według standardowych protokołów dla metody NimbleGen przez mgr Annę Ronowicz w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

W celu otrzymania wyników obraz z mikromacierzy metylacyjnych został zeskanowany przy zastosowaniu skanera Scanner MS200 (Roche, NimbleGen) o rozdzielczości 2 μm . Wstępna obróbka danych w programie DEVA v. 1.0.2 (4.2.17) polegała na wyznaczeniu wartości \log_2 stosunku sygnału pochodzącego od DNA immunoprecypitowanego do sygnału pochodzącego od wyjściowego DNA. Średnie wartości \log_2 zostały policzone i znormalizowane w obrębie slajdu przy zastosowaniu dwuwagowej funkcji Tukeya. W celu wyznaczenia obszarów o różnym poziomie metylacji, zostały wyodrębnione sondy, dla których wartość piku metylacji, wyrażonego jako wynik testu Kołmogorowa-Smirnowa (KS), określana jako wartość P (ang. P-score), wynosiła co najmniej 2,0 lub więcej w jednej próbce, a jednocześnie była niższa lub równa 1,0 w porównywanej próbce. Jako region genu różnie metylowany został uznany obszar dla którego trzy kolejne sondy wykazywały różnice w poziomie metylacji. W programie DEVA v. 1.0.2. (4.2.17) zmapowano obszary różnie metylowane w zakresie 5000 pz powyżej i 1000 pz poniżej od miejsca startu transkrypcji genów, pierwotnych transkryptów, wysp CpG i innych regionów metylacji.

4.2.13. Mikromacierz ekspresyjna

Dwuniciowe cDNA (ds cDNA) (4.2.4) zostało zsyntezowane na matrycy RNA pochodzącego z tkanek wątroby, śledziony, serca, małżowiny usznej oraz szpiku kostnego szczepów myszy MRL/MpJ, C57BL/6J i BALB/c oraz skóry grzbietowej płodów i dorosłych myszy szczepu C57BL/6J (4.1.1). Stężenie i jakość ds cDNA po

syntezie (4.2.4) i oczyszczaniu (4.2.5) sprawdzano za pomocą spektrofotometru NanoDrop oraz Bioanalyzera Agilent 2100 (4.2.3). Oznaczenia z wykorzystaniem mikromacierzy ekspresyjnej firmy NimbleGen (Roche, NimbleGen mouse gene expression 12x135K array) zostały wykonane według standardowych protokołów dla metody NimbleGen przez mgr Annę Ronowicz w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Surowe dane zostały następnie poddane normalizacji w programie DEVA v.1.0.2 (Roche) (4.2.17) z wykorzystaniem algorytmu RMA (ang. *Robust Multi-chip Average*). Otrzymane wyniki były następnie sortowane i analizowane w arkuszu kalkulacyjnym Excel. Do analizy wyselekcjonowano transkrypty wykazujące co najmniej dwukrotną różnicę w poziomie ekspresji między próbką badaną a kontrolną.

4.2.14. Sekwencjonowanie drugiej generacji (NGS)

Analiza NGS została wykonana dla RNA wyizolowanego z pojedynczych serc ośmiotygodniowych myszy MRL/MpJ, C57BL/6J oraz BALB/c (4.1.1). Stężenie RNA mierzono przy pomocy spektrofotometru NanoDrop (4.2.3). Ilość RNA wymagana do przeprowadzenia sekwencjonowania wynosiła 1,5 µg. Sekwencjonowanie zostało wykonane przy zastosowaniu platformy HiSeq Illumina Sequencing w ramach komercyjnej usługi wykonanej w Genomics Core of Heflin Center for Genomic Science of University of Alabama (Birmingham, Stany Zjednoczone). Analizę odczytów sekwencjonowania wykonano wykorzystując mapowanie TopHat zakładając średnią wewnętrzną odległość 150 pz między insertami, a następnie analizę CuffLink umożliwiającą określenie różnic w poziomie ekspresji transkryptów pomiędzy badanymi szczepami myszy. Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania udostępnionego przez serwer UseGalaxy (<https://usegalaxy.org>).

4.2.15. Stężenie retinolu w pełnej krwi myszy

Stężenie retinolu zostało zmierzone w pełnej krwi, w próbkach o objętości 0.3-0.5 ml, pobranych na EDTA od sześciu samic myszy MRL/MpJ oraz sześciu samic myszy C57BL/6J w wieku 8 tygodni (4.1.1). Próbki krwi zostały zmieszane z 0.2 ml siarczanu magnezu i chlorku sodu, a następnie poddane podwójnej ekstrakcji z mieszaniną heksan : chlorek metylenu w stosunku 3:2 (v/v). W kolejnym etapie

oddzielono i odparowano fazę organiczną. Tak przygotowaną próbkę rozpuszczono w 1 ml metanolu. Pomiar stężenia retinolu wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w układzie faz odwróconych stosując system pomp 600 (Waters), kolumnę HPLC X-Terra RP18 5 μ , 150x4.6 mm (Waters) z detektorem UV-DAD 2996. Pomiary wykonywano przy długości fali 320 nm. Pomiar stężenia retinolu został wykonany w ramach usługi komercyjnej we Wrocławskim Parku Technologicznym przez mgr inż. Andrzeja Kwaśnicę.

4.2.16. Sekwencjonowanie DNA

Oczyszczone produkty PCR (4.2.11) zostały poddane sekwencjonowaniu przy użyciu sekwencjonowania cyklicznego z rozdziałem kapilarnym przy użyciu aparatu do sekwencjonowania Applied Biosystem ABI 3730XL/ABI3700 (Genomed, Polska).

4.2.17. Programy komputerowe i bazy danych

Startery do reakcji PCR zaprojektowano przy pomocy programu Vector NTI (Invitrogen) lub programu LightCycler Probe 2 (Roche). Specyficzność starterów weryfikowano przy użyciu programu Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

Digitalizację, przetworzenie, normalizację wyników uzyskanych przy zastosowaniu mikromacierzy metylacyjnych i ekspresyjnych przeprowadzono w programie DEVA 1.0.2 lub NimbleScan (NimbleGen, Roche).

Analizę ontologiczną genów wykonano za pomocą programu DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) [104, 105].

Sekwencje poszczególnych genów lub transkryptów pozyskiwano z baz danych GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), Ensembl (www.ensembl.org) oraz UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>). Polimorfizmy nukleotydowe sprawdzano w bazie Sanger (<http://www.sanger.ac.uk>).

Mapy cieplne oraz wykresy rozrzutu sporządzono przy zastosowaniu programu DNASTAR Lasergene 12 (DNASTAR, Inc; Madison, Stany Zjednoczone).

Analizę wyników sekwencjonowania kapilarnego przeprowadzono w programie FinchTV (Geospiza, Inc., Stany Zjednoczone) oraz ContigExpress (VectorNTI, Invitrogen).

Geny o potwierdzonym wpływie na proces gojenia ran skóry sprawdzono w bazie "RESOLVE - Wound Healing and Fibrosis-related Genes" (<http://resolve-whfg.appspot.com/>).

5. Wyniki

5.1. Globalne profile ekspresji genów myszy MRL/MpJ oraz szczepów kontrolnych myszy C57BL/6J oraz BALB/c

Przeprowadzone badania miały na celu analizę globalnych profili ekspresji w różnych nieuszkodzonych tkankach myszy MRL/MpJ (małżowina uszna, serce, wątroba, śledziona i szpik kostny). Kluczowym etapem było wyznaczenie różnic w profilach ekspresji między szczepem myszy wykazującym zdolność do bezbliznowego gojenia ran w porównaniu do dwóch, niespokrewnionych blisko, szczepów kontrolnych (C57BL/6J oraz BALB/c).

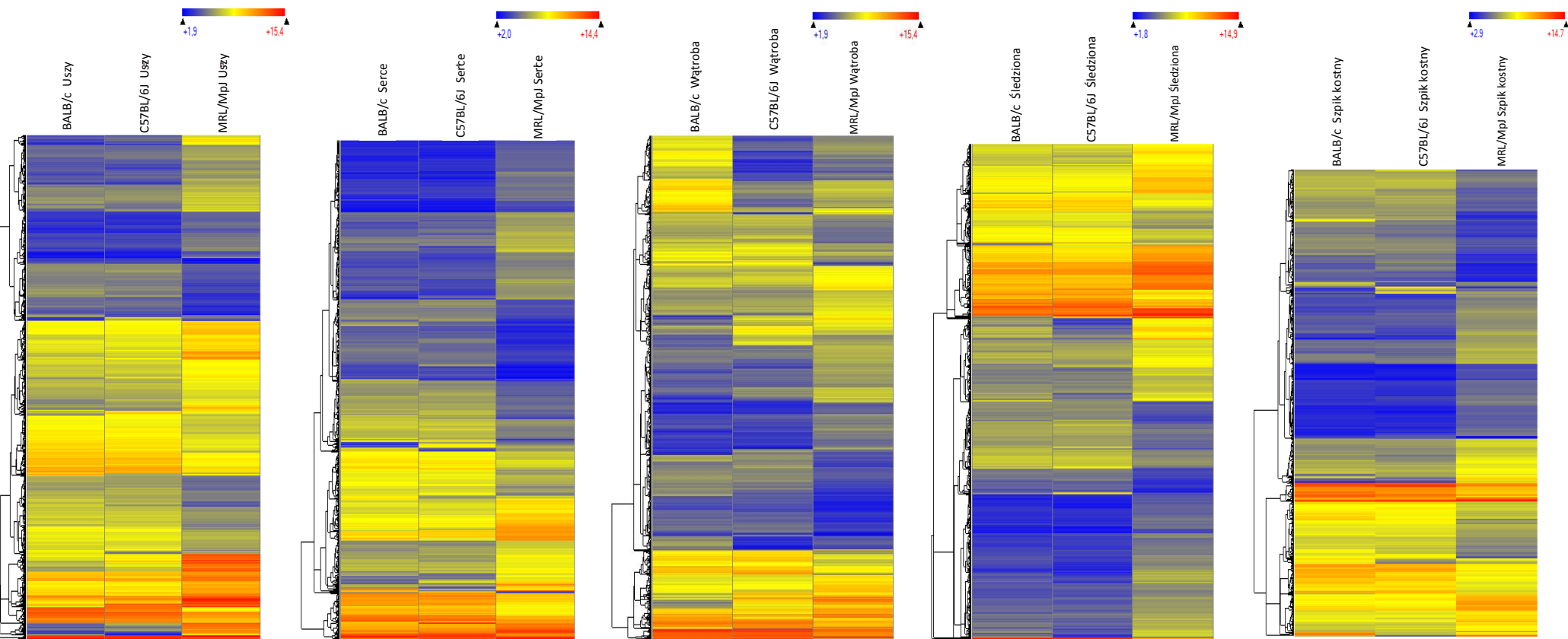
5.1.1. Analiza wyników otrzymanych przy zastosowaniu mikromacierzy ekspresyjnej

Analiza poziomu ekspresji wszystkich genów myszy MRL/MpJ i dwóch szczepów kontrolnych C57BL/6J oraz BALB/c została wykonana przy zastosowaniu mikromacierzy ekspresyjnej firmy NimbleGen Roche (4.2.13). Ta platforma pozwala na zbadanie poziomu ekspresji 44 170 transkryptów odpowiadających 24 204 genom. Analiza transkryptomyczna została wykonana dla pięciu tkanek ośmiotygodniowych myszy (4.1.1): serca, małżowiny usznej, śledziony, wątroby i szpiku kostnego. Tkanka serca została wybrana do badania ze względu na ograniczone zdolności regeneracyjne tego narządu u ssaków, przy istnieniu przesłanek o występowaniu podwyższonej odpowiedzi regeneracyjnej po uszkodzeniu serca u myszy MRL/MpJ [13-16]. W małżowinie usznej natomiast, po raz pierwszy zaobserwowano bezbliznowe zamykanie wyciętych otworów, a badania te były wielokrotnie powtarzane i potwierdzane [1, 9, 11, 39]. Tkanka wątroby została wybrana do badań transkryptomicznych, gdyż omawiany organ posiada naturalnie wysokie zdolności do regeneracji. Ponadto, do badań użyto tkankę śledziony i szpiku kostnego ze względu na ich istotną rolę w układzie immunologicznym, którego działanie jest kluczowe w procesie gojenia ran.

Oprócz szczepu C57BL/6J, w badaniach został zastosowany także, dla porównania, szczep myszy BALB/c, który nie jest spokrewniony z myszą MRL/MpJ oraz nie wykazuje podwyższonych zdolności regeneracyjnych, a co więcej, w wypadku tego właśnie szczepu stwierdzono najmniej efektywne zarastanie otworów wyciętych w małżowinie usznej [10].

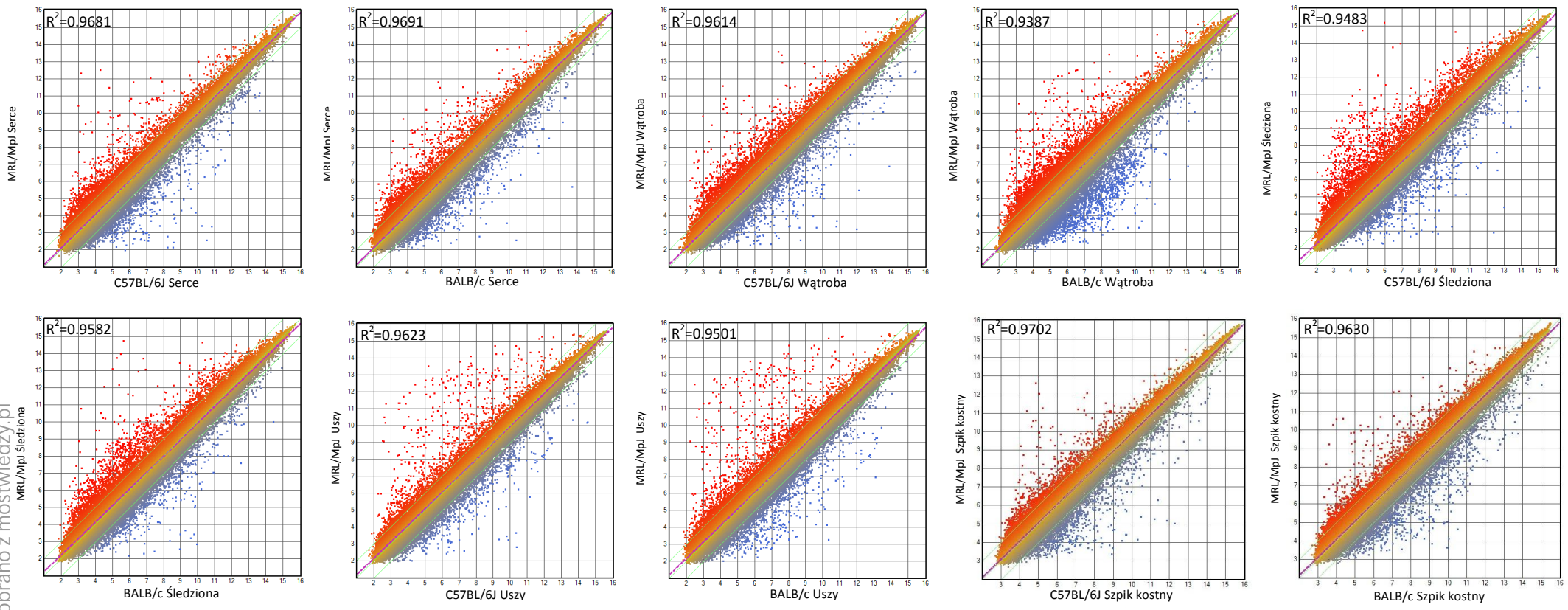
Każdy z uzyskanych genomowych profili transkrypcji reprezentuje RNA od trzech osobników przygotowane z całych sproszkowanych narządów.

W analizie skupiono się na genach odpowiadających transkryptom wykazującym co najmniej dwukrotną różnicę w poziomie ekspresji między MRL/MpJ a obydwoma szczepami kontrolnymi. Na Rys. 3 pokazana jest ilość genów wykazujących różnicę w poziomie ekspresji między myszą MRL/MpJ a szczepami kontrolnymi w pięciu badanych tkankach. Wykresy rozrzutu przedstawiające geny o odmiennym poziomie ekspresji oraz korelacje liniowe (R^2) dla analizowanych tkanek pokazano na Rys. 4. Im bardziej zbliżone są profile ekspresji genów w danej tkance tym bliższa 1 jest wartość R^2 .



Rys. 3. Mapy ciepłone prezentujące różnice w poziomie ekspresji genów między myszą MRL/MpJ i kontrolnymi szczepami C57BL/6J oraz BALB/c w małżowinie usznej, sercu, wątrobie, śledzionie i szpiku kostnym.

Geny są pogrupowane stosownie do poziomu ekspresji, co pokazane jest za pomocą dendrogramów po lewej stronie, a wartości (log₂) ze znormalizowanego sygnału ekspresji genów odpowiadają skali umieszczonej powyżej każdej z pięciu map.



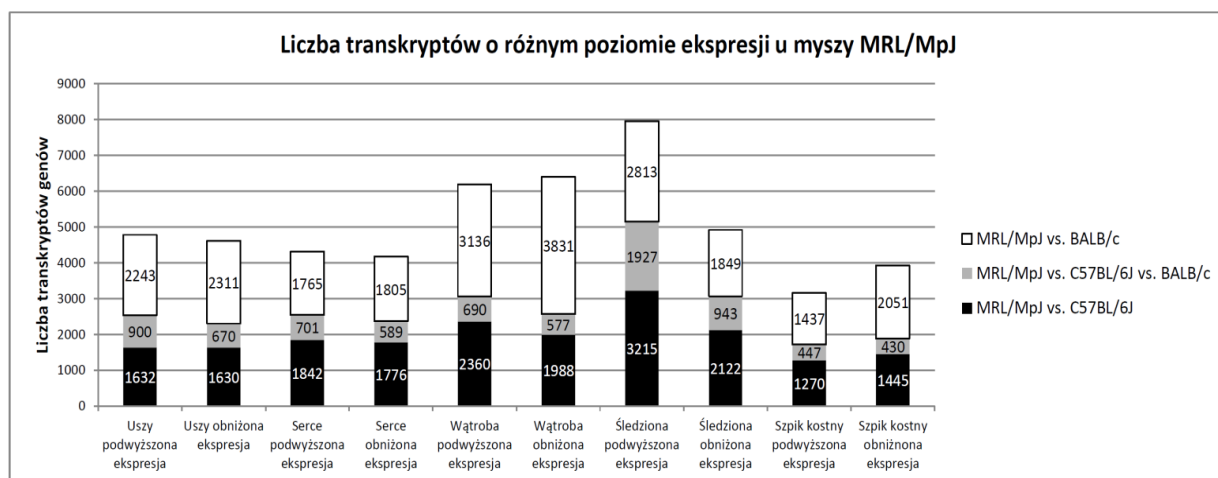
Rys. 4. Różnice w poziomie ekspresji genów pomiędzy poszczególnymi szczepami myszy i tkankami przedstawione w postaci wykresów rozrzutu.

R^2 - korelacja liniowa.



5.1.2. Liczba genów wykazujących różnice w poziomie ekspresji

Liczba transkryptów różnie eksymowanych pomiędzy szczepem myszy MRL/MpJ a szczepami kontrolnymi jest przedstawiona na Rys. 5.



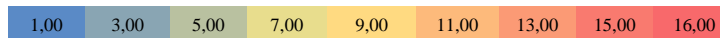
Rys. 5. Liczby transkryptów wykazujących co najmniej dwukrotne różnice w poziomie ekspresji w analizowanych tkankach szczepów myszy MRL/MpJ, C57BL/6J oraz BALB/c.

Spośród transkryptów wykazujących co najmniej dwukrotne różnice ekspresji, w poszczególnych tkankach pomiędzy szczepem myszy MRL/MpJ a szczepami kontrolnymi grupa 28 transkryptów jest wspólna dla pięciu badanych tkanek (Tab. 3), z czego jedynie cztery mają podwyższoną ekspresję u myszy MRL/MpJ.

Wśród genów o obniżonej ekspresji możemy między innymi wyróżnić gen *Cradd* odpowiadający za proteolizę i apoptozę komórki, gen *Nsun3*, który koduje białko biorące udział w szlaku metylacji kwasów nukleinowych oraz aldo-keto reduktazę (*Akr1e1*). Jednak większość transkryptów wykazujących odmienny poziom ekspresji w pięciu analizowanych tkankach myszy MRL/MpJ koduje białka o niepoznanej dotąd funkcji lub odpowiada niescharakteryzowanym niekodującym RNA (lncRNA). Do tej ostatniej grupy zaliczyć można: *1110019D14Rik*, *1810058I24Rik*, *5330426P16Rik*.

Tab. 3. Transkrypty o co najmniej dwukrotnie większym lub mniejszym poziomie ekspresji we wszystkich analizowanych tkankach myszy MRL/MpJ w porównaniu do szczepów kontrolnych C57BL/6J oraz BALB/c.

Poziom ekspresji wyrażony jest log₂ ze znormalizowanego sygnału dla danego transkryptu. *Pełne nazwy genów w tej i kolejnych tabelach podano w wersji angielskiej, ponieważ nie wszystkie z tych genów mają ustalone polskie nazwy w obowiązującej terminologii naukowej.



Numer transkryptu (wg NCBI)	Symbol genu	BALB/c					C57BL/6J					MRL/MpJ					Pełna nazwa genu
		Uszy	Serce	Wątroba	Śledziona	Szpik kostny	Uszy	Serce	Wątroba	Śledziona	Szpik kostny	Uszy	Serce	Wątroba	Śledziona	Szpik kostny	
Podwyższona ekspresja																	
AK166453	AA465934	5,51	5,81	5,57	6,20	7,38	5,03	6,23	5,89	6,02	7,61	10,34	11,81	10,32	11,54	12,08	Mammary gland RCB-0527 Jyg-MC(B)
AK170885	<i>Akna</i>	4,39	5,03	4,68	5,47	5,31	4,95	4,52	4,82	4,51	5,05	6,30	6,11	6,88	10,35	9,95	AT-hook transcription factor
XM_001477212	<i>Gm3556</i>	7,04	6,49	7,08	8,19	7,73	7,19	5,68	7,50	8,43	7,63	8,96	7,94	8,84	9,58	8,88	Hypothetical protein LOC100041870
BC044745	N/A	5,43	6,37	6,15	7,65	7,05	5,47	5,42	5,23	5,58	5,06	10,30	9,87	9,94	12,08	12,06	cDNA clone IMAGE:5149239
Obniżona ekspresja																	
AK003812	<i>1110019D14Rik</i>	6,59	8,24	8,07	6,68	6,86	6,39	8,23	8,18	6,92	7,15	3,85	2,79	5,57	5,06	5,04	RIKEN cDNA 1110019D14 gene
BC096621	<i>1700029I01Rik</i>	9,09	9,00	8,32	9,55	10,36	8,49	8,46	7,82	9,29	10,54	4,65	4,81	3,83	6,16	7,02	RIKEN cDNA 1700029I01 gene
AK158055	<i>1810058I24Rik</i>	9,98	10,48	10,97	9,72	10,47	10,07	10,63	10,99	9,53	10,98	7,61	8,71	7,95	8,07	9,00	RIKEN cDNA 1810058I24 gene
AK163429	<i>4933439C10Rik</i>	9,91	8,99	9,59	10,36	11,06	10,54	8,96	10,19	10,47	11,00	8,35	7,31	8,53	9,28	8,49	Adult male corpora quadrigemina cDNA
XM_992800	<i>5330426P16Rik</i>	8,55	9,49	6,13	9,35	10,01	7,86	9,22	6,94	8,87	9,43	5,49	6,95	4,44	5,93	6,27	RIKEN cDNA 5330426P16 gene
AK151508	<i>5330426P16Rik</i>	9,19	10,16	7,87	10,42	10,21	8,53	9,92	7,87	9,94	9,67	6,77	7,47	5,71	7,65	7,19	Bone marrow macrophage
BC099946	<i>9930104L06Rik</i>	9,58	9,60	9,44	9,55	9,57	9,48	9,48	9,27	9,58	9,77	7,80	7,83	7,35	7,47	7,11	RIKEN cDNA 9930104L06 gene
BC012692	<i>Akr1el</i>	9,43	10,24	11,88	9,06	8,73	9,85	10,93	12,12	9,06	9,10	6,96	8,96	9,39	6,11	6,71	Aldo-keto reductase family 1, member E1



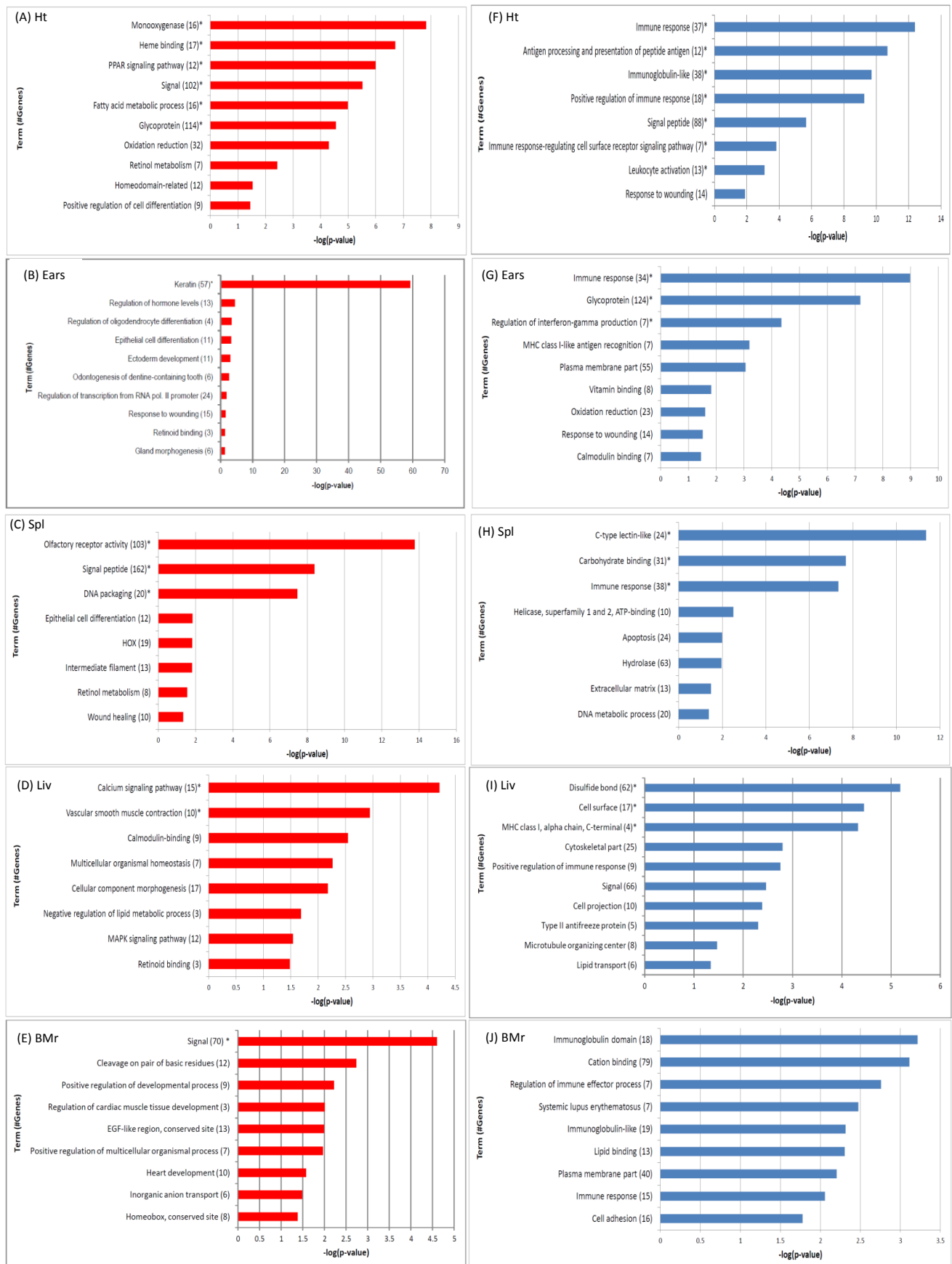
BC067409	<i>C4b</i>	12,91	11,13	15,01	12,42	11,82	12,91	10,54	14,80	12,49	11,18	11,15	9,46	13,67	10,73	9,55	Complement component 4B (Chido blood group)
BC039141	<i>C4b</i>	12,96	11,25	14,82	12,82	10,98	12,96	10,70	14,70	12,75	10,48	11,86	9,65	13,65	11,37	9,33	Complement component 4B (Chido blood group)
AB236331	<i>Ceacam1</i>	8,73	10,77	13,82	11,09	13,25	7,94	11,10	13,78	11,37	12,72	5,98	9,75	12,33	8,64	10,98	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
BC005608	<i>Cradd</i>	8,56	9,07	9,72	7,08	6,82	8,66	9,50	10,24	7,45	7,13	5,49	6,68	7,58	3,87	5,22	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
AK081862	<i>Dusp12</i>	7,68	6,53	8,77	6,82	7,10	7,72	6,27	8,25	7,27	7,23	4,84	4,04	4,26	5,24	5,44	Dual specificity phosphatase 12
AK160923	<i>Fam173b</i>	6,33	7,41	6,16	6,11	7,67	5,89	7,65	6,67	5,95	7,74	4,60	5,75	4,39	4,38	5,89	Family with sequence similarity 173, member B
XM_001476645	<i>Gm10060</i>	8,67	8,05	8,41	8,94	10,11	8,35	7,72	8,38	8,21	9,82	7,26	6,22	7,14	7,18	8,70	Similar to p47 protein (LOC100041567)
NM_001037925	<i>LOC625360</i>	4,37	5,24	4,89	10,12	9,08	4,33	5,73	5,03	9,94	9,04	3,05	3,02	3,37	6,40	5,31	Similar to 2-cell-stage, variable group, member 3
BC022696	<i>N/A</i>	6,70	6,48	7,93	7,47	6,63	6,60	6,14	7,95	7,81	6,79	5,49	4,88	6,06	5,29	3,91	Clone IMAGE:4459415
AK202070	<i>N/A</i>	8,16	7,73	5,52	8,07	7,52	8,59	7,73	6,90	8,37	7,57	5,27	5,58	4,47	5,99	6,11	cDNA, clone:Y1G0140E17
AK153942	<i>Nsun3</i>	10,13	9,76	10,63	9,51	9,75	10,10	9,97	10,84	9,63	9,98	7,72	8,44	9,24	7,52	7,93	NOL1/NOP2/Sun domain family member 3
BC008571	<i>Slc25a17</i>	11,19	9,60	10,92	9,64	10,07	11,25	9,74	11,56	9,64	10,35	8,41	7,98	8,15	5,71	8,50	Solute carrier family 25, member 17
BC061022	<i>Stard6</i>	6,12	7,69	5,53	7,65	7,28	6,36	7,59	5,38	7,17	7,16	3,25	4,11	3,69	4,15	4,37	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 6
AK170496	<i>Tmem18</i>	10,07	9,73	10,66	9,98	10,14	9,77	9,60	10,10	9,14	9,13	5,20	5,54	5,01	2,85	5,60	NOD-derived CD11c +ve dendritic cells
NM_029975	<i>Ulbp1</i>	7,22	8,29	4,69	9,24	10,79	6,66	8,18	6,29	9,18	10,63	5,03	6,86	2,80	5,49	7,64	UL16 binding protein 1
BC066107	<i>Zfp870</i>	6,91	7,98	7,18	7,02	6,47	6,45	8,22	7,03	6,94	6,26	4,03	6,33	5,79	5,77	4,06	zinc finger protein 870



5.1.3. Analiza ontologiczna w programie DAVID dla wyników uzyskanych przy zastosowaniu mikromacierzy ekspresyjnej

Program DAVID (4.2.17) umożliwia wykonanie analizy ontologicznej polegającej na przyporządkowaniu genów do danej grupy zależnie od ich roli biologicznej oraz statystycznej oceny nadreprezentacji genów należących do poszczególnych kategorii. Taką analizę wykonano dla genów wykazujących co najmniej dwukrotne różnice w poziomie ekspresji między szczepem myszy MRL/MpJ a szczepami C57BL/6J i BALB/c. Grupy genów wykazujących nadreprezentację wśród genów o podwyższonej i obniżonej ekspresji u myszy MRL/MpJ pokazano na Rys. 6.

Na diagramie przedstawiono wyłącznie kategorie ontologiczne związane z genami, dla których wyznaczono istotną statystycznie (wartość $p < 0,05$) nadreprezentację w obrębie transkryptów wykazujących różnice. Do oceny istotności statystycznej użyto zmodyfikowanego dokładnego testu Fishera. Spośród kilkudziesięciu kategorii ontologicznych, dla których wykazano istotność statystyczną na wykresach przedstawiono tylko część. W wyborze kierowano się tzw. wartością wzbogacającą (ang. *enrichment score*), który plasuje znaczenie biologiczne grupy genów w oparciu o ogólne wyniki EASE (zmodyfikowany dokładny test Fishera) i pokazuje wartość wzbogacenia (nadreprezentacji) danej grupy genów w stosunku do wszystkich genów użytych do analizy. Dodatkowo o wyborze przedstawionych na Rys. 6 kategorii ontologicznych decydowała liczba genów w danej grupie lub ich potencjalne znaczenie w regeneracji lub gojeniu ran.



Rys. 6. Klaster genów wykazujących nadreprezentację wśród transkryptów wykazujących co najmniej dwukrotne różnice w ekspresji między myszą MRL/MpJ a szczepami kontrolnymi.

Po lewej stronie pokazano wykresy reprezentujące geny o ekspresji wyższej, po prawej, niższej u myszy MRL/MpJ w poszczególnych tkankach: (A, F) Ht - serca, (B, G) Ears - uszu, (C, H) Spl - śledziony, (D, I) Liv - wątroby, (E, J) BMr - szpiku kostnego. Wszystkie kategorie były istotne statystycznie (wartość $p < 0,05$). Znakiem „*” oznaczono klaster genów istotne po korekcie Benjaminiiego. W nawiasach obok każdej kategorii funkcyjnej podano liczbę genów.

Geny związane z odpowiedzią immunologiczną

Pośród genów o obniżonym poziomie ekspresji (Rys. 6) u myszy MRL/MpJ, w porównaniu do dwóch kontrolnych szczepów myszy, we wszystkich pięciu analizowanych tkankach, występują geny kodujące czynniki związane z odpowiedzią na zranienia i układem immunologicznym (Tab. 4).

Tab. 4. Geny kodujące czynniki odpowiedzi immunologicznej wykazujące obniżony poziom ekspresji u myszy MRL/MpJ w porównaniu do szczepów kontrolnych C57BL/6J oraz BALB/c.

Wymienione klaster genów wykazywały istotność statystyczną (wartość $p < 0.05$). Geny związane z toczniem rumieniowatym układowym są zaznaczone kolorem czerwonym.

Małżowina uszna	Serce	Wątroba	Śledziona	Szpik kostny
<i>immune response</i> GO:0006955	<i>immune response</i> GO:0006955	<i>positive regulation of immune response</i> GO:0050778	<i>immune response</i> GO:0006955	<i>immune response</i> GO:0006955
<i>C4b, Ulbp1</i>				
<i>C4a</i> , Azgp1, Cd180, Cd55, Cfhl, Clec4n, Colec12, Dhx58, Exo1, Fas, Fcgr2b , Gbp2, Gbp4, Gbp5, Gbp6, H2-B1, H2-D1, H2-K1, H2-M3, H2-Q6, Hc , Ifih1, Il7, Oas1a, Oas1g, Oasl1, Oasl2, Pou2f2, Ticam2, Tlr3, Tlr7, Tlr8, Tnfsf13b	Btla, C1qb , C9 , Cd300c, Cd74, Cd79a, Cd79b, Ciita, Clec5a, Cr2, Dhx58, Faim3, Fcaml, Fcgr2b , Fcgr3 , Gbp4, Gbp5, H2-Aa , H2-Ab1 , H2-D1, H2-DMa , H2-DMb1 , H2-DMb2 , H2-Eb1 , H2-gs10, H2-K1, H2-Q6, Igh , Ly86, Ptprc, Samhd1, Snap91, Tlr7, Tlr8, Tnfrsf13c	C4a , Cd19, Fcgr2a, H2-K1, H2-Q6, Klrblc, Masp2, Tnfrsf13c	C4a , Ccl24, Cd55, Ddx58, Dhx58, Eda, Exo1, Faim3, Fas, FasL, Fcaml, Fcgr2b , Gbp5, Gm10169, H2-Aa , H2-D1, H2-M5, H2-Q7, Ifih1, Igh , Il18rap, Il1rn, Il2, Mx1, Mx2, Oas1a, Oas1g, Oas2, Oas3, Oasl1, Oasl2, Ptprc, Swap70, Themis, Ticam2, Tnfsf15, <i>Trat1</i>	C4a , Dhx58, Fcaml, Fcgr2b , Gbp5, H2-Aa , H2-Q6, Ifih1, Igh , Skap1, Sla2, Swap70, Ticam2, Tnfsf4

Keratyny

W małżowinie usznej znacząca liczba genów o podwyższonym poziomie ekspresji (57) u myszy MRL/MpJ była związana z keratynami (geny *Krt*) (Tab. 5), czemu odpowiada też wyjątkowo wysoki poziom istotności statystycznej (wartość $p=5.51 \cdot 10^{-60}$). Keratyny są grupą białek, które tworzą ramy konstrukcyjne komórek nabłonka wyścielejających powierzchnię i jamy ciała. Najczęściej keratyny budują tkankę włosów, skóry i paznokci. Podwyższony poziom ekspresji niektórych genów *Krt* został zaobserwowany w trakcie procesu regeneracji fragmentów palców po ich amputacji u myszy MRL/MpJ w porównaniu do kontrolnego szczepu myszy C57BL/6J [106] oraz w trakcie procesu bezbliznowego gojenia otworów wyciętych w małżowinie usznej u myszy MRL/MpJ (*Krt* 1-14) [31].

Tab. 5. Geny keratyn i związane z keratynami wykazujące co najmniej dwukrotnie podwyższony poziom ekspresji u myszy MRL/MpJ w porównaniu do szczepów kontrolnych C57BL/6J oraz BALB/c.

Małżowina uszna
SP_PIR_KEYWORDS Keratin
<i>1110025L11Rik, 5430421N21Rik, AY026312, Gm10228, Gm10229, Gm11554, Gm11563, Gm11564, Gm11567, Gm11595, Gm11937, Gm11938, Gm2692, Gm7288, Gm7574, Krt18, Krt25, Krt26, Krt28, Krt32, Krt33a, Krt33b, Krt34, Krt35, Krt36, Krt40, Krt71, Krt72, Krt73, Krt81, Krt82, Krt84, Krt85, Krtap10-4, Krtap12-1, Krtap1-3, Krtap13-1, Krtap14, Krtap15, Krtap16-1, Krtap16-10, Krtap16-4, Krtap16-5, Krtap16-8, Krtap17-1, Krtap2-4, Krtap26-1, Krtap3-1, Krtap3-2, Krtap3-3, Krtap4-16, Krtap4-2, Krtap4-6, Krtap4-7, Krtap4-8, Krtap5-1, Krtap5-4, Krtap5-5, Krtap6-1, Krtap7-1, Krtap8-1, Krtap9-1, Krtap9-3, Krtap9-5</i>

Szlak metabolizmu retinolu i wiązania retinoidów

W tkankach serca, śledziony, wątroby i uszu podwyższonej ekspresji ulegają geny związane z metabolizmem retinolu lub wiązaniem retinoidów. W tkance serca i śledziony (Tab. 6A) są to głównie geny należące do rodziny cytochromu P450 odpowiadające za utlenianie nadmiernych ilości kwasu retinowego i jego pochodnych w organizmach zwierząt. W tkankach uszu i wątroby (Tab. 6B) podwyższonej ekspresji ulegają geny odpowiedzialne za wiązanie retinoidów (*Rbp7*, *Rbp1* i *Ptgds*). Geny kodujące białka wiążące retinol są wyżej ekspresjonowane we wszystkich badanych tkankach myszy MRL/MpJ (Tab. 7). Gen *Rbp7* ulega podwyższonej ekspresji w tkankach serca, wątroby i uszu, natomiast gen *Rbp1* - w tkankach śledziony, szpiku kostnego i uszu.

Funkcja wymienionych powyżej genów w szlaku przekształcania retinolu i kwasu retinowego została dobrze scharakteryzowana. Syntetaza prostaglandyny D2 (*Ptgds*) wiąże all-*trans*- i 9-*cis*- kwas retinowy oraz *trans*- i 13-*cis*-retinal z takim samym powinowactwem jak przenośniki retinoidów [107]. Białko 1 wiążące komórkowy retinol (*Rbp1*, zwane *CRBP1*) odgrywa istotną rolę w konwersji retinolu do estrów retinyli, które są przechowywane w wątrobie [108]. W tkance wątroby myszy MRL/MpJ podwyższonej ekspresji ulega także gen *Apod*, którego ekspresja jest indukowana przez kwas retinowy, a który jest odpowiedzialny między innymi za procesy nowotworzenia [109]. Geny *Cyp4* należące do rodziny cytochromu P450, kodują enzymy odpowiedzialne za metabolizm związków aktywnych biologicznie, takich jak hormony steroidowe, kwasy żółciowe czy witaminy A i D [110]. Również geny należące do grupy *Cyp3a* mogą uczestniczyć w szlaku metabolizmu form all-*trans* kwasu retinowego [111].

Tab. 6. Geny metabolizmu retinolu i wiązania retinoidów wykazujące co najmniej dwukrotne różnice w ekspresji między myszą MRL/MpJ a szczepami kontrolnymi C57BL/6J oraz BALB/c.

¹⁾podwyższona ekspresja również w tkance serca myszy MRL/MpJ;

²⁾ podwyższona ekspresja również w tkance szpiku kostnego i śledziony myszy MRL/MpJ.

A) mmu00830:Retinol metabolism/ GO:0046914-transition metal ion binding/ oxidoreductase (SPIR_KEYWORDS)	
Serce	Śledziona
<i>Cyp2a4, Cyp2a21-ps, Cyp4a12a, Cyp4a31</i>	
<i>Adh7, Cyp2b10, Cyp4a12b, Cyp4a10 Cyp4a32</i>	<i>Cyp2c50, Cyp2c69, Cyp3a11, Cyp3a41b</i>
B) GO:0005501-retinoid binding	
Wątroba	Małżowina uszna
<i>Ptgds, Rbp7¹⁾</i>	
<i>Apod</i>	<i>Rbp1²⁾</i>

Tab. 7. Podwyższona ekspresja transkryptów genów *Rbp1* i *Rbp7* w poszczególnych tkankach myszy MRL/MpJ.

Ekspresja co najmniej dwukrotnie podniesiona u myszy MRL/MpJ względem C57BL/6J i BALB/c oznaczona jest czarnym polem.

Numer transkryptu (wg NCBI)	Symbol genu	Małżowina uszna	Serce	Wątroba	Śledziona	Szpik kostny
BC091751	<i>Rbp1</i>					
BC018254	<i>Rbp1</i>					
BC028432	<i>Rbp7</i>					

Geny homeotyczne

Geny homeotyczne były nadreprezentowane wśród transkryptów wykazujących podwyższony poziom ekspresji w tkankach serca, śledziony i szpiku kostnego ośmiotygodniowych myszy MRL/MpJ (Tab. 8). Natomiast w małżowinie usznej również znaleziono geny homeotyczne o podwyższonym poziomie ekspresji u myszy MRL/MpJ, jednak nie były one nadreprezentowane.

Pośród genów należących do tej grupy funkcyjnej możemy wyróżnić gen *Meis2*, który wraz z genem *Meis1* jest aktywowany przez kwas retinowy i bierze udział w tworzeniu osi ciała, w trakcie rozwoju organizmu [112]. Białka MEIS1 oraz PBX1 oddziałują z białkami homeotycznymi [113]. Ponadto w sercu myszy MRL/MpJ podwyższonej ekspresji ulega gen *Nanog*, będący markerem pluripotencji.

Tab. 8. Geny homeotyczne wykazujące co najmniej dwukrotnie podwyższoną ekspresję u myszy MRL/MpJ w porównaniu ze szczepami kontrolnymi.

Śledziona ¹⁾	Serce ¹⁾	Szpik kostny ¹⁾	Małżowina uszna ²⁾
SM00389:HOX	IPR012287:Homeodo main-related	IPR017970: Homeobox, conserved site	Hox
<i>Meis2, Rhox2e</i>			
<i>4933403003Rik, Dux, Crxos1, Gm3977, Gm3984, Gm3980, Gm3987, Gm3994, Gm3981, Gm4023, Gm4745, Hoxc6, Isl1, Lbx1, Obox2, Obox3, Gm8053, Gm5889, Gm8040, Obox5, Otx2, Rhox2b, Rhox2c, Rhox2a, Rhox2f, Rhox2g, Rhox3g, Rhox3h, Rhox4a, Rhox4d</i>	<i>Arx, Cyp4a10, Cyp4a32, Cyp4a31, Gm8743, Gsc2, Hoxc5, Nanog, Pax6, Pbx1, Pou6f2, Sebox</i>	<i>Crx, Gm7148, Gsc2, Hoxd10, Irx1, Irx4, Nkx2-6, Pbx4</i>	<i>Dlx3, Dlx2, Dlx1, Hnf1b, Meis2, Lhx4, Cux1, Pou1f1, Gm12605, Rhox3g, Pbx4</i>

¹⁾ geny homeotyczne o podwyższonym poziomie ekspresji u myszy MRL/MpJ wykazujące nadreprezentację pośród innych genów (kategorie wskazane przez program DAVID)

²⁾ geny homeotyczne o podwyższonym poziomie ekspresji u myszy MRL/MpJ w tkance uszu, nie wykazujące nadreprezentacji pośród innych genów

Geny odpowiedzialne za gojenie ran (kategoria „wound healing”)

Analiza ontologiczna w programie DAVID (4.2.17) wykazała, że w tkankach śledziony, uszu i serca myszy MRL/MpJ odmiennej ekspresji ulegają także transkrypty związane z procesem gojenia ran (Tab. 9).

W śledzionie myszy MRL/MpJ wśród genów należących do kategorii gojenie ran możemy wyróżnić transkrypty kodujące glikoproteiny (*Gp5, Gp6, Gp9*) oraz czynniki odgrywające rolę w procesie koagulacji krwi (*F5, F10, Vwf*). Natomiast pośród genów o podwyższonej ekspresji w tkance uszu możemy wyróżnić transkrypty kodujące chemokiny (*Ccl7, Ccl25*) oraz interleukinę 6 (*Il6*), kluczowy czynnik odgrywający rolę w trakcie powstawania odpowiedzi zapalnej w ranie.

W sercu i małżowinie usznej obniżonej ekspresji ulegają również geny związane z kategorią funkcyjną "odpowiedź na zranienie" (Tab. 9B). Większość z wymienionych w Tab. 9b transkryptów genów jest związana z odpowiedzią zapalną. Geny *C4b, Tlr7* i *Tlr8* wykazują obniżony poziom ekspresji zarówno w tkance serca, jak i uszu myszy MRL/MpJ.

Tab. 9. Geny związane z gojeniem ran wykazujące co najmniej dwukrotne różnice w ekspresji u myszy MRL/MpJ w porównaniu ze szczepami kontrolnymi.

A. Transkrypty wykazujące podwyższoną ekspresję w tkance uszu i śledziony u myszy MRL/MpJ oraz B. Transkrypty wykazujące obniżoną ekspresję w tkance serca i uszu myszy MRL/MpJ. Transkrypty związane z odpowiedzią zapalną są zaznaczone czerwoną czcionką.

A. Transkrypty o podwyższonej ekspresji w tkance uszu i śledziony

Małżowina uszna	Śledziona
GO:0009611~response to wounding	GO:0042060~wound healing/GO:0007599~hemostasis
<i>Gp5</i>	
<i>C4b, Ccl25, Ccl17, Ggt5, Gja1, Gm2023, Hbegf, Il6, Masp1, Procr, Rtn4rl2, Saa1, Scnn1b, Shh</i>	<i>Anxa8, F10, F5, Gp6, Gp9, Otog, P2rx1, Pf4, Vwf</i>

B. Transkrypty o obniżonej ekspresji w tkance serca i uszu

Małżowina uszna	Serce
GO:0009611~response to wounding	GO:0009611~response to wounding
<i>C4b, Tlr7, Tlr8</i>	
<i>C4a, Cd180, Cd55, Cfh, Gap43, Hc, Mecom, Myh2, P2ry12, Tfpi, Ticam2, Tlr3</i>	<i>Alox5, C1qb, C9, Ciita, Cr2, Fcgr3, Fgg, Ly86, Reg3b, Snap91</i>

Szlak sygnalizacji PPAR (ang. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*)

Inną kategorią funkcjonalną genów wykazujących co najmniej dwukrotne różnice w poziomie ekspresji pomiędzy szczepem myszy MRL/MpJ a szczepami kontrolnymi w tkance serca, jest szlak sygnalizacji PPAR (Tab. 10).

Białka uczestniczące w tym szlaku odpowiadają przede wszystkim za spalanie i przechowywanie tłuszczu oraz adipogenezę. Znamienna jest indukcja u myszy MRL/MpJ dwóch kluczowych markerów tej ścieżki sygnalizacyjnej: *Adipoq* i *Ucp1*.

Tab. 10. Geny związane z sygnalizacją PPAR wykazujące co najmniej dwukrotne różnice w poziomie ekspresji w sercu u myszy MRL/MpJ w porównaniu ze szczepami kontrolnymi.

mmu03320:PPAR signalling pathway
<i>Adipoq, Pck1, Plin1, Ucp1</i> <i>Acaa1b, Cyp4a10, Cyp4a12a, Cyp4a12b, Cyp4a31, Cyp4a32, Hmgcs2, Slc27a1, Slc27a2, Sorbs1</i>

5.1.4. Sekwencjonowanie drugiej generacji

W celu potwierdzenia wyników otrzymanych przy zastosowaniu mikromacierzy ekspresyjnej, metodą sekwencjonowania drugiej generacji (ang. *Next-Generation Sequencing*, NGS) (4.2.14) zbadano poziom ekspresji transkryptów genów w tkance serca pojedynczych osobników myszy MRL/MpJ, C57BL/6J oraz BALB/c (4.1.1). Restrykcyjne kryteria selekcji wyników uzyskanych przy zastosowaniu techniki NGS pozwoliły na wskazanie 25 transkryptów, dla których istotność statystyczna wyniku wyznaczono zarówno w odniesieniu do wartości p, jak i wartości q (po korekcie wyniku dla powtórzeń wielokrotnych) i które wykazywały co najmniej dwukrotne różnice w poziomie ekspresji pomiędzy badanym szczepem myszy MRL/MpJ a dwoma szczepami kontrolnymi (Tab. 11). Pośród wymienionych transkryptów geny *Vwa5a*, *Ucp1*, *Rbp7*, *Pck1*, *Cidec*, *Cdo1*, *Car3* oraz *Adipoq* wykazują podwyższony poziom ekspresji tak jak w przypadku wyników otrzymanych przy zastosowaniu mikromacierzy ekspresyjnej firmy NimbleGen. Również transkrypty *Scube2*, *Pccb*, *Ifltd1*, *Hsd17b7*, *Ezh1* oraz *Als2*, o dwukrotnie niższym poziomie ekspresji w tkance serca myszy MRL/MpJ (Tab. 11), wykazują podobny poziom ekspresji zgodny z wynikami mikromacierzowymi. Rozbieżności pomiędzy wynikami uzyskanymi przy zastosowaniu techniki NGS i mikromacierzy mogą wynikać przede wszystkim z innego sposobu analizy wyników. W wypadku badań mikromacierzowych nie stosowano bowiem korekty statystycznej dla powtórzeń wielokrotnych, która w wypadku zastosowanej analizy wyników NGS umożliwia wytypowanie niewielkiej liczby, ale najbardziej wiarygodnych rezultatów. Ponadto, sekwencjonowanie drugiej generacji zostało wykonane dla pojedynczych serc badanych myszy, a w przypadku mikromacierzy ekspresyjnej otrzymano średni poziom ekspresji dla trzech połączonych serc każdego ze szczepów myszy. Poza tym wyniki mikromacierzowe mogą dotyczyć jedynie wybranych wariantów transkrypcyjnych, a rezultaty NGS odnoszą się do wszystkich wariantów transkrypcyjnych danego genu. Z tych powodów te dwie metody nie doprowadziły do uzyskania identycznych, ale zbliżonych do siebie wyników.

Tab. 11. Reprezentatywne geny wykazujące różnice w ekspresji w sercu myszy MRL/MpJ zidentyfikowane przy użyciu NGS.

Lista obejmuje transkrypty wykazujące co najmniej dwukrotne różnice w poziomie ekspresji w tkance serca myszy MRL/MpJ, w porównaniu do dwóch kontrolnych szczepów myszy C57BL/6J oraz BALB/c. Wszystkie rezultaty są istotne statystycznie pod względem wartości p i po korekcie dla powtórzeń wielokrotnych (wartość q). Kolorem czerwonym zaznaczono geny wykazujące co najmniej dwukrotne różnice w ekspresji wg wyników mikromacierzowych (4.2.13). Wartości są zaprezentowane jako \log_2 .

Numer transkryptu (wg NCBI)	Symbol genu	C57BL/6J	BALB/c	MRL/MpJ	Opis
Transkrypty wykazujące podwyższony poziom ekspresji w tkance serca myszy MRL/MpJ					
NM_008218	<i>Hba-a1</i>	7,57	8,95	10,34	hemoglobin alpha, adult chain 1
NM_007606	<i>Car3</i>	4,40	3,52	7,19	carbonic anhydrase 3
NM_009127	<i>Scd1</i>	4,94	4,13	7,01	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1
NM_022020	<i>Rbp7</i>	5,24	4,63	6,70	retinol binding protein 7, cellular
NM_172767	<i>Vwa5a</i>	3,70	3,78	5,52	von Willebrand factor A domain containing 5A (Vwa5a), transcript variant 1
NM_007988	<i>Fasn</i>	4,08	3,32	5,50	fatty acid synthase
NM_011044	<i>Pck1</i>	2,68	-0,74	5,27	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic
NM_009605	<i>Adipoq</i>	2,47	1,17	4,95	adiponectin, C1Q and collagen domain containing
NM_009463	<i>Ucp1</i>	-0,58	0,00	4,49	uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)
NM_033037	<i>Cdo1</i>	2,18	1,91	4,41	cysteine dioxygenase 1, cytosolic
NM_178373	<i>Cidec</i>	2,41	0,56	4,39	cell death-inducing DFFA-like effector c (Cidec), transcript variant 1
NM_008081	<i>B4galnt2</i>	0,00	0,00	2,81	beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 2
Transkrypty wykazujące obniżony poziom ekspresji w tkance serca myszy MRL/MpJ					
NM_028717	<i>Als2</i>	2,01	1,89	-0,23	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) (Als2), transcript variant 1
NM_028742	<i>Ifttd1</i>	2,39	0,18	0,00	intermediate filament tail domain containing 1
NM_010476	<i>Hsd17b7</i>	2,39	3,90	0,01	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7
NM_007970	<i>Ezh1</i>	3,69	3,65	0,87	enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila)
NM_020052	<i>Scube2</i>	2,94	2,97	1,03	signal peptide, CUB domain, EGF-like 2
NM_001033409	<i>Lgr6</i>	4,08	4,00	1,14	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 6
NM_177039	<i>A530016L24Rik</i>	4,06	4,61	2,43	RIKEN cDNA A530016L24 gene
NM_009503	<i>Vcp</i>	5,17	5,01	2,71	valosin containing protein
NM_026921	<i>Isca1</i>	6,45	5,75	4,26	iron-sulfur cluster assembly 1 homolog (S. cerevisiae)
NM_025835	<i>Pccb</i>	5,79	5,74	4,41	propionyl Coenzyme A carboxylase, beta polypeptide
NM_009942	<i>Cox5b</i>	8,38	8,58	6,55	cytochrome c oxidase subunit Vb
NR_002905	<i>Snora74a</i>	10,11	11,16	8,80	small nucleolar RNA, H/ACA box 74A
NR_004445	<i>Snord22</i>	12,72	14,25	9,77	small nucleolar RNA, C/D box 22

Analiza ontologiczna w programie DAVID (4.2.17) wykazała, że spośród genów o podwyższonym poziomie ekspresji znajdują się transkrypty związane ze szlakiem sygnalizacji PPAR oraz procesem metabolizmu kwasów tłuszczowych (Tab. 12). Wyniki te potwierdzają rezultaty uzyskane przy zastosowaniu mikromacierzy ekspresyjnej, zgodnie z którymi podwyższonej ekspresji ulegały transkrypty związane ze szlakiem PPAR (Rys. 6). Natomiast, wśród transkryptów o obniżonym poziomie ekspresji zwraca uwagę nadreprezentacja genów związanych z procesem acetylacji.

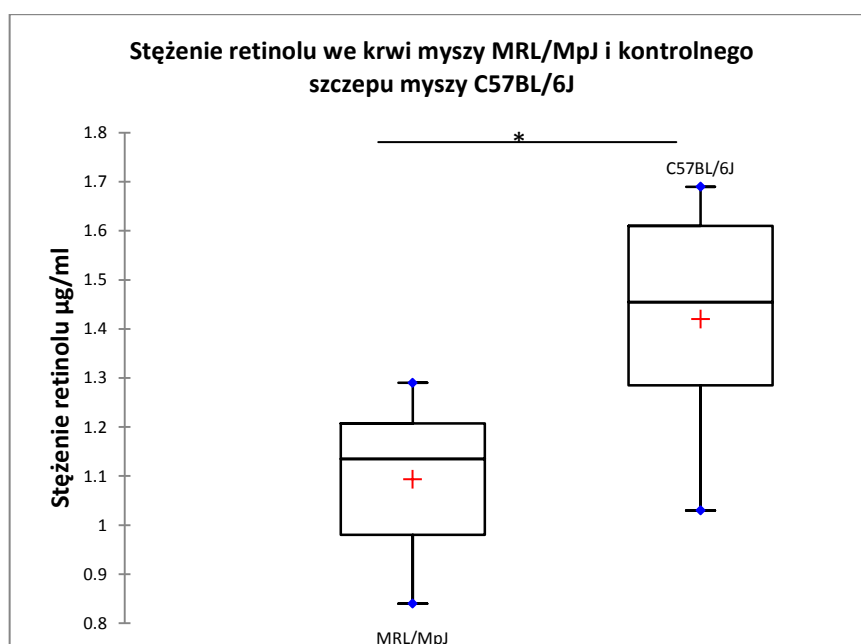
Tab. 12. Analiza ontologiczna grup genów wykazujących różnice w ekspresji znalezione przy użyciu NGS w sercu myszy MRL/MpJ

Analiza wykonano dla genów o co najmniej dwukrotnie wyższej lub niższej ekspresji u myszy MRL/MpJ w porównaniu do szczepów kontrolnych w tkance serca. Wszystkie rezultaty były istotne statystycznie (wartość $p < 0,05$). "*" - wyniki istotne po korekcie Benjaminiiego.

Analiza dla transkryptów o podwyższonym poziomie ekspresji
PPAR signaling pathway [<i>Scd1, Ucp1, Adipoq, Pck1</i>]*
Oxidoreductase [<i>Scd1, Fasn, Cdo1</i>]
Monosaccharide metabolic process [<i>B4galnt2, Adipoq, Pck1</i>]
Transition metal ion binding [<i>Hba-a1, Scd1, Fasn, Cdo1, Car3, Pck1</i>]
Lyase [<i>Fasn, Car3, Pck1</i>]
Fatty acid metabolic process [<i>Scd1, Fasn, Adipoq</i>]
Cytosol [<i>Hba-a1, Cdo1, Cidec</i>]
Analiza dla transkryptów o obniżonym poziomie ekspresji
Transit peptide [<i>Iscal, Cox5b, Pccb</i>]
Acetylation [<i>Als2, Vcp, Cox5b, Pccb, Hsd17b7</i>]
Positive regulation of hydrolase activity [<i>Als2, Vcp</i>]

5.1.5. Pomiar stężenia kwasu retinowego we krwi myszy MRL/MpJ oraz C57BL/6J

Analiza wyników uzyskanych przy zastosowaniu mikromacierzy ekspresyjnej wykazała, iż we wszystkich analizowanych tkankach myszy MRL/MpJ podwyższonej ekspresji ulegają geny kodujące białka uczestniczące w wiązaniu retinoidów lub metabolizmie retinolu, co może wpływać na stężenie tego metabolitu we krwi. W związku z tym sprawdzono stężenie retinolu metodą HPLC (4.2.15) w pełnej krwi sześciu myszy MRL/MpJ oraz sześciu myszy szczepu kontrolnego C57BL/6J (4.1.1). Wyniki zostały przedstawione na Rys. 7. Średnie stężenie retinolu oznaczone w pełnej krwi myszy MRL/MpJ wynosiło 1,09 $\mu\text{g/ml}$, natomiast u myszy szczepu kontrolnego - 1,42 $\mu\text{g/ml}$. Zmierzonego średniego poziomu retinolu we krwi myszy MRL/MpJ jest zatem o około 25% niższy niż u myszy C57BL/6J, a różnica ta jest istotna statystycznie.



Rys. 7. Stężenia retinolu w pełnej krwi myszy MRL/MpJ oraz C57BL/6J.

Różnice w poziomie stężenia retinolu pomiędzy badanymi szczepami myszy były istotne statystycznie (* - wartość $p=0.026$), co potwierdzono za pomocą testu t-Studenta (homoskedastyczny, rozkład dwustronny).

5.1.6. Porównanie profili ekspresji genów w sercach dorosłych myszy MRL/MpJ oraz sercach embrionalnych i noworodkowych myszy C57BL/6J

Znaleziono dowody, że mysz MRL/MpJ wykazuje pewne cechy metabolizmu embrionalnego [36]. W celu sprawdzenia czy istnieją analogiczne podobieństwa w profilach transkrypcji wykonano zestawienie wyników mikromacierzowych otrzymanych dla serc dorosłej myszy MRL/MpJ, dorosłej myszy C57BL/6J, serc płodów myszy C57BL/6J z dnia embrionalnego 15, 16, 18 i 19 oraz serc jedno- i siedmiodniowych noworodków (4.1.1). Z powyższego zestawienia wynika, że profile ekspresji genów w sercu dorosłej myszy MRL/MpJ wykazują więcej podobieństw do poziomu ekspresji genów w sercach myszy jednodniowych i siedmiodniowych szczepu kontrolnego niż profile ekspresji dorosłej myszy szczepu kontrolnego.

Pośród transkryptów o podwyższonym poziomie ekspresji (Tab. 13) odróżniających serce myszy MRL/MpJ oraz serca noworodkowe od dorosłych serc szczepu kontrolnego można wyróżnić geny należące do klasteru cytochromu P450, metabolizmu retinolu oraz szlaku sygnalizacji PPAR. Wśród transkryptów

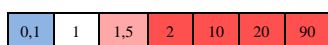
o podwyższonym poziomie ekspresji wspólnych dla MRL/MpJ, embrionów i noworodków znaleziono między innymi gen *Nanog*, znany marker pluripotencji. Natomiast transkrypty wykazujące obniżony poziom ekspresji w sercu dorosłej myszy MRL/MpJ oraz sercach embrionalnych i noworodkowych były głównie związane z odpowiedzią immunologiczną. Jak pokazuje Tab. 13b, profile transkrypcji znacznej liczby genów o obniżonej ekspresji wykazują podobieństwa w sercach dorosłej myszy MRL/MpJ oraz noworodków i embrionów myszy kontrolnej, natomiast profile transkrypcji pewnej liczby genów o podwyższonej ekspresji wykazują podobieństwa między sercami dorosłej myszy MRL/MpJ i noworodkami, ale nie embrionami myszy kontrolnej.

Tab. 13. Podobieństwo profili ekspresji genów w sercach dorosłej myszy MRL/MpJ oraz embrionów i noworodków myszy C57BL/6J – analiza ontologiczna.

Geny o odpowiednio podwyższonym (A)/obniżonym (B) poziomie ekspresji w tkance serca myszy MRL/MpJ, sercach embrionalnych (E15, E16, E18, E19) oraz noworodków jednodniowych (NB d1) i siedmiodniowych (NB d7) w porównaniu do dorosłych serc dwumiesięcznych (2 msc) myszy C57BL/6J należące do istotnych statystycznie kategorii ontologicznych znalezionych przy pomocy programu DAVID wśród wszystkich transkryptów wykazujących co najmniej dwukrotnie podwyższoną lub obniżoną ekspresję.

A) Transkrypty o podwyższonym poziomie ekspresji										B) Transkrypty o obniżonym poziomie ekspresji																					
Symbol genu	Stosunek poziomu ekspresji do myszy C57BL/6J (2 msc)					Kategoria funkcyjna					Symbol genu	Stosunek poziomu ekspresji do myszy C57BL/6J (2 msc)					Kategoria funkcyjna														
	C57BL/6J					MRL/MpJ	Retinol metabolism	PPAR signaling pathway	Cytochrome P450, E-class, group I	Endopeptidase inhibitor activity		Hox	C57BL/6J					Immune response	Antigen processing and presentation of peptide antigen	Systemic lupus erythematosus	Graft-versus-host disease	Response to wounding	Inflammatory response								
	E15	E16	E18	E19	NB d1								NB d7	Adult 2 msc	E15	E16	E18							E19	NB d1	NB d7	Adult 2 msc				
<i>Cyp4a12a</i>																<i>H2-Ab1</i>															
<i>Cyp4a10</i>																<i>H2-DMb2</i>															
<i>Cyp4a31</i>																<i>H2-Aa</i>															
<i>Cyp4a32</i>																<i>H2-Eb1</i>															
<i>Cyp2a4</i>																<i>H2-Aa</i>															
<i>Cyp2a4</i>																<i>H2-Aa</i>															
<i>Cyp2a4</i>																<i>H2-DMA</i>															
<i>Cyp2a21-ps</i>																<i>H2-Ob</i>															
<i>Cyp2b10</i>																<i>H2-K1</i>															
<i>Cyp2f2</i>																<i>H2-Q6</i>															
<i>Cyp2d10</i>																<i>Klra3</i>															
<i>Cyp4f15</i>																<i>Klra3</i>															
<i>Slc27a2</i>																<i>Fcgr3</i>															
<i>Slc27a2</i>																<i>Fcgr3</i>															
<i>Slc27a2</i>																<i>C4b</i>															
<i>Acaa1b</i>																<i>C1qb</i>															
<i>Pck1</i>																<i>Igh</i>															
<i>Itih3</i>																<i>Fcgr4</i>															
<i>Serpina1d</i>																<i>Hist2h3c2</i>															
<i>BC117090</i>																<i>Cr2</i>															
<i>Wfdc2</i>																<i>Tlr7</i>															
<i>Barhl2</i>																<i>Tlr7</i>															
<i>Gm7148</i>																<i>Ciita</i>															
<i>Nanog</i>																<i>Tlr8</i>															
																<i>Ciita</i>															
																<i>Cd74</i>															
																<i>Cd74</i>															
																<i>Faim3</i>															
																<i>Gbp5</i>															
																<i>Cd79b</i>															
																<i>Cd79a</i>															
																<i>Gbp4</i>															
																<i>Clec5a</i>															
																<i>Alox5</i>															

Skala



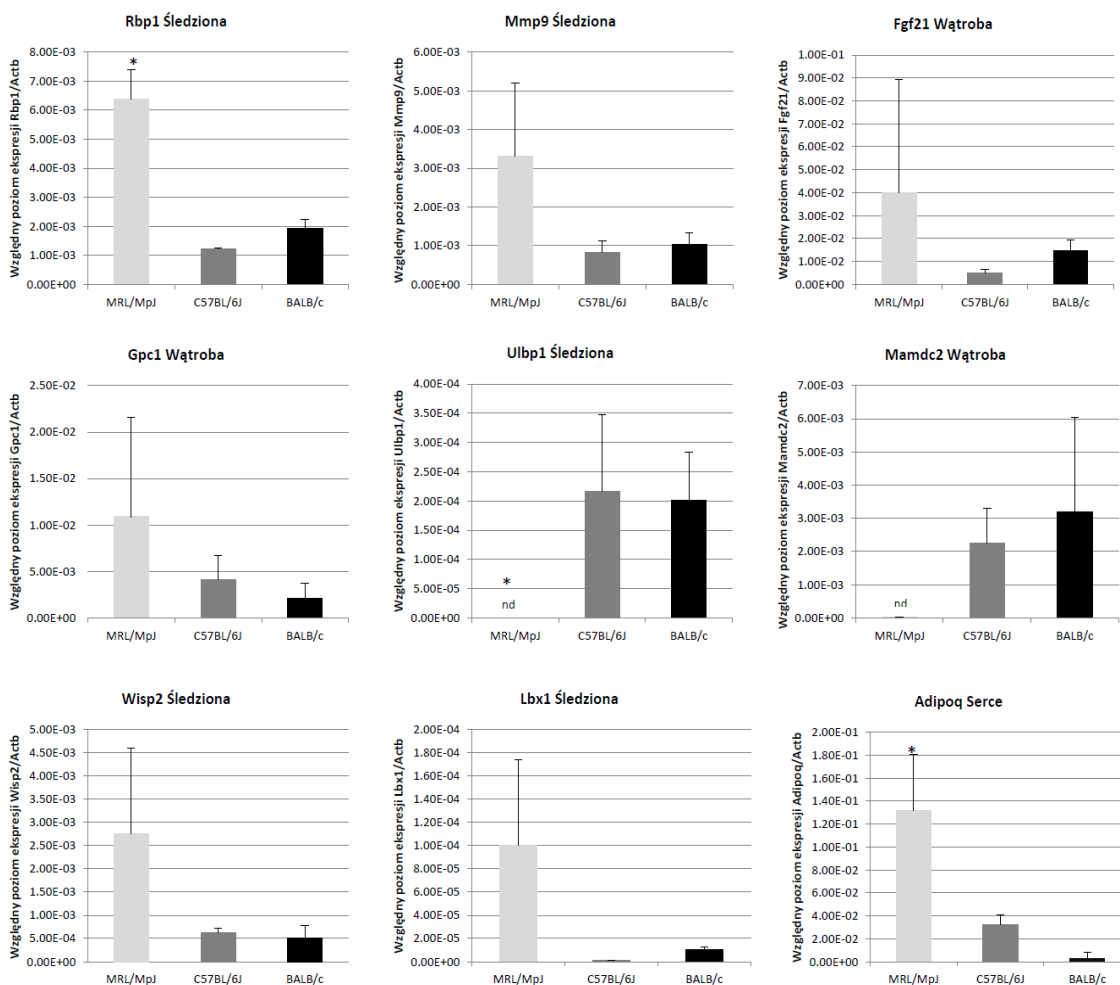
5.1.7. Analiza poziomu ekspresji wybranych genów metodą PCR w czasie rzeczywistym

W celu potwierdzenia wyników uzyskanych przy zastosowaniu mikromacierzy ekspresyjnej wybrano kilka genów wykazujących co najmniej dwukrotne różnice w poziomie ekspresji między szczepem myszy MRL/MpJ a dwoma szczepami kontrolnymi - C57BL/6J oraz BALB/c.

Dla wybranych genów (Tab. 14) analiza została wykonana metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (qPCR). Analizę poziomu ekspresji przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 4.2.7. Jako gen referencyjny zastosowano gen β -aktyny. Reakcję wykonano na matrycach cDNA (4.2.4 A) pochodzących ze śledziony, wątroby i serca (4.1.1) od trzech osobników (samice) myszy MRL/MpJ, C57BL/6J oraz BALB/c. Wyniki oznaczenia poziomu ekspresji dla wszystkich analizowanych genów przedstawiono na Rys. 8 oraz zestawiono w Tab. 14.

Geny do tej analizy wybrano biorąc pod uwagę ich potencjalny wpływ na podwyższone zdolności regeneracyjne myszy MRL/MpJ. Gen *Adipoq* jest wyżej ekspresjonowany w tkance serca myszy MRL/MpJ w porównaniu do kontrolnych szczepów myszy i bierze udział w szlaku PPAR. Produkt białkowy genu *Rbp1* (analiza w tkance śledziony) odgrywa kluczową rolę w szlaku kwasu retinowego i odpowiada za wiązanie retinolu i wprowadzanie go do komórki. Natomiast gen *Mmp9* koduje metaloproteinazę macierzy. Ponadto sprawdziłam poziom ekspresji genów różnie ekspresjonowanych w tkance wątroby myszy MRL/MpJ. Pośród genów wybranych do analizy metodą qPCR można wyróżnić między innymi gen *Fgf1*, kodujący czynnik wzrostu fibroblastów oraz gen *Gpc1*, który może odgrywać rolę w regulacji podziałów komórkowych i wzrostu komórki.

Dla powyższych genów wyniki otrzymane przy zastosowaniu mikromacierzy ekspresyjnej zostały potwierdzone metodą qPCR.



Rys. 8. Weryfikacja mikromacierzowych pomiarów ekspresji genów wykonana dla wybranych transkryptów metodą qPCR.

Histogramy pokazują średnie relatywne poziomy transkryptów oznaczone dla próbek od trzech osobników.

nd - nie wykryto transkryptu. Istotność statystyczną wyznaczono stosując heteroskedastyczny, dwuskrzydłowy test t-Studenta. "*" - oznaczono wyniki o wartości istotności statystycznej $p < 0,05$. Słupki błędów odpowiadają wartościom odchylenia standardowego.

Tab. 14. Zestawienie wyników analizy poziomu ekspresji wybranych genów metodą qPCR.

Wyniki przedstawiono jako znormalizowany współczynnik poziomu ((2), 4.2.7) ekspresji genów u myszy MRL/MpJ względem C57BL/6J lub BALB/c. Istotność statystyczną wyznaczono stosując test t-Studenta (rozkład dwustronny, heteroskedastyczny); "*" - oznaczono wyniki o wartości istotności statystycznej $p < 0,05$.

Numer transkryptu (wg NCBI)	Symbol genu	Analizowana tkanka	Poziom ekspresji transkryptu (mikromacierz)		Znormalizowany poziom ekspresji transkryptu (qPCR)		Poziom ekspresji genu (NGS)	
			MRL/MpJ - C57BL/6J	MRL/MpJ - BALB/c	MRL/MpJ - C57BL/6J	MRL/MpJ - BALB/c	MRL/MpJ - C57BL/6J	MRL/MpJ - BALB/c
BC028770	<i>Adipoq</i>	Serce	2,78	4,13	4,06*	13,79*	5,58	13,74
BC091751	<i>Rbp1</i>	Śledziona	4,81	3,16	5,17*	3,33*	-	-
BC046991	<i>Mmp9</i>	Śledziona	3,48	2,68	3,98	3,25	-	-
BC049592	<i>Fgf21</i>	Wątroba	4,39	2,00	10,85	3,63	-	-
BC042773	<i>Mamdc2</i>	Wątroba	0,022	0,037	4,31E-03	3,05E-03	-	-
BC062902	<i>Gpc1</i>	Wątroba	3,63	2,96	3,54	6,79	-	-
NM_029975	<i>Ulbp1</i>	Śledziona	0,08	0,07	0,00*	0,00*	-	-
BC119177	<i>Lbx1</i>	Śledziona	2,35	2,77	108,03	9,61	-	-
BC032877	<i>Wisp2</i>	Śledziona	2,86	3,70	4,43	5,32	-	-

5.2. Badanie profili metylacji wybranych genów myszy MRL/MpJ

Celem porównawczego badania genomowych profili metylacji w tkankach myszy MRL/MpJ i myszy C57BL/6J było znalezienie genów i regionów DNA wykazujących znaczne różnice w metylacji z zamiarem sprawdzenia czy te różnice mogą mieć związek z regeneracyjnym potencjałem myszy MRL/MpJ. Do badań zastosowano DNA genomowe wyizolowane z tkanek serca, wątroby i śledziony pochodzące od 3 pięcioletniowych samców każdego szczepu myszy (4.1.1). Wyniki tych badań zostały przedstawione w artykule opublikowanym w DNA Research [37].

Istotną częścią tej pracy i moim głównym wkładem w tych badaniach było potwierdzenie wyników uzyskanych za pomocą mikromacierzy metylacyjnej dla kilku wybranych genów, metodą sekwencjonowania wodorosiarczynowego (4.2.16) oraz przy użyciu endonukleazy restrykcyjnej wrażliwej na metylację CpG (4.2.6) i qPCR (4.2.7).

Biorąc pod uwagę wyniki otrzymane przy użyciu mikromacierzy metylacyjnej oraz analizę ontologiczną wykonaną w programie DAVID (4.2.17) sprawdzono, które

z genów należących do grupy genów homeotycznych i odpowiadających za embriogenezę są hipometylowane u myszy MRL/MpJ w porównaniu do kontrolnego szczepu myszy C57BL/6J. Fragment analizy wraz z wartościami pików metylacji dla wybranych genów zestawiono w Tab. 15.

Tab. 15. Zestawienie genów wykazujących odmienną metylację między szczepami myszy MRL/MpJ i C57BL/6J, które pełnią rolę w trakcie embriogenezy.

Szarym tłem zaznaczono geny, dla których została wykonana dalsza analiza. Skróty: S – serce, W -wątroba, Ś – śledziona.

Symbol genu	Pełna nazwa genu	Wartość pików metylacji dla MRL/MpJ			Wartość pików metylacji dla C57BL/6J		
		S	W	Ś	S	W	Ś
<i>Foxc2</i>	forkhead box C2	0,00	0,00	0,00	1,56	2,29	2,36
<i>Rarg</i>	retinoic acid receptor, gamma	0,00	0,00	0,00	0,00	2,05	1,54
<i>Barhl1</i>	BarH-like 1 (Drosophila)	1,65	0,00	0,00	1,93	2,04	1,82
<i>Rdh10</i>	retinol dehydrogenase 10 (all-trans)	1,17	0,00	0,00	1,56	2,53	1,91
<i>Tgfb1</i>	transforming growth factor, beta receptor I	0,00	1,38	1,16	0,00	2,89	2,12
<i>Tbrg1</i>	transforming growth factor beta regulated gene 1	2,5	2,2	2,7	0,00	0,00	0,00

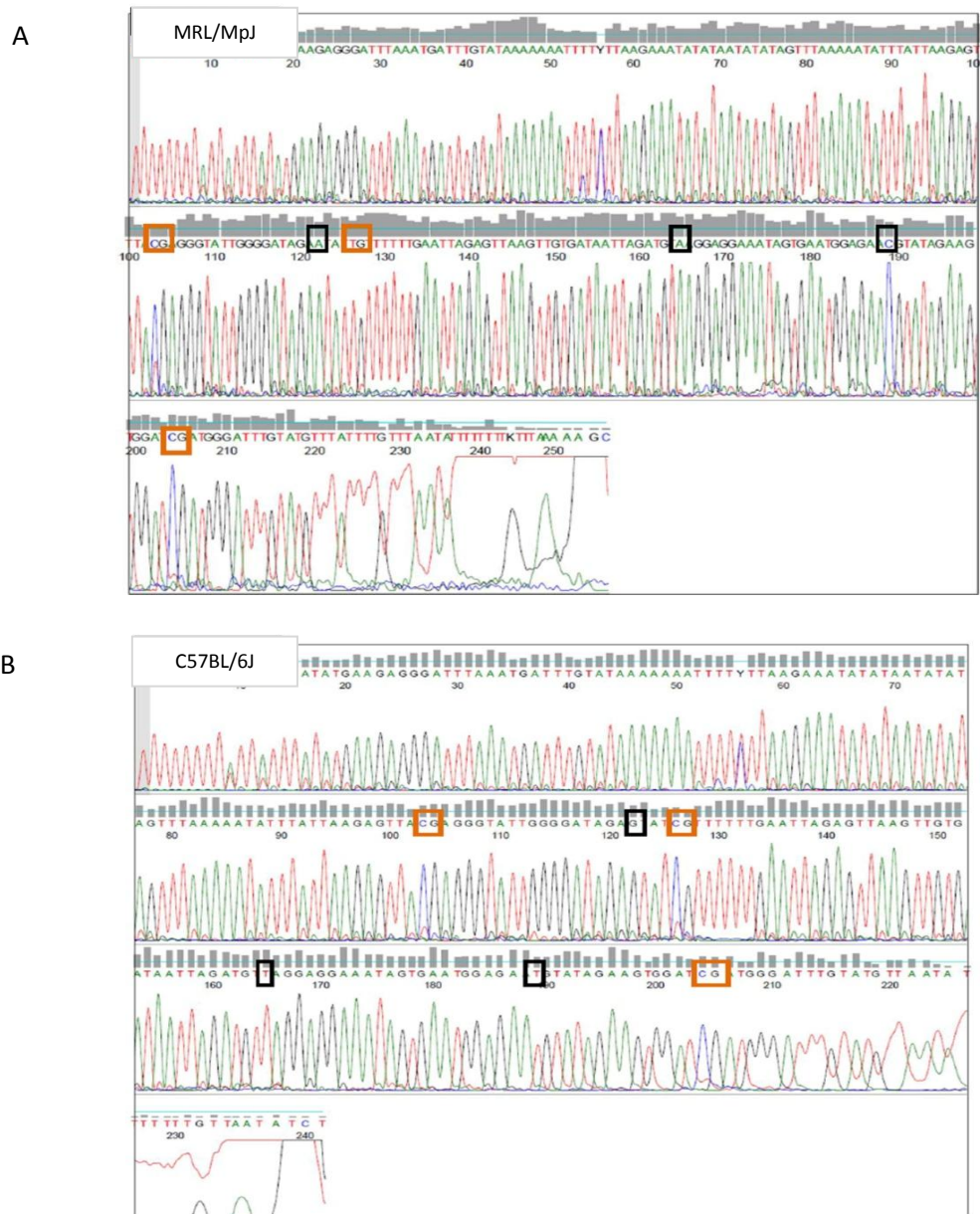
Geny wymienione w powyższej tabeli odgrywają kluczową rolę w trakcie embriogenezy, a są hipometylowane w tkankach myszy MRL/MpJ.

Analiza poziomu metylacji genu *Tbrg1*

Region promotorowy genu *Tbrg1* wykazywał znaczne różnice w poziomie metylacji w trzech analizowanych tkankach myszy MRL/MpJ w porównaniu do szczepu kontrolnego. Produkt białkowy tego genu działa jako inhibitor wzrostu komórki. Może aktywować białko p53, powodując zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G1.

W celu weryfikacji różnic w poziomie metylacji pomiędzy obydwojema szczepami myszy przeprowadzono bezpośrednie sekwencjonowanie (4.2.16) produktów PCR (4.2.8) o długości 271 pz odpowiadających badanemu regionowi, uzyskanych na matrycach genomowego DNA poddanego konwersji wodorosiarczynowej (4.2.9)

(Rys. 9 i Rys.10). Sekwencjonowanie przeprowadzono dla próbek śledziona pochodzącej od trzech pięcioletnich samców myszy MRL/MpJ i dwóch pięcioletnich samców myszy C57BL/6J (4.1.1).



Rys. 9. Reprezentatywny wynik sekwencjonowania wodorosiarczynowego dla fragmentu regionu promotorowego genu *Tbrg1* amplifikowanego na matrycy DNA genomowego wyizolowanego ze śledziona myszy MRL/MpJ i C57BL/6J.

W czerwonych ramkach zaznaczono analizowane dinukleotydy CpG. W czarnych ramkach zaznaczono warianty sekwencji nukleotydowej u obu szczepów myszy. Chromatogramy przygotowano w programie FinchTV (4.2.17).

		Section 1				
		(1)	10	20	30	48
Tbgr1 C57BL/6J Spleen	(1)	TTTTTTTTTWTATAATTTATATGAAGAGGGATTTAAATGATTTGTATAAAA				
Tbgr1 MRL/MpJ Spleen	(1)	TTTTTTTTTWTWTATTTATATGAAGAGGGATTTAAATGATTTGTATAAAA				
		Section 2				
		(49)	60	70	80	96
Tbgr1 C57BL/6J Spleen	(49)	AAATTTTYYTTAAGAAATATATAATATATAGTTTAAAAATATTTATTAA				
Tbgr1 MRL/MpJ Spleen	(49)	AAATTTTYYTTAAGAAATATATAATATATAGTTTAAAAATATTTATTAA				
		Section 3				
		(97)	110	120	130	144
Tbgr1 C57BL/6J Spleen	(97)	GAGTTACGAGGGTATTGGGGATAGATATCGTTTTTTTGAATTAGAGTT				
Tbgr1 MRL/MpJ Spleen	(97)	GAGTTACGAGGGTATTGGGGATAGATATATGTTTTTTTGAATTAGAGTT				
		Section 4				
		(145)	150	160	170	180
Tbgr1 C57BL/6J Spleen	(145)	AAGTTGTGATAATTAGATGTTAGGAGGAAATAGTGAATGGAGAACTGTA				
Tbgr1 MRL/MpJ Spleen	(145)	AAGTTGTGATAATTAGATGTAAGGAGGAAATAGTGAATGGAGAACTGTA				
		Section 5				
		(193)	200	210	220	
Tbgr1 C57BL/6J Spleen	(193)	TAGAAGTGGATCGATGGGATTTGTATGTT				
Tbgr1 MRL/MpJ Spleen	(193)	TAGAAGTGGATCGATGGGATTTGTATGTT				

Rys. 10. Porównanie wyników sekwencjonowania wodorosiarczynowego dla fragmentu regionu promotorowego genu *Tbgr1* amplifikowanego na matrycy DNA genomowego wyizolowanego ze śledziony myszy MRL/MpJ i C57BL/6J.

W czerwonych ramkach zaznaczono analizowane dinukleotydy CpG. W czarnych ramkach zaznaczono warianty sekwencji nukleotydowej u obu szczepów myszy. Sekwencje porównano w programie VectorNTI (4.2.17).

Wynik sekwencjonowania dla fragmentu regionu promotorowego genu *Tbgr1* wskazuje na metylację trzech badanych miejsc CpG u myszy C57BL/6J, natomiast u myszy MRL/MpJ wyspa w pozycji -1955 od TSS pozostaje niemetylowana. Dodatkowo powyższy wynik wskazuje na istnienie kilku wariantów sekwencyjnych u myszy MRL/MpJ, w tym substytucji tyminy do cytozyny, która jest metylowana u myszy MRL/MpJ. U myszy MRL/MpJ znaleziono cztery, natomiast u myszy C57BL/6J trzy miejsca CpG. W Tab. 16 podsumowano wszystkie różnice nukleotydowe w badanej części regionu regulatorowego genu *Tbgr1* między szczepami myszy MRL/MpJ i C57BL/6J.

Tab. 16. Porównanie różnic w sekwencji nukleotydowej regionu promotorowego genu *Tbgr1*.

„Built mm9” oznacza wersję bazy danych zawierającej sekwencję nukleotydową DNA genomowego dla szczepu myszy C57BL/6J wraz z informacją o pozycjach poszczególnych genów sporządzoną w kwietniu 2007 roku.

Chr9; pozycja nukleotydowa (built mm9)	MRL/MpJ	C57BL/6J
37467701	A	G
37467744	A	C
37467768	C	T

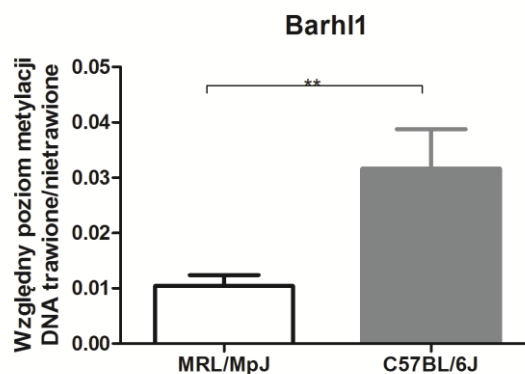
Takie same warianty sekwencji nukleotydowej w analizowanym regionie znaleziono również u innych szczepów myszy laboratoryjnych: 129S1/SVImJ, A/J,

BALB/cJ, C3H/HeJ, CAST/EiJ, CBA/J (wyniki potwierdzone w bazie danych Sanger (4.2.17)).

Mimo znalezionych różnic w sekwencji nukleotydowej i statusie metylacyjnym genu *Tbrg1* u myszy MRL/MpJ nie wykryto statystycznie istotnego podniesienia lub obniżenia poziomu ekspresji tego genu u myszy MRL/MpJ w porównaniu ze szczepem kontrolnym.

Analiza poziomu metylacji genu *Barhl1*

Gen *Barhl1* zostały wybrany do analizy ze względu na jego istotną rolę w trakcie rozwoju embrionalnego. Analizę poziomu metylacji wykonano przy zastosowaniu enzymu restrykcyjnego *HpaII* wrażliwego na metylację (4.2.6). Wyniki oznaczenia poziomu metylacji fragmentu regionu promotorowego genu *Barhl1*, przeprowadzone na trzech próbkach pochodzących z tkanki wątroby myszy MRL/MpJ i trzech próbkach pochodzących od myszy C57BL/6J, przedstawiono na Rys. 11.



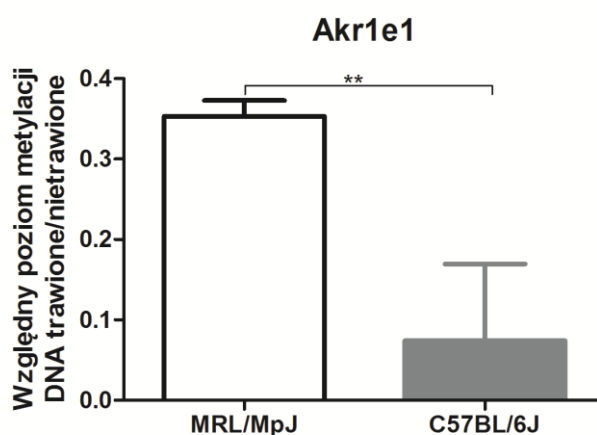
Rys. 11. Analiza poziomu metylacji fragmentu regionu promotorowego genu *Barhl1* (- $p < 0,01$).**

Histogramy pokazują średnie relatywne poziomy transkryptów oznaczone dla próbek od trzech osobników.

W celu sprawdzenia wpływu metylacji rejonów promotorowych DNA na poziom ekspresji tego genu w tkance wątroby przeprowadzono reakcję PCR w czasie rzeczywistym (4.2.7). W wypadku powyższego genu poziom ekspresji w tkance wątroby był zbyt niski dla skutecznego oznaczenia ilościowego przy użyciu stosowanego układu qPCR.

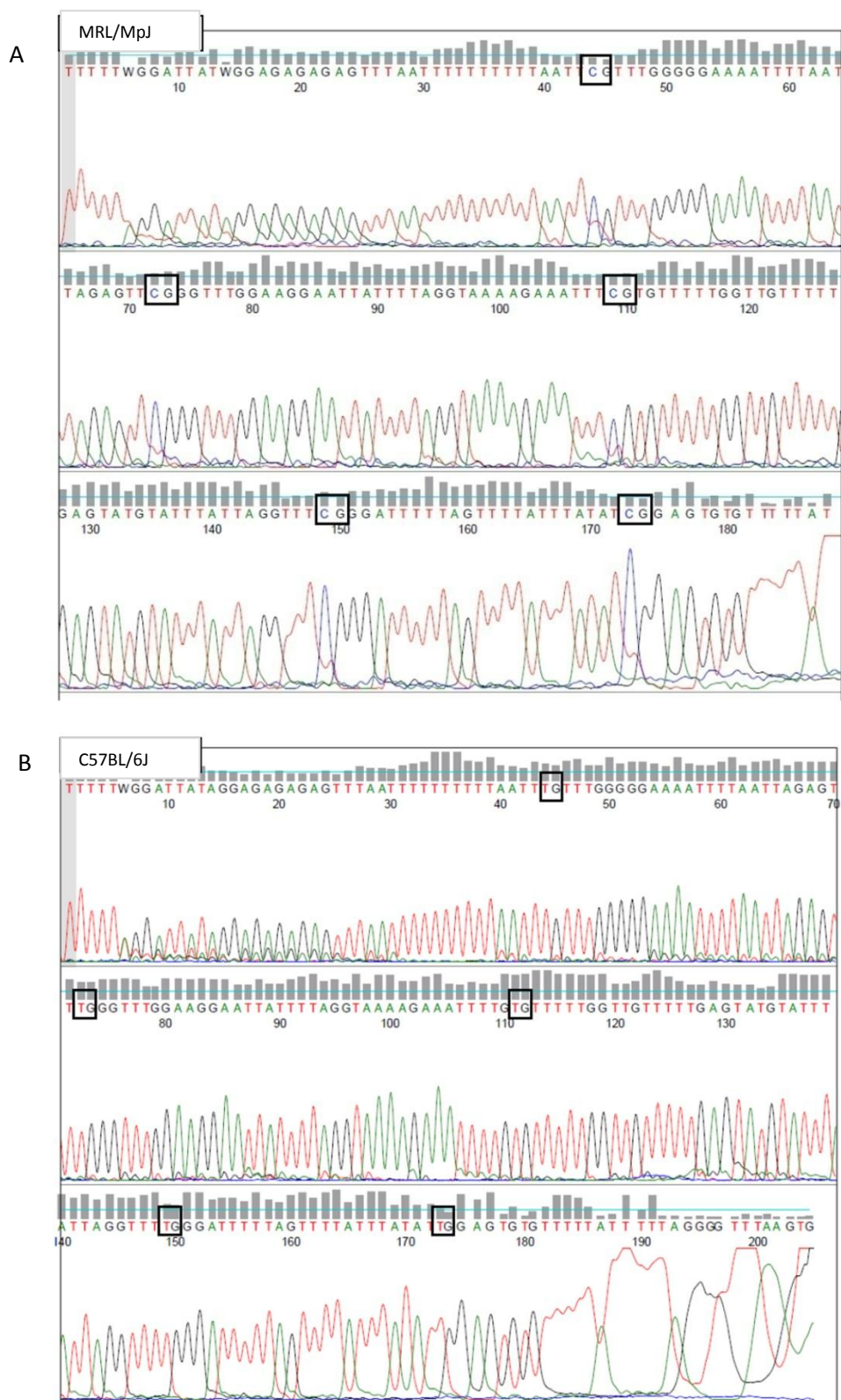
Analiza poziomu ekspresji i metylacji genu *Akr1e1*

Gen aldo–keto reduktazy *Akr1e1* u myszy MRL/MpJ jest metylowany w regionie promotorowym, w tkance serca, zgodnie z wynikami otrzymanymi przy zastosowaniu mikromacierzy metylacyjnej. W związku z powyższym potwierdzono różnice w poziomie metylacji fragmentu regionu promotorowego genu w tkankach serca dla trzech pięcioletnich osobników szczepu myszy C57BL/6J (4.1.1) oraz trzech osobników myszy MRL/MpJ (4.1.1) przy zastosowaniu endonukleaz wrażliwych na metylację (*HpaII*) (4.2.6) i sekwencjonowania wodorosiarczynowego (4.2.16). Wyniki zamieszczono odpowiednio na Rys. 12 i 13.



Rys. 12. Poziom metylacji fragmentu regionu promotorowego genu *Akr1e1* w tkankach serca myszy MRL/MpJ i C57BL/6J (p<0,01).**

Histogramy pokazują średnie relatywne poziomy metylacji oznaczone dla próbek od trzech osobników.

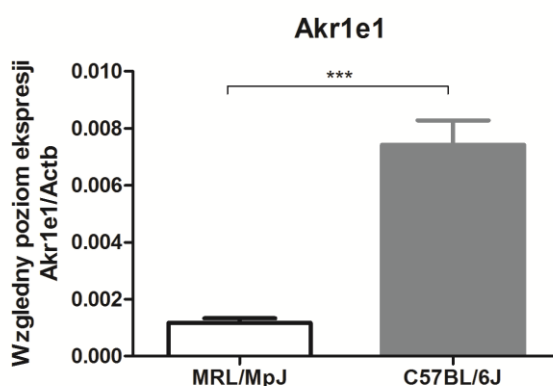


Rys. 13. Reprezentatywny wynik sekwencjonowania wodorosiarczynowego dla fragmentu regionu promotorowego genu *Akr1e1* amplifikowanego na matrycy DNA genomowego wyizolowanego z tkanki serca myszy MRL/MpJ i C57BL/6J.

W czarnych ramkach zaznaczono analizowane dinukleotydy CpG. Chromatogramy przygotowano w programie FinchTV (4.2.17).

Wyniki sekwencjonowania (Rys. 13) potwierdzają rezultaty otrzymane za pomocą mikromacierzy metylacyjnej. U myszy MRL/MpJ w badanym regionie promotorowym występuje metylacja miejsc CpG, podczas gdy ten sam region nie jest metylowany u myszy C57BL/6J. Także wyniki otrzymane przy użyciu analizy z zastosowaniem enzymu *HpaII* (4.2.6) (Rys. 12) potwierdzają różnice w poziomie metylacji (u myszy MRL/MpJ poziom metylacji jest około 5 razy większy).

W celu sprawdzenia wpływu metylacji na poziom ekspresji tego genu przeprowadzono reakcję PCR w czasie rzeczywistym (4.2.7) dla próbek tkanki serca pochodzących od trzech osobników każdego z badanych szczepów myszy. Wyniki analizy poziomu ekspresji zamieszczono na Rys. 14.



Rys. 14. Analiza poziomu ekspresji genu *Akr1e1* na matrycy serc myszy MRL/MpJ i C57BL/6J (***) $p < 0,005$).

Histogramy pokazują średnie relatywne poziomy transkryptów oznaczone dla próbek od trzech osobników.

Powyższy wynik wskazuje, że poziom ekspresji genu *Akr1e1* jest niższy w sercu myszy MRL/MpJ niż u myszy C57BL/6J. Gen *Akr1e1* bierze udział w metabolizmie glukozy, a obniżony poziom 1,5-anhydro-D-glucitolu jest markerem hiperglikemii, jednak informacje o funkcji i znaczeniu tego genu dostępne w literaturze są bardzo skąpe. Wyrażna różnica w statusie metylacyjnym *Akr1e1* między MRL/MpJ a szczepem kontrolnym skorelowana ze znaczną różnicą w poziomie ekspresji w połączeniu z możliwą rolą tego genu w regulacji metabolizmu energetycznego stanowią sugestie, że ten wątek badań warto rozwinąć.

5.3. Zmiany w poziomie metylacji i ekspresji genów zachodzące w trakcie rozwoju embrionalnego myszy szczepu C57BL/6J

W trakcie rozwoju embrionalnego ssaków zachodzą liczne zmiany epigenetyczne, co pozwala na prawidłowy rozwój organizmu. Co ciekawe, wykazano iż skóra grzbietowa płodów ssaków wykazuje zdolność do bezbliznowego gojenia ran do końca drugiego trymestru ciąży. Na początku trzeciego trymestru dochodzi do zmian w skórze, także na poziomie molekularnym, które powodują utratę zdolności regeneracyjnych. U myszy skóra embrionów goi się bezbliznowo do dnia embrionalnego 15 (E15), natomiast po dniu E16, te zdolności zanikają [47].

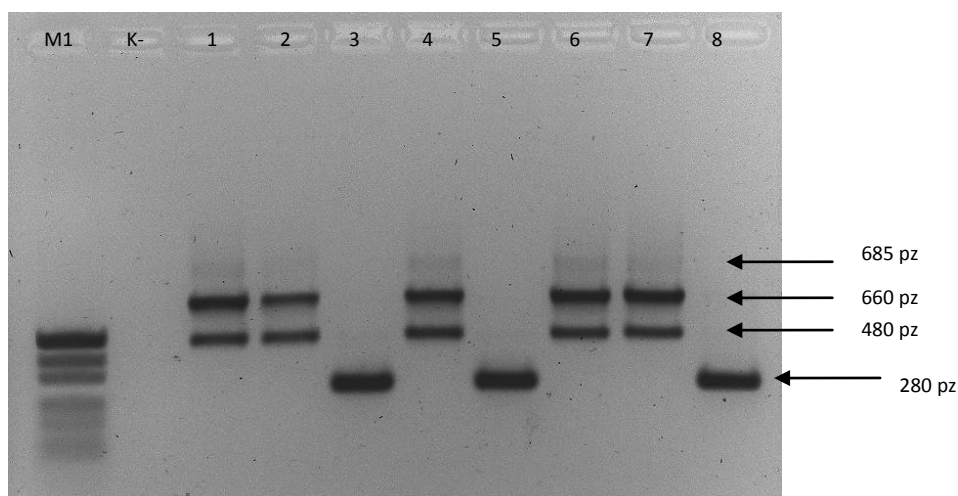
W celu określenia potencjalnego wpływu regulacji epigenetycznej na morfogenezę i bezbliznowe gojenie skóry u płodów myszy zbadano i porównano profile metylacji i ekspresji genów w dniu embrionalnym 15, 16, 18, 19 i u dorosłych myszy w wieku 3 miesięcy szczepu C57BL/6J (4.1.1) przez zastosowanie mikromacierzy metylacyjnych i ekspresyjnych firmy NimbleGen (Roche) (4.2.12, 4.2.13). Powyższe platformy hybrydizacyjne pozwalają na oszacowanie ekspresji dla większości znanych genów myszy i statusu metylacyjnego ich regionów regulatorowych. Do badań użyto tylko tkanek pobranych od osobników tej samej płci (samic). Należy podkreślić, że każdy z uzyskanych genomowych profili metylacji DNA i transkrypcji reprezentuje tę samą próbkę przygotowaną z wycinków skóry pobranych od trzech różnych osobników.

5.3.1. Określenie płci płodów

W celu eliminacji zmiennej związanej z płcią, było istotne, aby do badania wybrać próbki pochodzące od płodów tej samej płci. Z uwagi na to, że większość innych badań genomowych profili metylacji i ekspresji genów przeprowadzonych w naszym zespole badawczym wykonano dla samic, w wypadku badania skóry, także wybrano samice.

Ponieważ ocena anatomiczna płci płodów myszy byłaby bardzo trudna, o ile w ogóle możliwa, w celu sprawdzenia płci embrionów, ze skóry grzbietowej płodów (4.1.1) wyizolowano DNA genomowe (4.2.1) i wykonano reakcję PCR (4.2.8 A) umożliwiającą rozróżnienie samców od samic. Zastosowano startery i profil temperaturowo-czasowy do amplifikacji fragmentu genów *Sly* i *Xlr* zgodnie z opublikowaną metodą oznaczania płci myszy [103].

Na Rys. 15 przedstawiono przykładowy wynik reakcji PCR, dla DNA genomowego wyizolowanego ze skóry płodów z dnia E18, w formie zdjęcia z rozdziału elektroforetycznego DNA w żelu agarozowym (4.2.10).



Rys. 15. Oznaczenie płci embrionów myszy przy użyciu metody PCR.

Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji fragmentu genów *Sly* i *Xlr* na matrycy DNA genomowego wyizolowanego ze skóry grzbietowej płodów myszy z dnia E18. M1 – marker wielkości DNA M1 (100-500 pz; DNA-Gdańsk); K - kontrola negatywna; 1- produkt amplifikacji genu *Xlr* na matrycy DNA genomowego pochodzącego od dorosłej samicy myszy; 2-9 – produkty amplifikacji genów *Sly* i *Xlr* na matrycach próbek DNA genomowego płodów myszy E18.

Elektroforeza w 2% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny (4.2.10).

Metoda opisana przez McFarlane i wsp. [103] umożliwia określenie płci myszy w oparciu o reakcję PCR. W wyniku amplifikacji fragmentu genu *Sly*, znajdującego się na chromosomie Y w około 70 kopiach, obserwuje się po rozdziale elektroforetycznym DNA w żelu agarozowym jeden produkt o wielkości 280 pz. W przypadku amplifikacji fragmentu genu *Xly*, który występuje w około 50-70 kopiach w dwóch obszarach na każdym z chromosomów X, jako wynik obserwuje się fragmenty DNA o wielkości odpowiednio 685 pz, 660 pz i 480 pz. Pomimo, iż u samców występują chromosomy X i Y, amplifikacja krótszego fragmentu genu pochodzącego z chromosomu Y jest znacznie wydajniejsza, stąd obserwuje się tylko jeden produkt [103]. Reakcja umożliwiła więc łatwe rozróżnienie samców od samic u płodów myszy. Na Rys. 15 produkty amplifikacji znajdujące się w studzienkach oznaczonych numerami 1, 2, 4, 6, 7 pochodzą od osobnika o genotypie XX (samica).

5.3.2. Analiza zmian w poziomie metylacji genomowego DNA w trakcie rozwoju embrionalnego w skórze grzbietowej myszy

Analizę zmian w poziomie metylacji genomowego DNA w trakcie rozwoju embrionalnego w skórze grzbietowej myszy wykonano przy użyciu mikromacierzy metylacyjnej 3x720K firmy NimbleGen (4.2.12), która umożliwia oszacowanie poziomu metylacji 15.980 wysp CpG oraz 20.404 regionów promotorowych odpowiadających 22.881 transkryptów.

W celu wyodrębnienia genów o różnym poziomie metylacji przyjęto następujące założenia:

a) geny o obniżonym poziomie metylacji w dniu E15:

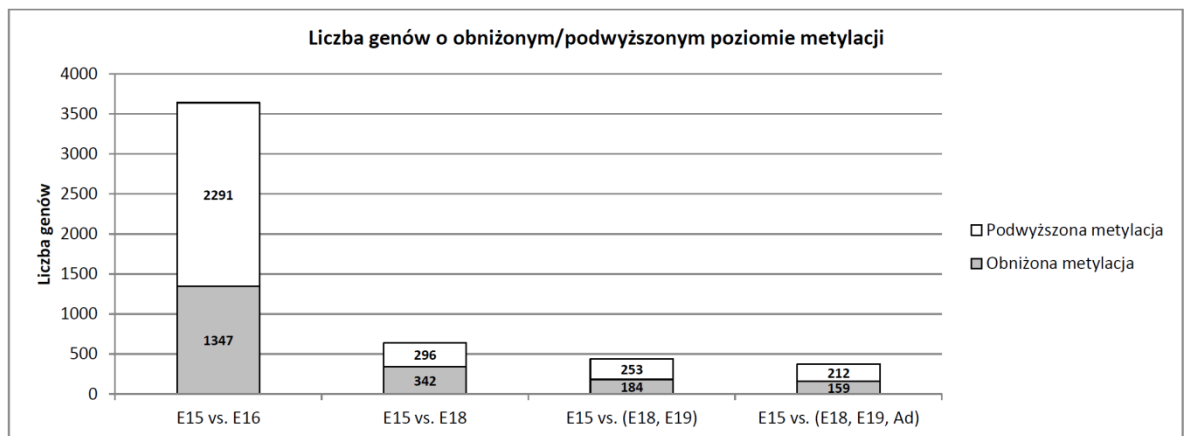
- skóra grzbietowa z dnia E15 - wartość pikę metylacji ≤ 1
- skóra grzbietowa z dnia E18, E19 i dorosłych myszy - wartość pikę metylacji ≥ 2
- liczba sąsiadujących ze sobą na genomie sond hybrydacyjnych przypadająca na dany region promotorowy genu ≥ 3

b) geny o podwyższonym poziomie metylacji w dniu E15:

- skóra grzbietowa z dnia E15 - wartość pikę metylacji ≥ 2
- skóra grzbietowa z dnia E18, E19 i dorosłych myszy - wartość pikę metylacji ≤ 1
- liczba sąsiadujących ze sobą na genomie sond hybrydacyjnych przypadająca na dany region promotorowy genu ≥ 3 .

Przyjęcie tak restrykcyjnych założeń pozwoliło na wyselekcjonowanie genów wykazujących największe różnice w poziomie metylacji. Użycie takich kryteriów nie oznacza jednak, że regiony promotorowe wyselekcjonowanych genów o obniżonej metylacji w ogóle pozbawione są metylacji. Cały region promotorowy może wykazywać znaczny stopień metylacji, a różnica może dotyczyć tylko pewnej części tego regionu. Z danych literaturowych wiadomo, że takie różnice mogą mieć efekt fenotypowy [114, 115]. Analiza wyników uzyskanych przy zastosowaniu mikromacierzy metylacyjnej (4.2.12) (Rys. 16) wykazała, że najwięcej różnic w profilach metylacji występuje pomiędzy dniem embrionalnym 15 i 16. Ze względu na

to, iż w embrionalnym dniu 16 zdolność do gojenia bezbliznowego może ulegać zanikowi, w analizie wyników skupiłam się na różnicach pomiędzy dniem E15 a dniem E18. Wiek embrionalny płodów z dnia E15, E16, E18 i E19 był potwierdzony nie tylko poprzez utworzenie czopa waginalnego po zapłodnieniu, ale również zweryfikowany przez porównanie ze skalą Theilera, obrazującą zmiany w rozwoju płodu myszy w poszczególnych dniach embrionalnych. Analizę danych ekspresyjnych i metylacyjnych ograniczono do porównania embrionów, u których na pewno obserwuje się podwyższone zdolności regeneracyjne (dzień E15) oraz płodów, u których z całą pewnością obserwuje się powstawanie blizny po zranieniu skóry grzbietowej (E18, E19).



Rys. 16. Liczba genów wykazujących znaczne różnice w poziomie metylacji w regionie promotorowym w skórze grzbietowej embrionów na różnych etapach rozwoju i u dorosłych myszy.

Ad - dorosłe myszy w wieku 3 miesięcy.

Pomiędzy dniem E15 i E18 obniżony poziom metylacji w obrębie TSS oraz wewnątrz genu wykazywały 342 geny, zaś 296 genów miało podwyższony poziom metylacji. Dla tak wyselekcjonowanych genów wykonano analizę ontologiczną przy użyciu programu DAVID (4.2.17), umożliwiającą przyporządkowanie genów do kategorii funkcjonalnych (Tab. 17). Wśród genów wykazujących obniżony poziom metylacji w dniu embrionalnym 15 wyróżniono grupy związane z regulacją transkrypcji, morfogenezą embrionalną, rozwojem gruczołów, nerwów, mezodermy i epidermy oraz funkcjami synaps. Ponadto 15 genów zostało zaklasyfikowanych do rodziny genów homeotycznych. Pośród genów o podwyższonym poziomie metylacji wyodrębniono grupy genów powiązane ze śmiercią komórkowa, różnicowaniem komórek nabłonka oraz odpowiedzią immunologiczną. Dodatkowo jednym z genów

o wyższym poziomie metylacji w dniu E15 w porównaniu do dnia E18 był gen *Hyal1*, kodujący hialuronidazę.

Tab. 17. Klaster genów wykazujących nadreprezentację wśród genów o obniżonym lub podwyższonym poziomie metylacji w regionie promotorowym i wewnątrz genu pomiędzy dniem E15 i E18 w skórze grzbietowej myszy.

Nadreprezentacja wskazanych grup genów spełniała kryterium istotności statystycznej (przy wartości $p < 0,05$), za wyjątkiem grup oznaczonych jako NS. Klaster genów oznaczone "*" spełniały kryterium istotności statystycznej przy wartości $q < 0,05$ po korekcie Benjaminiiego.

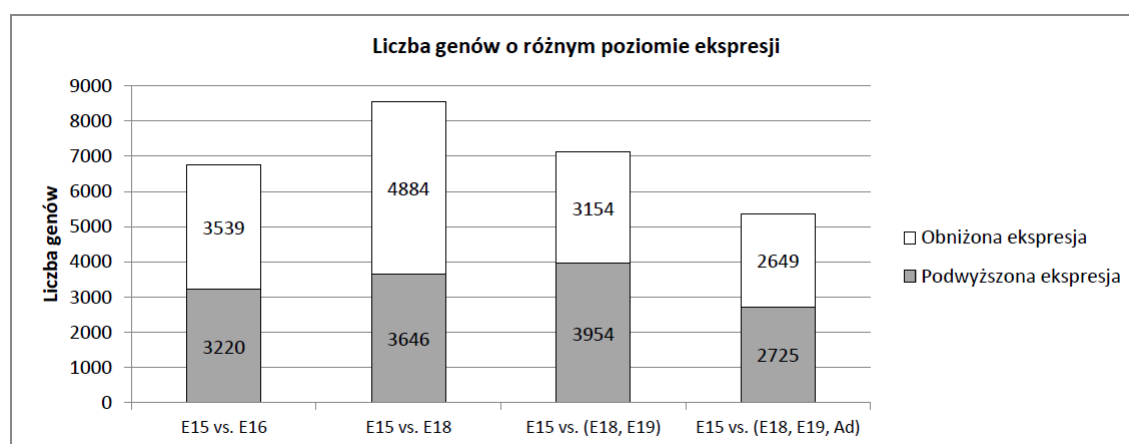
A) Obniżony poziom metylacji w E15 vs. E18	
GO:0006355~regulation of transcription, DNA-dependent*	<i>Bmi1, Cbx4, Pax5, Cask, Zfp872, Ybx1, Cttnb1, App, Tdgf1, Nr2f6, Hsf4, Mll3, Nr2f2, Bhlhe41, Ss18l1, Rxb, Mbd2, Hoxd8, Hoxd3, Foxc2, Zfpml, Kdm6b, Irx3, Tshz3, Hoxa13, Ube3a, Nr3c2, Nfix, Sfp1, Nr3c1, Sox9, Tnfrsf4, Hoxa3, Hand1, Hoxa5, Hoxa6, Lhx2, Hoxa7, Nfatc4, Hnrnpab, Sim2, Mafg, Smad6, Creb1, Klf11, Nr4a2, Rybp, Nr4a1, Ski, Smad2, Tbx1, Celsr2, Tead3, Dlx6os1, Hoxb1, Ebf4, Dlx6, Hoxb5, Csrnp1, Hoxb6, Bcl6b, Jak3, Zfhx3</i>
GO:0048598~embryonic morphogenesis*	<i>Bmi1, Hoxa13, Cttnb1, Atp2b2, Hoxa3, Chd7, Macf1, Hand1, Hoxa5, Hoxa6, Tdgf1, Hoxa7, Fbn2, Ski, Tbx1, Smad2, Shank3, Vegfc, Hoxb1, Dlx6, Hoxd3, Hoxb5, Hoxb6, Foxc2, Sp8</i>
IPR001356:Homeobox*	<i>Tshz3, Irx3, Hoxa13, Hoxb1, Hoxd8, Hoxa3, Hoxa5, Dlx6, Lhx2, Hoxd3, Hoxa6, Hoxb5, Hoxa7, Hoxb6, Zfhx3</i>
GO:0007498~mesoderm development *	<i>Macf1, Hand1, Lhx2, Foxc2, Smad2, Tbx1, Tcf15</i>
GO:0048732~gland development*	<i>Plag1, Hoxa13, Ube3a, Creb1, Tbx1, Nr3c1, Sox9, Mdk, Src, Cttnb1, Atp2b2, Hoxa3, Hoxa5, Hoxd3</i>
GO:0060429~epithelium development	<i>9030409G11RIK, Vegfc, Hoxa13, Hoxa5, Dlx6, Hoxb5, Smad2, Nr3c1, Sox9, Src, Shank3, Cttnb1</i>
GO:0001568~blood vessel development	<i>Vegfc, Chd7, Hoxa3, Hand1, Dll4, Tdgf1, Foxc2, Tbx1, Nr2f2, Cttnb1</i>
GO:0007389~pattern specification process*	<i>Bmi1, Irx3, Ring1, Celsr2, Smad2, Tbx1, Cttnb1, Hoxb1, Hoxa3, Hoxd8, Hoxa5, Hoxb5, Hoxa6, Ihx2, Hoxd3, Hoxa7, Tdgf1, Hoxb6, Foxc2, Sp8, Nr2f2, Tcf15, Sim2</i>
GO:0003002~regionalization*	<i>Bmi1, Irx3, Ring1, Celsr2, Smad2, Tbx1, Cttnb1, Hoxb1, Hoxa3, Hoxd8, Hoxa5, Hoxb5, Hoxa6, Ihx2, Hoxd3, Hoxa7, Tdgf1, Hoxb6, Foxc2, Sp8, Nr2f2, Tcf15</i>
GO:0048666~neuron development	<i>Atp2b2, App, Efnb3, Creb1, Ihx2, Mtap1b, Nr4a2, Nr2f6, Ntng2, Dst, Ss18l1</i>
GO:0045202~synapse	<i>Sept5, Grin2a, Cask, Nbea, Homer2, Shank3, Amph, App, Gp1bb, Grin2d, Prima1, Camk2a, Syt17, Chrng</i>
GO:0003707~steroid hormone receptor activity *	<i>Rxb, Nr3c2, Nr4a2, Nr2f6, Nr4a1, Nr3c1, Nr2f2</i>
IPR006210:EGF-like	<i>Ltp4, Dll4, Fbn1, Tdgf1, Ntng2, Lrp8, Celsr2, Fbn2, Adam15</i>
B) Podwyższony poziom metylacji w E15 vs. E18	
GO:0008219~cell death	<i>Ckap2, Prf1, Gulp1, Fam188a, Cxcr2, Sgms1, Il21, Bcap31, Wdr92, Naip6, Naip7, Bag4, Dap, Dram1</i>
Keratin	<i>Krt6a, Krtap3-2, Krt14, Krt2, Krtap16-7, Krt85</i>
GO:0030855~epithelial cell differentiation	<i>Krt6a, Psap, Ppl, Krt14, Fzd1, Wdr92</i>
GO:0006954~inflammatory response; GO:0009611~response to wounding (NS)	<i>Il1f8, Tnfrsf4, Mefv, Sgms1, Tpsb2</i>
domain: EGF-like (NS)	<i>Hyal1, Prf1, Zan, Hspg2</i>

Analiza mająca na celu porównanie utrzymujących się zmian w poziomie metylacji pomiędzy dniem E15 oraz E18, E19 i trzymiesięcznymi dorosłymi myszami szczepu C57BL/6J wykazała, że dla 58% genów zmiany w poziomie metylacji regionów promotorowych po dniu E15 utrzymują się aż do dorosłości.

5.3.3. Analiza zmian w poziomie globalnej ekspresji genów w trakcie rozwoju embrionalnego w skórze grzbietowej myszy

Globalna analiza zmian w poziomie ekspresji genów została wykonana dla skóry grzbietowej płodów z dnia embrionalnego 15, 16, 18, 19 oraz dla dorosłych myszy szczepu C57BL/6J (4.1.1) przy zastosowaniu mikromacierzy ekspresyjnej firmy NimbleGen (Roche) (4.2.13). Transkrypty wykazujące co najmniej dwukrotne różnice w poziomie ekspresji zostały uznane za różnie ekspresowane.

Liczba transkryptów wykazujących różnice w poziomie ekspresji pomiędzy dniem E15 a dniem E16, E18, E19 oraz dorosłymi myszami została pokazana na Rys. 17. Największe zmiany w poziomie ekspresji transkryptów zaobserwowano pomiędzy dniem E15 a E18. Jednak istotne zmiany w poziomie ekspresji genów po dniu E15 utrzymują się, aż do dorosłości. W celu sprawdzenia jakie funkcje pełnią geny wykazujące różnice w poziomie ekspresji pomiędzy E15 a E18, E19 i dorosłymi myszami przeprowadzono analizę w programie DAVID (4.2.17). Wyniki analizy przedstawiono w Tab. 18.



Rys. 17. Liczba genów wykazujących co najmniej dwukrotne różnice w poziomie ekspresji pomiędzy dniem E15 a dniem E16, E18, E19 i dorosłymi trzymiesięcznymi myszami (Ad) w skórze grzbietowej.

Tab. 18. Klastery genów wykazujących nadreprezentację wśród genów o obniżonym lub podwyższonym poziomie ekspresji pomiędzy dniem E15 a E18, E19 i dorosłymi myszami szczepu C57BL/6J w skórze grzbietowej.

W nawiasach podano liczby genów zaangażowane w dany proces. Nadreprezentacja wskazanych grup genów spełniała kryterium istotności statystycznej (przy wartości $p < 0,05$). Klastery genów oznaczone * spełniały kryterium istotności statystycznej przy wartości $q < 0,05$ po korekcie Benjaminięgo.

Podwyższony poziom ekspresji w E15 vs. E18, E19 i dorosłe myszy	Obniżony poziom ekspresji w E15 vs. E18, E19 i dorosłe myszy
<ul style="list-style-type: none"> ➤ GO:0006355~regulation of transcription, DNA-dependent (199)* ➤ GO:0048562~embryonic organ morphogenesis (33)* ➤ GO:0045202~synapse (158)* ➤ GO:0048666~neuron development (98)* ➤ GO:0030054~cell junction (149)* ➤ IPR001356:Homeobox (69)* ➤ IPR003598:Immunoglobulin subtype 2 (56)* ➤ GO:0006816~calcium ion transport (37)* ➤ GO:0050770~regulation of axonogenesis (14)* ➤ GO:0003002~regionalization (39)* ➤ GO:0030855~epithelial cell differentiation (21) 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ immune response (72)* ➤ IPR013783:Immunoglobulin-like fold (124)* ➤ GO:0009913~epidermal cell differentiation (22)* ➤ GO:0030216~keratinocyte differentiation (20)* ➤ Apoptosis (66)* ➤ GO:0031012~extracellular matrix (65)* ➤ GO:0030414~peptidase inhibitor activity (38)* ➤ GO:0006954~inflammatory response (69)* ➤ GO:0009611~response to wounding (91)* ➤ SP_PIR_KEYWORDS keratin (28) ➤ IPR013032:EGF-like region, conserved site (47) including <i>Hyal1</i>, <i>Hspg2</i>

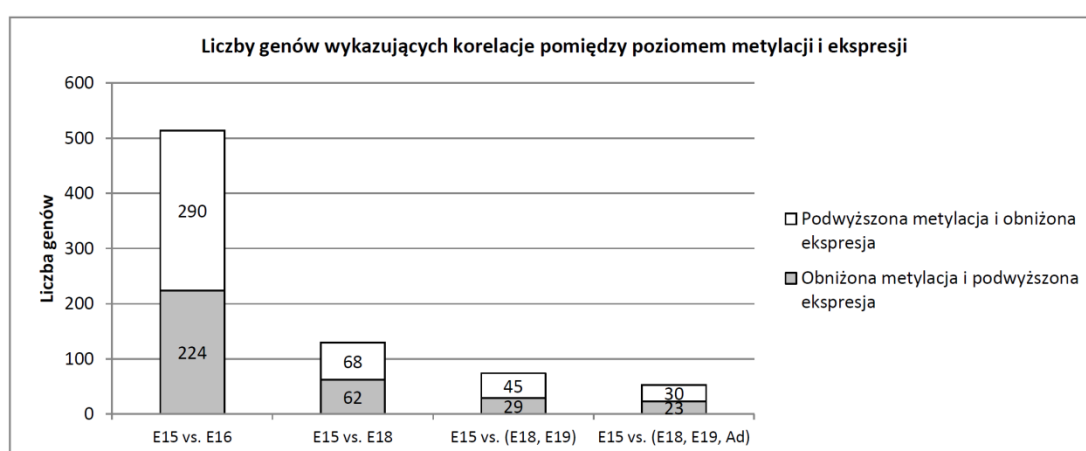
Analiza ontologiczna przy użyciu programu DAVID wykazała, że wśród transkryptów o podwyższonym poziomie ekspresji w dniu E15 w porównaniu do E18, E19 i dorosłych myszy nadreprezentowane są geny związane z regulacją transkrypcji, morfogenezą organów embrionalnych, rozwojem neuronów i funkcjami synaps, różnicowaniem komórek nabłonka oraz geny kodujące białka homeotyczne. Wśród transkryptów wykazujących co najmniej dwukrotnie niższy poziom ekspresji nadreprezentowane są geny związane z odpowiedzią immunologiczną oraz procesem gojenia ran. Również po dniu embrionalnym 15, aż do dorosłości obniżony poziom ekspresji wykazuje gen *Hyal1*, kodujący hialuronidazę oraz *Hspg2* kodujący białko perlekan oddziałujące z różnymi składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej.

5.3.4. Korelacje pomiędzy poziomem metylacji i ekspresji genów

Metylacja DNA w regionach promotorowych genów może wpływać na ich poziom ekspresji. Z reguły podwyższony poziom metylacji w obrębie TSS hamuje transkrypcję genów. W przypadku metylacji DNA w regionach wewnątrz genu, metylacja może ułatwiać elongację transkrypcji lub wpływać na alternatywne składanie egzonów. W związku z powyższym, w celu określenia potencjalnego wpływu zmian w poziomie metylacji na poziom ekspresji genów w trakcie rozwoju embrionalnego, do

porównania zostały wybrane tylko regiony promotorowe genów wykazujące zmiany w poziomie metylacji w rejonie związanym z początkiem startu transkrypcji (do 5000 pz powyżej i 1000 pz poniżej TSS).

Powyższe porównanie zmian w poziomie metylacji i poziomie ekspresji genów pomiędzy dniem embrionalnym E15 i pozostałymi badanymi próbkami skóry grzbietowej wykazało, że znaleziono pewną liczbę genów, w wypadku których zmiana poziomu metylacji DNA pod dniem E15 jest skorelowana negatywnie ze zmianami poziomu ekspresji (Rys. 18), czyli wzrost metylacji ze spadkiem ekspresji, a spadek metylacji z jej wzrostem.



Rys. 18. Liczby genów wykazujących podwyższony/obniżony poziom metylacji i odpowiednio obniżony/podwyższony poziom ekspresji między dniem E15 i pozostałymi dniami embrionalnymi i dorosłymi (Ad) myszami szczepu C57BL/6J w skórze grzbietowej.

W wyniku porównania zmian metylacji i ekspresji pomiędzy E15 i E18 znaleziono 130 genów wykazujących negatywne korelacje pomiędzy poziomem metylacji i poziomem ekspresji. Znaczna część spośród tych genów swój status metylacyjny i ekspresyjny utrzymuje po dniu E15 aż do dorosłości (Tab. 19).

Tab. 19. Geny wykazujące negatywne korelacje zmian statusu metylacji i poziomu ekspresji po dniu E15 w skórze płodowej myszy.

Ad - dorosłe myszy w wieku 3 miesiący.

Symbol genu	Nazwa genu	Obniżona metylacja w E15 vs.		Podwyższona metylacja w E15 vs.		Stosunek zmiany poziomu ekspresji E15 vs.		
		E18	E18& E19& Ad	E18	E18& E19& Ad	E18	E19	Ad
<i>Krt85</i>	keratin 85	-	-	+	+	0.02	0.02	0.01
<i>S100a3</i>	S100 calcium binding protein A3	-	-	+	+	0.04	0.05	0.01
<i>Xdh</i>	xanthine dehydrogenase	-	-	+	+	0.04	0.05	0.01
<i>Tnfrsf9</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	-	-	+	+	0.04	0.07	0.63
<i>AI317395</i>	expressed sequence AI317395	-	-	+	+	0.05	0.51	0.25
<i>Ly6d</i>	lymphocyte antigen 6 complex, locus D	-	-	+	+	0.06	0.05	0.04
<i>Lrrc39</i>	leucine rich repeat containing 39	-	-	+	+	0.06	0.09	0.07
<i>Clea5</i>	chloride channel calcium activated 5	-	-	+	+	0.08	0.08	0.02
<i>Dram1</i>	DNA-damage regulated autophagy modulator 1	-	-	+	+	0.13	0.15	0.19
<i>Krtap3-2</i>	keratin associated protein 3-2	-	-	+	+	0.15	0.14	0.02
<i>Car12</i>	carbonic anhydrase 12	-	-	+	+	0.16	0.18	0.15
<i>Ccdc144b</i>	coiled-coil domain containing 144B	-	-	+	+	0.19	0.59	0.97
<i>Cish</i>	cytokine inducible SH2-containing protein	-	-	+	+	0.19	0.29	0.37
<i>S100a4</i>	S100 calcium binding protein A4	-	-	+	+	0.21	0.15	0.02
<i>Hspg2</i>	perlecan (heparan sulfate proteoglycan 2)	-	-	+	+	0.21	0.21	0.33
<i>Gpr146</i>	G protein-coupled receptor 146	-	-	+	+	0.23	0.35	0.11
<i>Tcf23</i>	transcription factor 23	-	-	+	+	0.24	0.29	1.00
<i>Cass4</i>	Cas scaffolding protein family member 4	-	-	+	+	0.24	0.21	0.13
<i>Gabbr2</i>	gamma-aminobutyric acid (GABA) C receptor, subunit rho 2	-	-	+	+	0.26	0.20	2.02
<i>Mcee</i>	methylmalonyl CoA epimerase	-	-	+	+	0.26	0.51	0.46
<i>Naip6</i>	NLR family, apoptosis inhibitory protein 6	-	-	+	+	0.27	0.23	0.10
<i>Ephx3</i>	epoxide hydrolase 3	-	-	+	+	0.27	0.25	0.14
<i>Ankrd9</i>	ankyrin repeat domain 9	-	-	+	+	0.27	0.29	0.29
<i>Scgb1a1</i>	secretoglobin, family 1A, member 1 (uterglobin)	-	-	+	+	0.27	0.20	0.05
<i>Ext2</i>	exostoses (multiple) 2	-	-	+	+	0.28	0.15	0.92
<i>Dnahc8</i>	dynein, axonemal, heavy chain 8	-	-	+	+	0.29	0.36	0.52
<i>Krt2</i>	keratin 2	-	-	+	+	0.29	0.31	0.27
<i>Slc16a3</i>	solute carrier family 16, member 3	-	-	+	+	0.30	0.28	0.51
<i>Il17rb</i>	interleukin 17 receptor B	-	-	+	+	0.31	0.32	0.48
<i>Synpo</i>	Synaptopodin	-	-	+	+	0.31	0.26	0.10
<i>Asb14</i>	ankyrin repeat and SOCS box-containing 14	-	-	+	+	0.34	0.26	0.02
<i>Bola3</i>	boLA-like 3 (E. coli)	-	-	+	+	0.35	0.83	0.29
<i>Gfod1</i>	glucose-fructose oxidoreductase domain containing 1	-	-	+	+	0.35	0.32	0.08
<i>Fabp6</i>	fatty acid binding protein 6, ileal (gastrotopin)	-	-	+	+	0.37	0.35	0.18
<i>Gja3</i>	gap junction protein, alpha 3	-	-	+	+	0.38	0.29	1.15
<i>Hyal1</i>	hyaluronoglucosaminidase 1	-	-	+	+	0.39	0.39	0.30
<i>Rsu1</i>	Ras suppressor protein 1	-	-	+	+	0.39	0.33	0.16
<i>Tpsb2</i>	tryptase beta 2	-	-	+	+	0.39	0.33	2.19
<i>C330021F23Rik</i>	RIKEN cDNA C330021F23 gene	-	-	+	+	0.40	0.75	0.45

<i>Naip7</i>	NLR family, apoptosis inhibitory protein 7	-	-	+	+	0.40	0.35	0.10
<i>2610028H24Rik</i>	RIKEN cDNA 2610028H24 gene	-	-	+	+	0.41	0.55	0.94
<i>Pik3cg</i>	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide	-	-	+	+	0.43	0.35	0.39
<i>F630110N24Rik</i>	RIKEN cDNA F630110N24 gene	-	-	+	+	0.44	0.81	0.77
<i>Ifi202b</i>	interferon activated gene 202B	-	-	+	+	0.44	0.44	0.57
<i>Nubpl</i>	nucleotide binding protein-like	-	-	+	+	0.45	0.82	1.75
<i>Tpcn1</i>	two pore channel 1	-	-	+	+	0.48	0.63	0.71
<i>Rgs14</i>	regulator of G-protein signaling 14	-	-	+	+	0.49	0.60	0.08
<i>Adh7</i>	alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide	-	-	+	+	0.49	0.28	0.10
<i>Krt14</i>	keratin 14	-	-	+	+	0.50	0.48	0.39
<i>Immt</i>	inner membrane protein, mitochondrial	-	-	+	+	0.50	0.53	0.28
<i>Gpr120</i>	G protein-coupled receptor 120	-	-	+	-	0.01	0.05	0.10
<i>Il1f8</i>	interleukin 1 family, member 8	-	-	+	-	0.01	0.01	0.06
<i>Abo</i>	ABO blood group (transferase A, alpha 1-3-N-acetylgalactosaminyltransferase, transferase B, alpha 1-3-galactosyltransferase)	-	-	+	-	0.07	0.06	0.74
<i>Hsd17b14</i>	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 14	-	-	+	-	0.19	0.06	0.11
<i>Srl</i>	Sarcalumenin	-	-	+	-	0.23	0.19	0.12
<i>Sorbs1</i>	sorbin and SH3 domain containing 1	-	-	+	-	0.31	0.41	0.49
<i>Myl1</i>	myosin, light polypeptide 1	-	-	+	-	0.31	0.24	0.23
<i>C1qtnf1</i>	C1q and tumor necrosis factor related protein 1	-	-	+	-	0.32	0.27	0.17
<i>Sgms1</i>	sphingomyelin synthase 1	-	-	+	-	0.37	0.31	0.18
<i>Gm3417</i>	predicted gene 3417	-	-	+	-	0.39	0.35	0.33
<i>Gm3448</i>	predicted gene 3448	-	-	+	-	0.40	0.51	0.18
<i>A430078G23Rik</i>	RIKEN cDNA A430078G23 gene	-	-	+	-	0.40	0.70	0.60
<i>Cytip</i>	cytohesin 1 interacting protein	-	-	+	-	0.42	0.55	0.14
<i>Bcl2a1b</i>	B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1b	-	-	+	-	0.42	0.50	0.12
<i>Vkorc1</i>	vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1	-	-	+	-	0.46	0.42	0.35
<i>Znrf3</i>	zinc and ring finger 3	-	-	+	-	0.48	0.53	0.62
<i>Ifitm3</i>	interferon induced transmembrane protein 3	-	-	+	-	0.48	0.43	0.36
<i>Ccdc91</i>	coiled-coil domain containing 91	-	-	+	-	0.49	0.37	0.50
<i>Homer2</i>	homer homolog 2 (Drosophila)	+	-	-	-	2.03	0.99	0.59
<i>Nr2f2</i>	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	+	-	-	-	2.08	1.74	2.84
<i>Ube3a</i>	ubiquitin protein ligase E3A	+	-	-	-	2.48	1.45	0.98
<i>Snx10</i>	sorting nexin 10	+	-	-	-	2.82	3.33	1.23
<i>Slc37a1</i>	solute carrier family 37, member 1	+	-	-	-	3.18	2.90	0.67
<i>Pcbp3</i>	poly(rC) binding protein 3	+	-	-	-	3.33	2.94	8.75
<i>Chchd7</i>	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 7	+	-	-	-	3.34	2.62	2.55
<i>Igfbp2</i>	insulin-like growth factor binding protein 2	+	-	-	-	3.43	2.79	5.78
<i>Olfm1</i>	olfactomedin 1	+	-	-	-	3.75	2.77	3.22
<i>Slc4a3</i>	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 3	+	-	-	-	4.52	3.30	4.53
<i>Frs3</i>	fibroblast growth factor receptor substrate 3	+	-	-	-	4.93	5.29	9.44
<i>9030409G11Rik</i>	RIKEN cDNA 9030409G11 gene	+	-	-	-	4.98	3.81	6.02
<i>Kcnc3</i>	potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 3	+	-	-	-	5.00	4.96	8.53
<i>Dusp8</i>	dual specificity phosphatase 8	+	-	-	-	5.38	2.78	2.95
<i>Rxfp2</i>	relaxin/insulin-like family peptide receptor 2	+	-	-	-	5.52	3.67	6.15
<i>Gsbs</i>	G substrate	+	-	-	-	5.96	10.52	8.71

<i>Sh3gl3</i>	SH3-domain GRB2-like 3	+	-	-	-	6.39	3.87	24.14
<i>Ss18l1</i>	synovial sarcoma translocation gene on chromosome 18-like 1	+	-	-	-	6.82	6.59	4.90
<i>Hoxa6</i>	homeobox A6	+	-	-	-	8.06	5.41	7.34
<i>Apc2</i>	adenomatosis polyposis coli 2	+	-	-	-	13.80	8.36	3.00
<i>Hoxb5</i>	homeobox B5	+	-	-	-	16.20	17.00	9.13
<i>Lrp8</i>	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor	+	-	-	-	17.68	16.00	111.94
<i>Kcnc2</i>	potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 2	+	-	-	-	17.92	15.41	30.52
<i>Syt17</i>	synaptotagmin XVII	+	-	-	-	22.32	9.06	7.22
<i>Htr7</i>	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 7	+	-	-	-	23.66	12.19	62.59
<i>Grin2a</i>	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A (epsilon 1)	+	-	-	-	25.28	61.22	192.88
<i>Panx2</i>	pannexin 2	+	-	-	-	31.80	37.56	29.14
<i>Mab21l1</i>	mab-21-like 1 (C. elegans)	+	-	-	-	51.96	38.66	75.35
<i>Atp2b2</i>	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 2	+	-	-	-	79.98	108.25	60.95
<i>Disp2</i>	dispatched homolog 2 (Drosophila)	+	-	-	-	237.91	167.94	422.18
<i>Hsf4</i>	heat shock transcription factor 4	+	+	-	-	2.00	1.85	1.15
<i>Srgap1</i>	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1	+	+	-	-	2.02	1.89	3.72
<i>Bmi1</i>	Bmi1 polycomb ring finger oncogene	+	+	-	-	2.06	1.35	1.10
<i>Arhgap20</i>	Rho GTPase activating protein 20	+	+	-	-	2.14	1.63	1.38
<i>Zyg11b</i>	zyg-11 homolog B (C. elegans)	+	+	-	-	2.34	2.48	2.72
<i>Prdm6</i>	PR domain containing 6	+	+	-	-	2.39	1.89	5.39
<i>Fam125b</i>	family with sequence similarity 125, member B	+	+	-	-	2.47	2.25	4.13
<i>Eif1b</i>	eukaryotic translation initiation factor 1B	+	+	-	-	2.58	2.02	5.94
<i>Ubash3b</i>	ubiquitin associated and SH3 domain containing, B	+	+	-	-	2.61	2.01	1.88
<i>Zdhhc2</i>	zinc finger, DHHC domain containing 2	+	+	-	-	2.75	2.35	8.02
<i>Sox12</i>	SRY-box containing gene 12	+	+	-	-	2.82	1.98	10.80
<i>Mdk</i>	Midkine	+	+	-	-	2.98	2.64	15.52
<i>Hoxa3</i>	homeobox A3	+	+	-	-	2.99	3.92	4.82
<i>Epb4.11l</i>	erythrocyte protein band 4.1-like 1	+	+	-	-	3.11	3.14	3.68
<i>Fbnp1l</i>	formin binding protein 1-like	+	+	-	-	3.23	2.76	4.52
<i>Zswim6</i>	zinc finger, SWIM domain containing 6	+	+	-	-	3.25	2.29	12.96
<i>Gm347</i>	predicted gene 347	+	+	-	-	3.63	2.14	12.85
<i>Hoxb1</i>	homeobox B1	+	+	-	-	3.85	3.24	2.77
<i>Mbd2</i>	methyl-CpG binding domain protein 2	+	+	-	-	3.94	3.09	2.46
<i>Nsg1</i>	neuron specific gene family member 1	+	+	-	-	4.42	3.15	8.33
<i>Dlx6</i>	distal-less homeobox 6	+	+	-	-	5.12	8.48	6.13
<i>Hoxa5</i>	homeobox A5	+	+	-	-	5.77	5.90	5.87
<i>Rasd2</i>	RASD family, member 2	+	+	-	-	6.33	4.14	0.33
<i>Vstm2b</i>	V-set and transmembrane domain containing 2B	+	+	-	-	6.60	3.38	28.85
<i>Lrrn2</i>	leucine rich repeat protein 2, neuronal	+	+	-	-	7.70	3.98	26.79
<i>Cdc42</i>	cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae)	+	+	-	-	8.23	7.66	5.08
<i>Galnt14</i>	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14	+	+	-	-	13.14	12.38	14.31
<i>Efnb3</i>	ephrin B3	+	+	-	-	13.75	6.94	25.16
<i>Tmem150c</i>	transmembrane protein 150C	+	+	-	-	15.92	7.02	13.96
<i>Slc30a10</i>	solute carrier family 30, member 10	+	+	-	-	16.33	15.07	139.66
<i>Amph</i>	Amphiphysin	+	+	-	-	67.95	30.40	58.87
<i>Scrt1</i>	scratch homolog 1, zinc finger protein (Drosophila)	+	+	-	-	202.15	363.25	1199.74

Analiza funkcjonalna wykonana za pomocą programu DAVID (4.2.17) (Tab. 20) wykazała, że geny, dla których zaobserwowano wzrost metylacji i spadek ekspresji w dniu E18 w porównaniu do dnia E15 były głównie związane z morfogenezą organów embrionalnych, rozwojem synaps oraz rozwojem embrionalnym (geny homeotyczne). Natomiast geny, dla których wystąpił spadek metylacji i wzrost ekspresji w dniu E18 w porównaniu do dnia E15 były zaangażowane w odpowiedź immunologiczną (*Il1f8*, *Sgms1*, *Tpsb2* (wg Tab. 19)) oraz rozkład kwasu hialuronowego (*Hyal1*).

Tab. 20. Klaster genów wykazujących nadreprezentację wśród genów o różnym poziomie metylacji i ekspresji pomiędzy dniem E15 a dniem E18 w skórze grzbietowej myszy.

W nawiasach podano liczby genów zaangażowane w dany proces. Nadreprezentacja wskazanych grup genów spełniała kryterium istotności statystycznej (przy wartości $p < 0,05$), za wyjątkiem grup oznaczonych jako NS. Klaster genów oznaczone „*” spełniały kryterium istotności statystycznej przy wartości $q < 0,05$ po korekcie Benjaminiego.

Geny o obniżonym poziomie metylacji i podwyższonej ekspresji w dniu E15 vs. E18	Geny o podwyższonym poziomie metylacji i obniżonej ekspresji w dniu E15 vs. E18
<ul style="list-style-type: none"> ➤ GO:0048562~embryonic organ morphogenesis (8)* ➤ GO:0007389~pattern specification proces / GO:0003002~regionalization (7)* ➤ DNA-binding region: Homeobox (6) ➤ GO: 0044456~synapse part (4) NS 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ SP_PIR_KEYWORDS cell junction (6) ➤ IPR013032: EGF-like region, conserved site (4), including <i>Hyal1</i>, <i>Hspg2</i>; NS ➤ GO:0045095~keratin filament (4)

5.3.5. Odpowiedź na zranienie i odpowiedź zapalna

Pośród genów wykazujących różnice w poziomie ekspresji, pomiędzy dniem E15 a dniami E18, E19 oraz dorosłymi myszami, znacząca część zaangażowana jest w odpowiedź zapalną lub odpowiedź na zranienie. Większość genów związanych z procesem gojenia ran wykazuje obniżony poziom ekspresji lub podwyższony poziom metylacji w embrionalnym dniu E15 w porównaniu do pozostałych dni embrionalnych i dorosłych myszy, u których gojenie ran skóry grzbietowej jest związane z powstawaniem blizny. W Tab. 21 przedstawiono kluczowe geny zaangażowane w poszczególne etapy procesu gojenia ran skóry w zestawieniu ze zmianami w poziomie ich ekspresji w dniu E15. Listę kluczowych genów uczestniczących w odpowiedzi na zranienie i gojeniu ran skóry przygotowano wg przeglądowego artykułu Stroncek i Reichert, 2008 [116].

Tab. 21. Zmiany w poziomie ekspresji kluczowych genów związanych z gojeniem ran po tranzycji w skórze embrionów myszy .

Wybór kluczowych genów związanych z gojeniem ran skóry sporządzono na podstawie artykułu przeglądowego Stroncek i Reichert, 2008 [116]. Zmiany w poziomie ekspresji przedstawiono jako stosunek znormalizowanych mikromacierzowych sygnałów ekspresji dla E15 do E18, E19 i myszy dorosłej (Ad).

HEM- hemostaza; INF -odpowiedź zapalna; REP - naprawa; sREP - druga faza naprawy; pREP- pierwsza faza naprawy; REM - remodeling.

Skala	0.1	0.5	1.0	2.0	10.0
-------	-----	-----	-----	-----	------

Faza gojenia ran	Nazwa genu	Transkrypt	Symbol genu	Stosunek zmiany poziomu ekspresji E15 vs.		
				E18	E19	Ad
HEM	fibrinogen, B beta	BC031715	<i>Fgb</i>	3.01	0.81	2.66
HEM	integrin alpha 2b	BC120493	<i>Itga2b</i>	0.67	0.65	1.07
HEM	integrin beta 3	BC125518	<i>Itgb3</i>	0.34	0.38	1.39
HEM	platelet-derived growth factor alpha	AY324648	<i>Pdgfa</i>	0.53	0.57	1.29
HEM	platelet derived growth factor B	AK087840	<i>Pdgfb</i>	0.23	0.26	0.24
HEM	platelet-derived growth factor C	AK081347	<i>Pdgfc</i>	0.69	0.66	1.52
HEM/INF/REP/REM	transforming growth factor, beta 1	BC013738	<i>Tgfb1</i>	0.53	0.48	0.64
HEM/REP	fibrinogen, alpha	BC005467	<i>Fga</i>	4.31	0.98	6.43
HEM/secondary REP	vascular endothelial growth factor A	AY120866	<i>Vegfa</i>	0.30	0.43	1.33
INF	chemokine (C-C motif) ligand 2	BC145867	<i>Ccl2</i>	0.52	0.49	0.11
INF	chemokine (C-C motif) ligand 3	BC111443	<i>Ccl3</i>	1.00	1.72	3.48
INF	chemokine (C-C motif) ligand 4	BC119257	<i>Ccl4</i>	1.03	1.24	0.86
INF	chemokine (C-C motif) ligand 5	BC033508	<i>Ccl5</i>	0.58	1.09	0.14
INF	intercellular adhesion molecule	BC008626	<i>Icam1</i>	0.69	0.48	0.45
INF	interleukin 1 alpha	BC003727	<i>Il1a</i>	0.04	0.04	0.05
INF	activated spleen cDNA	AK157245	<i>Il1b</i>	0.42	0.37	0.13
INF	integrin beta 2	BC145644	<i>Itgb2</i>	0.36	0.43	0.05
INF	selectin, platelet (p-selectin) ligand	AK089214	<i>Selplg</i>	0.43	0.45	0.09
INF	thrombospondin 1	BC042422	<i>Thbs1</i>	0.71	0.62	0.67
INF	tumor necrosis factor	BC117057	<i>Tnf</i>	0.62	0.54	0.64
INF/pREP	vitronectin	BC012690	<i>Vtn</i>	4.71	4.51	5.28
INF/REP	fibronectin 1	BC099373	<i>Fn1</i>	0.46	0.41	0.33
pREP	epidermal growth factor	BC060741	<i>Egf</i>	0.32	0.22	0.21
pREP	fibroblast growth factor 7	AK033934	<i>Fgf7</i>	0.65	0.49	0.69
pREP	integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha)	BC050943	<i>Itga5</i>	0.71	0.50	2.08
pREP	10 days neonate cerebellum cDNA	AK140647	<i>Itgav</i>	0.77	0.42	0.24
pREP	integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	BC050906	<i>Itgb1</i>	0.77	0.65	0.72
pREP	integrin beta 6	AK008867	<i>Itgb6</i>	0.26	0.24	0.14
pREP	matrix metalloproteinase 10	BC130027	<i>Mmp10</i>	1.04	0.65	1.14
pREP	matrix metalloproteinase 11	AK165778	<i>Mmp11</i>	1.91	1.20	2.87
pREP	matrix metalloproteinase 12	AK171435	<i>Mmp12</i>	0.33	0.53	0.04
pREP	matrix metalloproteinase 13	BC125320	<i>Mmp13</i>	0.36	0.48	0.39
pREP	matrix metalloproteinase 14	BC076638	<i>Mmp14</i>	0.61	0.48	0.40
pREP	matrix metalloproteinase 15	BC047278	<i>Mmp15</i>	1.36	1.16	1.17
pREP	matrix metalloproteinase 16	AK046170	<i>Mmp16</i>	4.31	2.36	3.52
pREP	matrix metalloproteinase 17	BC051917	<i>Mmp17</i>	3.54	2.31	5.01
pREP	matrix metalloproteinase 19	BC112966	<i>Mmp19</i>	0.23	0.19	0.40
pREP	matrix metalloproteinase 1a	BC117756	<i>Mmp1a</i>	0.97	1.05	0.83
pREP	matrix metalloproteinase 1b	BC146301	<i>Mmp1b</i>	0.79	0.83	1.13
pREP	matrix metalloproteinase 2	BC070430	<i>Mmp2</i>	0.84	0.66	0.63
pREP	matrix metalloproteinase 20	BC152335	<i>Mmp20</i>	0.57	0.72	0.89
pREP	matrix metalloproteinase 21	BC106860	<i>Mmp21</i>	1.25	0.70	0.83
pREP	matrix metalloproteinase 23	BC107358	<i>Mmp23</i>	0.25	0.18	0.37
pREP	matrix metalloproteinase 24	BC156391	<i>Mmp24</i>	62.69	85.91	67.63
pREP	matrix metalloproteinase 25	BC112379	<i>Mmp25</i>	1.63	1.72	3.29
pREP	Matrix metalloproteinase-27	AK155813	<i>Mmp27</i>	0.12	0.04	0.02
pREP	matrix metalloproteinase 28 (epilysin)	AK151100	<i>Mmp28</i>	0.33	0.59	0.44
pREP	matrix metalloproteinase 3	BC006725	<i>Mmp3</i>	1.50	1.08	0.02
pREP	matrix metalloproteinase 7	BC119057	<i>Mmp7</i>	0.66	0.67	0.45
pREP	matrix metalloproteinase 8	BC042742	<i>Mmp8</i>	0.08	0.19	1.69
pREP	matrix metalloproteinase 9	BC046991	<i>Mmp9</i>	10.01	17.37	1.08
pREP	plasminogen activator	AK053476	<i>Plat</i>	2.01	1.88	1.34
pREP	plasminogen activator, urokinase	BC120709	<i>Plau</i>	0.41	0.35	0.15
pREP	transforming growth factor alpha	AK165017	<i>Tgfa</i>	0.30	0.31	0.11
sREP	fibroblast growth factor 2	BC156158	<i>Fgf2</i>	0.65	0.48	1.07
REM	actin, alpha 2	AK080187	<i>Acta2</i>	0.45	0.34	0.36
REM	collagen, type I, alpha 1	BC050014	<i>Colla1</i>	1.00	0.94	1.11
REM	Rho-associated coiled-coil containing protein	BC156147	<i>Rock1</i>	0.83	0.64	0.72
REM	Rho-associated coiled-coil containing protein	DQ864977	<i>Rock2</i>	0.19	0.14	0.29

Dodatkowo porównano geny wykazujące różnice w poziomie ekspresji pomiędzy dniem E15 a dniami E18, E19 i dorosłymi myszami oraz genami dla których eksperymentalnie, poprzez nokaut lub mutagenezę, potwierdzono wpływ na gojenie ran. W bazie danych "Resolve" (4.2.17) zamieszczonych jest 207 genów o zbadanym wpływie na proces gojenia ran skóry u myszy. Przeprowadzona analiza danych wykazała, że 69 genów, spośród 207, zamieszczonych w powyższej bazie danych, wykazuje co najmniej dwukrotne różnice w poziomie ekspresji pomiędzy dniem E15 a E18, E19 i dorosłymi myszami. Pośród tych 69 zidentyfikowanych genów, 58 wykazywało obniżony poziom ekspresji w dniu E15. Wybrane geny z tej grupy przedstawiono w Tab. 22. Geny o obniżonym poziomie ekspresji w dniu E15 są głównie zaangażowane w odpowiedź immunologiczną, natomiast geny o podwyższonym poziomie ekspresji mają pozytywny wpływ na proces gojenia ran.

Tab. 22. Geny wykazujące znaczne różnice w poziomie ekspresji w skórze płodowej po dniu E15, których wpływ na gojenie ran potwierdzono eksperymentalnie na modelach zwierzęcych w innych opublikowanych pracach.

Geny zostały wybrane z zestawienia zawartego w bazie "Resolve" (4.2.17). Zmiany w poziomie ekspresji przedstawiono jako stosunek znormalizowanych mikromacierzowych sygnałów ekspresji dla E15 do E18, E19 i myszy dorosłej (Ad).

Symbol genu	Nazwa genu	Zmiana poziomu ekspresji E15 względem		
		E18	E19	Ad
<i>Hspg2</i>	Perlecan	0,21	0,21	0,33
<i>Il1r1</i>	interleukin 1 receptor, type I	0,41	0,37	0,40
<i>Itgb2</i>	integrin beta 2	0,36	0,43	0,05
<i>Itgb6</i>	integrin beta 6	0,33	0,26	0,14
<i>Pik3cg</i>	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide	0,50	0,47	0,44
<i>Ppara</i>	peroxisome proliferator activated receptor alpha	0,03	0,22	0,20
<i>Selp</i>	selectin, platelet	0,11	0,08	0,22
<i>Slc11a1</i>	solute carrier family 11, member 1	0,45	0,48	0,11
<i>Thbd</i>	Thrombomodulin	0,45	0,38	0,28
<i>Tnfrsf1a</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	0,45	0,44	0,40
<i>Calca</i>	calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha	26,31	24,41	18,37
<i>Chrm3</i>	cholinergic receptor, muscarinic 3, cardiac	10,76	18,06	39,27
<i>Chrm4</i>	cholinergic receptor, muscarinic 4	2,66	2,04	6,45
<i>Cx3cl1</i>	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	2,30	2,47	3,04
<i>Edil3</i>	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3	28,02	8,85	45,75
<i>Hbegf</i>	heparin-binding EGF-like growth factor	2,79	2,12	4,20
<i>Npy2r</i>	neuropeptide Y receptor Y2	2,93	3,33	55,61
<i>Tert</i>	telomerase reverse transcriptase	2,76	2,05	14,81
<i>Vtn</i>	Vitronectin	4,71	4,51	5,28
	Skala	0,1	5,00	50,00

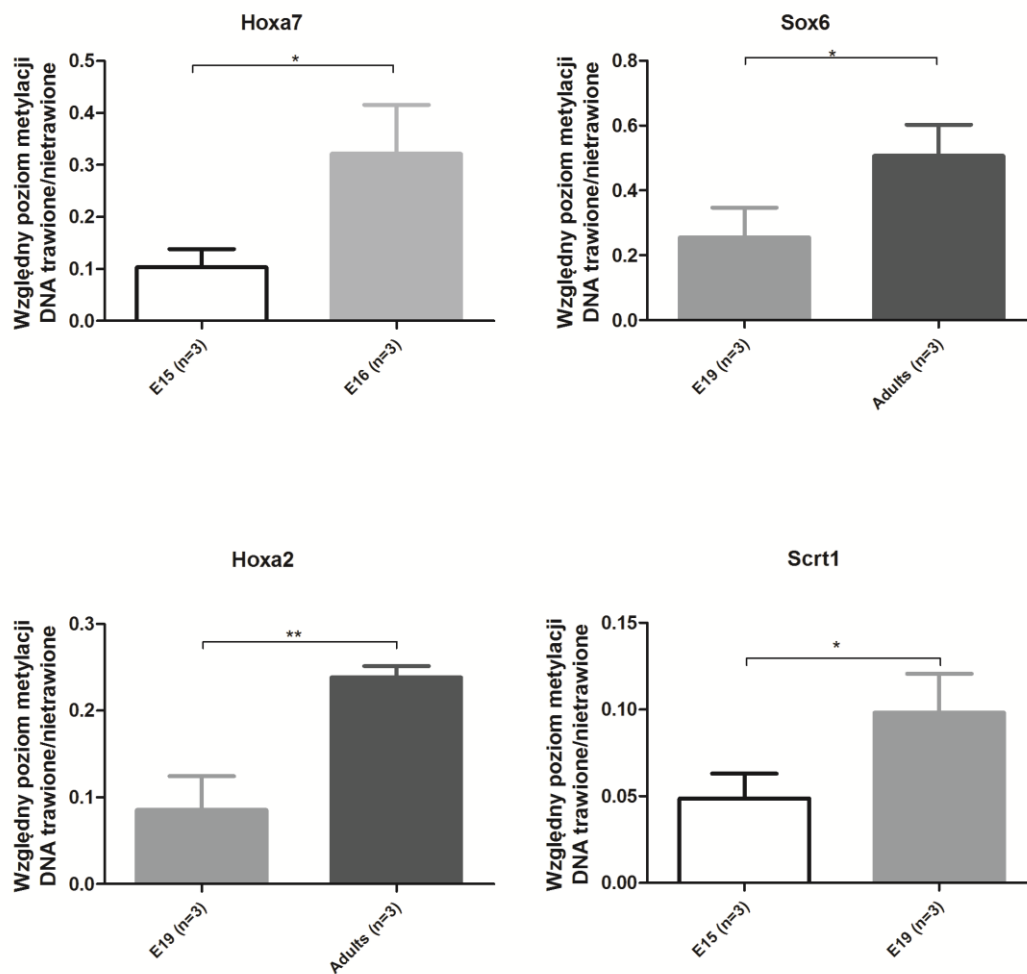
5.3.6. Analiza poziomu metylacji i ekspresji wybranych genów metodą PCR w czasie rzeczywistym

W celu potwierdzenia wyników uzyskanych przy zastosowaniu mikromacierzy ekspresyjnych i metylacyjnych wykonano analizę poziomu metylacji i ekspresji dla wybranych genów metodą PCR w czasie rzeczywistym (4.2.7).

Analizę zmian w poziomie metylacji przeprowadzono stosując metodę z użyciem endonukleazy restrykcyjnej *HpaII*, która jest wrażliwa na metylację reszty cytozyny występującej w dinukleotydzie CpG (4.2.6). Próbkę DNA genomowego traktowanego i nietraktowanego *HpaII* użyto jako matryc w analizach qPCR (4.2.7). W celu potwierdzenia zmian w poziomie metylacji pomiędzy próbkami skóry z różnego okresu rozwoju myszy, do analizy wybrano cztery regiony promotorowe różnych

genów: *Hoxa7*, *Sox6*, *Hoxa2* i *Scrt1* (Rys. 19). Istotność statystyczną wyznaczono stosując niesparowany, heteroskedastyczny, dwuskrzydłowy test t-Studenta (4.2.7).

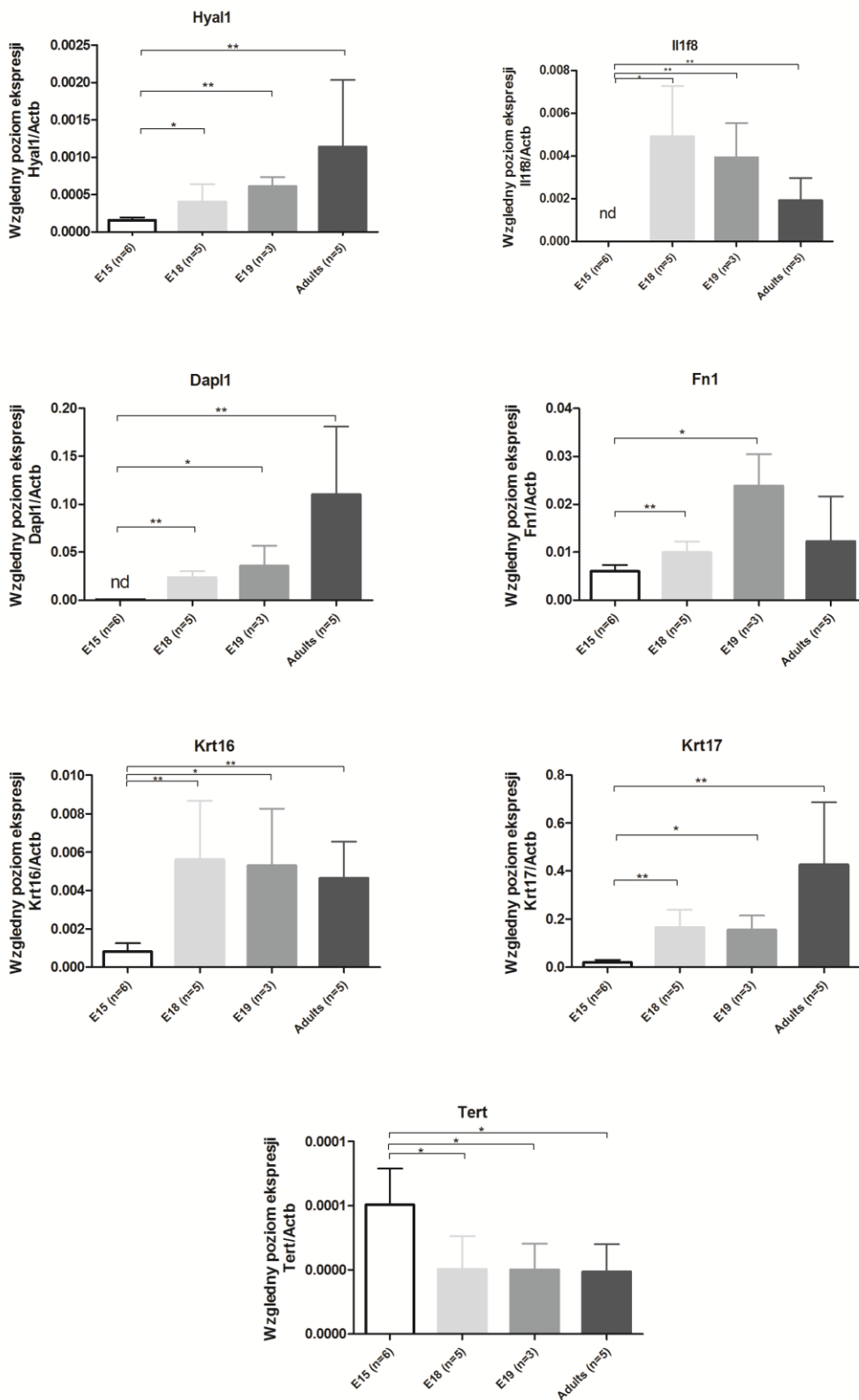
W celu potwierdzenia zmian w poziomie ekspresji wybranych genów na wyizolowanym RNA ze skóry grzbietowej płodów i dorosłych myszy (4.1.1) przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji (4.2.4 A) i dla tak otrzymanego cDNA wykonano reakcję qPCR (4.2.7). Do analizy wybrano transkrypty (*Hyal1*, *Il1f8*, *Dapl1*, *Fnl*, *Krt16*, *Krt17* i *Tert*) wykazujące różnice w poziomie ekspresji pomiędzy dniem E15 a dniami E18, E19 i dorosłymi myszami szczepu C57BL/6J (Rys. 20). Jako gen referencyjny zastosowano gen kodujący β -aktynę. Dodatkowo analiza zmian w poziomie ekspresji genów metodą qPCR została przeprowadzona dla dwóch różnych miotów myszy z dnia E15 oraz samców i samic z dnia E18, w celu potwierdzenia wyników na szerszej grupie myszy, a zwłaszcza w celu weryfikacji wyników w odniesieniu do innego miotu E15. Istotność statystyczną rezultatów wyznaczono stosując test Manna-Whitneya (4.2.7). Względny poziom ekspresji i metylacji genów obliczono zgodnie ze wzorem (1) (4.2.7).



Rys. 19. Weryfikacja mikromacierzowych oznaczeń metylacji DNA przy użyciu *HpaII* i qPCR.

Histogramy pokazują średnie relatywne poziomy metylacji regionów promotorowych wybranych genów w skórze płodowej myszy przed i po tranzykcji wyznaczone za pomocą trawienia enzymem restrykcyjnym wrażliwym na metylację CpG i metody ilościowego PCR.

*- wartość $p < 0.05$; **-wartość $p < 0.01$. Słupki błędów odpowiadają wartościom odchylenia standardowego.



Rys. 20. Weryfikacja mikromacierzowych oznaczeń ekspresji genów przy użyciu qPCR.

Histogramy pokazują średnie relatywne poziomy ekspresji transkryptów. * - wartość $p < 0.05$; ** - wartość $p < 0.01$. nd - nie wykryto ekspresji danego genu. Słupki błędów odpowiadają wartościom odchylenia standardowego.

6. Omówienie wyników i dyskusja

6.1. Model myszy MRL/MpJ

Mysz MRL/MpJ wykazuje podwyższoną odpowiedź regeneracyjną w różnych typach tkanek po ich uszkodzeniu, m.in. w małżowinie usznej, sercu, rdzeniu kręgowym, rogówce, tęczówce, ścięgnach. Przeprowadzone dotychczas badania na tym modelu myszy wskazały, że zdolność do bezbliznowego gojenia otworów wyciętych w małżowinie usznej myszy MRL/MpJ jest cechą wielogenową, jednak jednoznaczny genotyp regeneracyjny nie został dotąd wyjaśniony. Badania przeprowadzone w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej dotyczące analizy globalnych profili metylacji myszy MRL/MpJ oraz C57BL/6J wykazały, że wiele regionów promotorowych genów homeotycznych oraz związanych z morfogenezą embrionalną jest pozbawionych metylacji w przeciwieństwie do tych samych regionów promotorowych szczepu myszy C57BL/6J [37]. Dla wybranych genów (*Akr1e1*, *Barhl1* oraz *Tbrg1*) potwierdzono, metodą sekwencjonowania wodorosiarczynowego lub metodą przy użyciu enzymów restrykcyjnych wrażliwych na metylację CpG, różnice w poziomie metylacji między szczepem myszy MRL/MpJ a kontrolnym szczepem C57BL/6J. Mój udział w tych badaniach dotyczył głównie weryfikacji wyników uzyskanych przy zastosowaniu mikromacierzy metylacyjnej. Ze względu na to, iż wcześniejsze badania epigenetyczne na modelu myszy MRL/MpJ były przeprowadzone na grupie samców w wieku pięciu tygodni oraz ograniczone były jedynie do jednego szczepu kontrolnego myszy, nie zestawiono z nimi wyników z analizy globalnego poziomu ekspresji przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Moje badania na modelu myszy MRL/MpJ dotyczyły głównie analizy profili transkrypcji. Z perspektywy porównawczych badań transkryptomu i metylomu skóry płodowej, można dodać, że chociaż badania epigenetyczne wnoszą w odniesieniu do regeneracji znacznie więcej elementów nowości, to w badaniach transkryptomicznych znacznie łatwiej wykonać oznaczenia, analizy i weryfikację wyników. W badaniach transkryptomicznych każdemu transkryptowi przypisywana jest jedna wartość ekspresji, a w badaniach metylomu poszczególnym genom można przypisywać różne wartości poziomów metylacji wielu miejsc CpG zlokalizowanych w bardzo szerokim zakresie odległości od danego genu.

W celu wyznaczenia charakterystycznych profili ekspresji genów, które odróżniają badany szczep myszy od dwóch szczepów kontrolnych, wykonano analizę transkryptomu myszy MRL/MpJ, C57BL/6J oraz BALB/c w pięciu różnych tkankach: serca, wątroby, śledziony, szpiku kostnego i małżowiny usznej. Badania z zastosowaniem mikromacierzy ekspresyjnej zostały przeprowadzone na nieuszkodzonych tkankach myszy. Dzięki temu uzyskano wiarygodne wyniki dla populacji wielu typów komórek występujących w narządzie. Z pewnością wyniki uzyskane dla regenerujących się tkanek byłyby również interesujące, lecz przygotowanie odpowiednich próbek wymagałoby kosztownych, trudnych i czasochłonnych doświadczeń z użyciem wielu zwierząt, a niewłaściwa separacja tkanek z miejsc regenerujących się od nieuszkodzonych obszarów mogłaby wpłynąć na prawidłowość wyników, stąd badania przeprowadzono na tkankach nieuszkodzonych.

Analiza transkryptomyczna dla myszy MRL/MpJ i dwóch kontrolnych szczepów - C57BL/6J oraz BALB/c w tkance serca, śledziony, wątroby, małżowiny usznej i szpiku kostnego wykazała, że pomiędzy szczepami myszy występują znaczne różnice w poziomie ekspresji genów. Zastosowanie dwóch szczepów kontrolnych zwiększyło szansę na wyselekcjonowanie różnic w poziomie ekspresji, charakterystycznych dla szczepu myszy MRL/MpJ, a więc potencjalnie związanych z odpowiedzią regeneracyjną. Analiza mająca na celu wytypowanie transkryptów genów o charakterystycznym profilu ekspresji we wszystkich pięciu badanych tkankach umożliwiła identyfikację grupy genów o profilach ekspresji charakterystycznych dla myszy MRL/MpJ. W tej grupie znaleźć można następujące geny białkowych czynników regulatorowych takich jak *Cradd*, *Akr1e1* czy *Nsun3*. W celu oceny znaczenia tych genów dla potencjału regeneracyjnego myszy MRL/MpJ wskazane są badania ich aktywności w innych szczepach myszy, aby ustalić, czy rzeczywiście profile transkrypcji tych genów są unikalne dla myszy MRL/MpJ lub pomiary w komórkach macierzystych i tkankach płodowych albo noworodkowych, aby określić czy te transkrypty mogą być relikami embrionalnymi, czy wreszcie tzw. eksperymenty mechanistyczne mające za zadanie potwierdzenie ewentualnego wpływu tych genów na procesy regeneracji.

Innym podejściem, w celu znalezienia związku między profilami ekspresji genów u myszy MRL/MpJ a jej zdolnościami regeneracyjnymi, jest analiza ontologiczna dla grup transkryptów wykazujących znaczne (w tym wypadku co

najmniej dwukrotne) różnice w poziomie ekspresji między myszą MRL/MpJ a myszami szczepów kontrolnych w poszczególnych tkankach. Analiza z użyciem programu DAVID wykazała, że w każdej z badanych tkanek obniżonej ekspresji u myszy MRL/MpJ ulegają różne geny związane z odpowiedzią immunologiczną. Mysz MRL/MpJ, wraz z wiekiem, wykazuje skłonność do chorób układu immunologicznego, jak np. układowy toczeń rumieniowaty. Nietypowa odpowiedź układu immunologicznego na zranienia może wpływać na szybsze gojenie ran [117]. Należy jednak zwrócić uwagę, że u myszy MRL/MpJ obserwowane są efekty odpowiedzi autoimmunologicznej [1, 8], ale nie niedobory odporności. Początkowo podejrzewano, że mutacja w genie *Fas*, która skutkuje zahamowaniem apoptozy limfocytów u szczepu myszy MRL/lpr, jest odpowiedzialna za podwyższone zdolności regeneracyjne. Jednak zarówno szczep myszy MRL/lpr z mutacją w genie *Fas* oraz szczep pozbawiony mutacji (MRL/MpJ) wykazują podobne zdolności regeneracyjne [1]. Zatem w wypadku tego szczepu wpływ odpowiedzi immunologicznej na gojenie ran i regenerację wiąże się zapewne z jej nietypowym przebiegiem, ale nie ogólnym obniżeniem. Ponadto, wiadomo, iż odpowiedź immunologiczna oraz proces zapalny odgrywają ważną rolę w trakcie gojenia ran oraz w procesach regeneracyjnych [27, 117, 118].

Wśród transkryptów o podwyższonym poziomie ekspresji u myszy MRL/MpJ, w porównaniu do dwóch kontrolnych szczepów, w zależności od badanej tkanki, nadreprezentację wykazywały geny odpowiadające za wiązanie retinoidów lub metabolizm retinolu. Szlak kwasu retinowego jest kluczowy w trakcie rozwoju organizmu [119]. Wykazano także istotny wpływ pochodnej witaminy A na zdolności regeneracyjne i przebieg procesów regeneracji u niektórych organizmów takich jak ryba Danio pręgowany [120], aksolotl [121], czy inne płazy [5]. Profil retinoidów u myszy MRL/MpJ może być bardzo nietypowy w związku z podwyższoną ekspresją genów odpowiadających za ich metabolizm oraz wiążących retinol. Pomiar stężenia retinolu w pełnej krwi sześciu samic myszy MRL/MpJ oraz C57BL/6J metodą HPLC, wykazał, że poziom retinolu u myszy MRL/MpJ jest niższy w porównaniu do kontrolnego szczepu myszy. Wynik ten może świadczyć o szybszym rozkładzie retinolu, co można powiązać z podwyższonym stężeniem kwasu retinowego w tkankach myszy MRL/MpJ, a to z kolei mogłoby wpływać na zdolność do bezbliznowego gojenia ran, tak jak ma to miejsce u innych dobrze zbadanych modeli regeneracji. Z drugiej strony obniżony poziom retinolu może być odbiciem wyższych stężeń pochodnych tlenowych retinolu (jak np. kwas 4-okso-retinowy), które powstają w efekcie działania enzymów

należących do rodziny białek cytochromu P450, których transkrypty wykazują podwyższoną ekspresję w tkankach myszy MRL/MpJ. Nie zbadano dotąd profilu retinoidów u myszy MRL/MpJ. Wcześniejsze badania QTL, wykazały jedynie, że jednym z genów odpowiedzialnych za podwyższone zdolności regeneracyjne myszy MRL/lpr może być gen kodujący receptor gamma kwasu retinowego (*Rarg*, ang. *Retinoic acid receptor gamma*). Produkt białkowy genu *Rarg*, wpływa na proces różnicowania komórek naskórka oraz aktywuje geny homeotyczne [34]. Wyniki badań transkryptomicznych przedstawione w niniejszej pracy, dowiodły, że gen *Rarg* nie wykazuje istotnej różnicy w poziomie ekspresji pomiędzy badanymi szczepami myszy, jednak współdziałając z innymi genami uczestniczącymi w szlaku wiązania i metabolizmu retinoidów może odgrywać znaczącą rolę w procesie regeneracji.

Geny homeotyczne również wykazywały nadreprezentację wśród genów o podwyższonej ekspresji u myszy MRL/MpJ, w porównaniu do myszy C57BL/6J oraz BALB/c. Otrzymane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi, które wskazują na to, iż mysz MRL/MpJ posiada wiele cech metabolizmu embrionalnego [36], takich jak ekspresja genów homeotycznych. Porównanie z profilami transkrypcji w sercach embrionów i noworodków myszy C57BL/6J wskazuje z kolei na większe podobieństwo profili transkrypcji myszy MRL/MpJ do tych drugich w porównaniu z pierwszymi. Może to sugerować, że u MRL/MpJ obserwujemy raczej relikty noworodkowe, a nie embrionalne, chociaż niewątpliwie cechy neonatalne i embrionalne wykazują wiele zbieżności. Należy jednak podkreślić, że mysz MRL/MpJ wykazuje jedynie pewne cechy neotenu, ale nie jest organizmem neotenicznym w takim sensie jak np. aksolotl.

Geny związane z kategorią ontologiczną gojenia ran w tkankach uszu i śledziony wykazywały podwyższony poziom ekspresji. Wśród genów należących do danej kategorii w tkance uszu podwyższonej ekspresji ulega także gen *Shh*, którego ekspresja jest niezbędna w trakcie procesu regeneracji między innymi u kijanki żaby *Xenopus laevis*. Ponadto w sercu i uszach co najmniej dwukrotnie obniżoną ekspresję wykazują inne geny, także związane z odpowiedzią na zranienie. Warto zwrócić uwagę, że w literaturze naukowej opisano szereg przypadków, gdy wyłączenie ekspresji danego genu związanego z odpowiedzią na zranienie, powoduje paradoksalnie poprawione lub przyspieszone gojenie ran. Wykazano, że myszy z delecją genu *Cdkn1a* posiadają zdolność do bezbliznowego gojenia otworów wyciętych w małżowinie usznej [38], a delecja genu *Socs3* przyspiesza regenerację nerwu wzrokowego po jego uszkodzeniu

[122]. Także w przypadku myszy MRL/MpJ odmienny poziom ekspresji genów kodujących białka biorące udział w gojeniu ran może mieć wpływ na jej podwyższone zdolności regeneracyjne.

W tkance serca myszy MRL/MpJ zaobserwowano także nadreprezentację genów, o podwyższonym poziomie ekspresji, związanych ze szlakiem PPAR. Niektóre białka uczestniczące w szlaku PPAR regulują proliferację komórek satelitarnych i regenerację mięśni szkieletowych [123] oraz przyspieszają proces gojenia ran skóry [124]. Dwa kluczowe markery adipogenezy wykazywały podwyższony poziom ekspresji u badanego szczepu myszy: adiponektyna (*Adipoq*) oraz gen *Ucp1*. Wykazano, że produkt białkowy genu *Adipoq* może odgrywać istotną rolę w procesie gojenia ran skóry [125]. Wśród genów uczestniczących w powyższym szlaku wykazujących podwyższony poziom ekspresji w sercu myszy MRL/MpJ warto wymienić także gen *Ucp1*. Koduje on białko odpowiedzialne za przekształcanie trójacylogliceroli w energię uwalnianą w formie ciepła [126]. Ekspresja genu *Ucp1* jest obserwowana u niemowląt oraz u zwierząt zapadających w sen zimowy. Wykazano, że linie komórkowe H9c2, otrzymane z embrionalnej tkanki serca, transfekowane genem *Ucp1* posiadają wyższą odporność na uszkodzenia kardioblastów [127]. W związku z powyższym, podwyższony poziom ekspresji genu *Ucp1* może chronić serce przed uszkodzeniami [126]. Analiza zmian w globalnym poziomie ekspresji genów metodą sekwencjonowania drugiej generacji wykazała, że spośród genów wykazujących podwyższony poziom ekspresji w sercu myszy MRL/MpJ w porównaniu do dwóch kontrolnych szczepów, nadreprezentację wykazywały transkrypty związane ze szlakiem sygnałnym PPAR.

Podsumowując, podwyższone poziomy ekspresji genów należących do wymienionych powyżej szlaków mogą mieć kluczowe znaczenie dla potencjału regeneracyjnego myszy MRL/MpJ. Szczególnie istotną rolę mogą odgrywać geny związane ze szlakiem retinolu oraz genów kodujących białka homeotyczne.

Ponadto profile ekspresji genów w sercu dorosłej myszy MRL/MpJ wykazują podobieństwo do profili ekspresji tych genów w sercach embrionalnych oraz noworodkowych szczepu myszy C57BL/6J. Wśród genów wykazujących podwyższony poziom ekspresji w sercu dorosłej myszy MRL/MpJ, sercach embrionalnych oraz noworodkowych w porównaniu do dorosłych serc myszy C57BL/6J, można wyróżnić kilka genów homeotycznych. Obniżonej ekspresji ulegały natomiast geny związane

z odpowiedzią immunologiczną. Dodatkowo, podobne profile ekspresji w sercu myszy MRL/MpJ oraz sercach noworodkowych wykazywały geny związane ze szlakiem PPAR. Wcześniejsze badania Porrello i innych [7] wykazały, że serca myszy jednodniowych wykazują podwyższone zdolności regeneracyjne do piątego dnia po urodzeniu, po czym zanikają [7]. Podobieństwo w poziomie ekspresji różnych transkryptów w sercach dorosłych myszy MRL/MpJ oraz noworodkowych mogą wskazywać na to, iż potencjalnie te same czynniki transkrypcyjne są odpowiedzialne za zdolność do bezbliznowego gojenia ran serca w obu badanych przypadkach. Jednak należy dodać, jak wspomniano we wstępie, że możliwości regeneracyjne serca myszy MRL/MpJ są w świetle badań naukowych kwestią dyskusyjną.

Zbadanie poziomu ekspresji kilku wybranych genów metodą qPCR pozwoliło na potwierdzenie wyników uzyskanych przy zastosowaniu mikromacierzy ekspresyjnej. Powyższa analiza pozwoliła stwierdzić, że otrzymane wyniki z mikromacierzy są wiarygodne.

Warto podkreślić, że w opublikowanych dotąd pracach dotyczących analiz transkryptomu myszy MRL/MpJ nie wskazano na aktywację sygnalizacji PPAR i różnic w metabolizmie kwasu retinowego. Zapewne wynika to z innego podejścia, które zastosowano w badaniach przedstawionych w niniejszej pracy doktorskiej - czyli oparciu analiz o porównanie z dwoma różnymi szczepami kontrolnymi. Otrzymane wyniki badań poszerzają wiedzę na temat molekularnych podstaw potencjału regeneracyjnego szczepu myszy MRL/MpJ i wskazują na nowe, kluczowe geny, mogące odpowiadać za podwyższoną odpowiedź regeneracyjną.

6.2. Wpływ regulacji epigenetycznej na bezbliznowe gojenie ran skóry płodowej myszy

Do początków trzeciego trymestru ciąży płody wykazują podwyższone zdolności regeneracyjne. W przypadku płodów myszy ostatnim dniem w którym obserwuje się zdolność do bezbliznowego gojenia ran skóry grzbietowej jest embrionalny dzień 16 (dzień tranzycji) [45] lub embrionalny dzień 17 [48]. Po tym dniu skóra grzbietowa płodów wykazuje typową odpowiedź na zranienia obserwowaną w dorosłym organizmie. Liczne badania wskazują na to, iż za podwyższone zdolności regeneracyjne skóry embrionalnej odpowiadają m.in. podwyższony poziom kwasu hialuronowego, obniżona odpowiedź zapalna, czy odmienny poziom ekspresji

czynników wzrostu i genów homeotycznych [45]. Wykazano także, że na zdolność do bezbliznowego gojenia ran decydującego wpływu nie wywiera środowisko, w jakim żyją embriony [64]. W związku z tym zmiany w profilach metylacji DNA i ekspresji różnych genów, mogą odpowiadać za utratę zdolności regeneracyjnych skóry grzbietowej ssaków na początku trzeciego trymestru ciąży.

Przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej badania, miały na celu określenie zmian w profilach metylacji DNA w skórze grzbietowej płodów po dniu E15, czyli w embrionalnych dniach 16, 18 i 19 oraz u dorosłych trzymiesięcznych myszy szczepu C57BL/6J. Zmiany te mogą warunkować utratę zdolności do bezbliznowego gojenia ran po dniu E15. Największe zmiany w poziomie metylacji DNA zostały zaobserwowane pomiędzy E15 a E16, w którym odpowiedź regeneracyjna może jeszcze występować. Obserwowane zmiany w poziomie metylacji regionów promotorowych genów między dniem E15 i E16 trudno jednoznacznie powiązać z obniżeniem zdolności regeneracyjnych, ale niewątpliwie odzwierciedlają one dynamizm zmian w metylomie skóry w trakcie rozwoju embrionalnego.

W analizie powyższych wyników skoncentrowano się na porównaniu zmian epigenetycznych pomiędzy dniem E15 i E18. Wiele zmian w poziomie metylacji DNA obserwowanych pomiędzy dniem E15 i E18 utrzymuje się aż do dorosłości, w związku z czym mogą one odgrywać istotną rolę w utracie zdolności do bezbliznowego gojenia ran.

W celu sprawdzenia wpływu zmian epigenetycznych na poziom ekspresji genów, wykonano dodatkowo analizę wyników transkryptomicznych uzyskanych przy zastosowaniu mikromacierzy ekspresyjnej. Pośród genów wykazujących obniżony poziom metylacji w obrębie TSS i podwyższony poziom ekspresji pomiędzy dniem E15 oraz dniami E18, E19 i dorosłymi myszami szczepu C57BL/6J wiele zaangażowanych było w regulację transkrypcji, embrionalną morfogenezę, rozwój neuronów. Ponadto pośród genów o obniżonym poziomie metylacji w obrębie TSS oraz o podwyższonym poziomie ekspresji w dniu E15 w porównaniu do dnia E18, E19 i dorosłych myszy nadreprezentowane były geny homeotyczne. Wcześniejsze badania, przy zastosowaniu techniki qPCR oraz *in situ* hybrydyzacji, innych autorów dowiodły, że podwyższony poziom ekspresji genów homeotycznych: *Hoxa4*, *Hoxc4*, *Hoxa7*, *Hoxa5*, *Hoxb13* oraz *Prx2* może być kluczowy w trakcie procesu bezbliznowego gojenia ran skóry płodowej [60, 61]. Przeprowadzona analiza zmian w poziomie metylacji i ekspresji genów

między dniem E15 i E18 pozwoliła mi na zidentyfikowanie genów homeotycznych (*Hoxb1*, *Hoxa3*, *Dlx6*, *Hoxb5*, *Hoxa6*), których poziom ekspresji jest prawdopodobnie regulowany przez metylację DNA.

Analiza ontologiczna z użyciem programu DAVID również wykazała, że spośród genów o obniżonym poziomie metylacji i podwyższonym poziomie ekspresji w dniu E15, w porównaniu do E18, nadreprezentację wykazywały geny związane z rozwojem synaps (*Grin2a*, *Syt17*, *Homer2*, *Amph*). System nerwowy odgrywa ważną rolę w procesie regeneracji oraz gojenia ran skóry [128]. Wiadomo też, że utrata unerwienia zaburza proces gojenia ran u diabetyków [129]. W związku z powyższym, w przypadku gojenia ran skóry, regulacja epigenetyczna genów związanych z rozwojem komórek nerwowych może odgrywać zasadniczą rolę w procesie regeneracji u płodów przed dniem tranzykcji.

Wśród genów o obniżonej ekspresji w dniu E15 zdecydowana większość związana była z odpowiedzią immunologiczną oraz odpowiedzią na zranienie. Obniżona odpowiedź układu immunologicznego w trakcie procesu gojenia ran u płodu jest pozytywnie skorelowana z podwyższonymi zdolnościami regeneracyjnymi [50]. Jak przedstawiono w Tab. 21, większość genów uczestniczących w różnych etapach gojenia ran skóry wykazuje obniżony poziom ekspresji w dniu E15 w porównaniu do dni E18, E19 oraz dorosłych myszy. Tylko nieliczne geny, kodujące między innymi witronektynę (*Vtn*) oraz niektóre metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej wykazywały podwyższony poziom ekspresji. Ponadto znaczna część kluczowych genów o ustalonej roli w różnych fazach gojenia ran skóry, wykazuje różnice w ekspresji pomiędzy dniem E15 a E19, E18 i dorosłymi myszami. Przeważająca liczba spośród tych genów, w szczególności te, które działają w fazie zapalnej w trakcie gojenia rany, wykazuje obniżony poziom ekspresji.

Pośród genów o podwyższonym poziomie metylacji w dniu E15, w porównaniu do próbek kontrolnych, nie znaleziono genów wcześniej zidentyfikowanych jako kluczowe dla procesu bezbliznowego gojenia ran, takich jak *Il6*, *Il8* czy *Il10*. Jednak, powyższa analiza pozwoliła na wskazanie nowych genów odmiennie metylowanych i eksprymowanych przed tranzycją, które uczestniczą w odpowiedzi zapalnej na zranienie (*Il17rb*, *Ly6d*, *Cish*).

Ponadto, gen *Hyal1* wykazuje podwyższony poziom metylacji i obniżony poziom ekspresji w skórze grzbietowej płodów w dniu E15 w porównaniu do dnia E18,

E19 i trzymiesięcznych dorosłych myszy szczepu C57BL/6J. Gen *Hyal1* koduje enzym hialuronidazę 1 odpowiadający za rozkład kwasu hialuronowego. Wcześniejsze badania pokazały, że u płodów przed dniem tranzykcji poziom kwasu hialuronowego jest wyższy niż w skórze osobników dorosłych [53, 130]. Zmiana poziomu metylacji DNA w obrębie regionu promotorowego genu *Hyal1* po dniu embrionalnym 15 może być ściśle skorelowana ze wzrostem poziomu ekspresji tego genu i utratą zdolności regeneracyjnych.

Przestawione w niniejszej pracy wyniki badań wykazały, że geny związane z odpowiedzią immunologiczną i rozwojem układu nerwowego oraz geny homeotyczne mogą być potencjalnie odpowiedzialne za podwyższone zdolności regeneracyjne skóry grzbietowej płodu przed dniem tranzykcji. Jednakże, aktywację wymienionych genów związanych z rozwojem organizmu oraz represję genów odpowiedzialnych za odpowiedź immunologiczną, można także tłumaczyć zmianami rozwojowymi, które nie muszą wiązać się ze zdolnością do bezbliznowego gojenia ran skóry płodowej.

W celu znalezienia dodatkowych dowodów na rolę zidentyfikowanych genów w procesie regeneracji skóry można by było przeprowadzić badania *in vitro* w kulturach tkankowych, polegające na wyciszeniu lub aktywacji wybranych genów i zbadaniu ich wpływu na zdolność do proliferacji keratynocytów lub fibroblastów skóry. Ponadto można wykonać podobne badania metylacji DNA i ekspresji genów, jak przedstawione w niniejszej pracy, ale na modelu uszkodzonej skóry płodowej i sprawdzić jakie geny są szczególnie aktywne w procesie regeneracji. Dalsze badania mogłyby również opierać się na wyborze genów wykazujących różnice w poziomie metylacji i ekspresji po tranzykcji i przeprowadzeniu eksperymentów polegających na nokaucie lub mutagenizie tych genów i sprawdzeniu ich wpływu na proces gojenia ran *in vivo* na modelach zwierzęcych. Należy tu jednak podkreślić, że dla znacznej liczby spośród genów wykazujących różnice w poziomie ekspresji przed i po dniu tranzykcji udowodniono już eksperymentalnie wpływ na proces gojenia ran (geny wymienione w bazie danych "Resolve").

Dla wybranych genów zweryfikowano poziom metylacji DNA oraz ekspresji metodą PCR w czasie rzeczywistym. Przeprowadzona analiza metodą qPCR pozwoliła uznać wyniki uzyskane przy zastosowaniu mikromacierzy ekspresyjnej i metylacyjnej za wiarygodne. Ponadto analiza zmian w poziomie ekspresji genów metodą qPCR została przeprowadzona dla dodatkowego miotu myszy z dnia E15 (4 osobników),

samców i samic z dnia E18 oraz dodatkowych dwóch dorosłych osobników myszy szczepu C57BL/6J. Zastosowanie dodatkowych osobników miało na celu wykluczenie potencjalnych błędów związanych z określaniem wieku płodowego czy ewentualnych błędów w oznaczeniach mikromacierzowych.

Badania z zastosowaniem mikromacierzy metylacyjnej i ekspresyjnej dla skóry grzbietowej myszy pozwoliły na znalezienie istotnych zmian epigenetycznych i transkryptomycznych, które mogą być związane z utratą zdolności do bezbliznowego gojenia ran skóry grzbietowej po dniu E15. Zidentyfikowane różnice w poziomie metylacji i ekspresji genów pomiędzy dniem E15 i próbkami po dniu tranzycji były głównie związane z embriogenezą, funkcjami synaps, rozwojem nabłonka, odpowiedzią immunologiczną oraz degradacją kwasu hialuronowego. Stosunkowo niewielka liczba genów wykazywała negatywne korelacje pomiędzy zmianami w statusie metylacji i ekspresji genów w skórze grzbietowej następujących po dniu E15. Może to wynikać z tego, iż ekspresja genów jest regulowana przez wiele innych mechanizmów oprócz metylacji DNA. Ponadto, przedstawione tu analizy dotyczą jedynie genów wykazujących stosunkowo wysokie zmiany w poziomach metylacji i ekspresji. Jednak nawet stosunkowo nieliczne geny wykazujące negatywne korelacje zmian metylacji i ekspresji po utracie zdolności do bezbliznowego gojenia ran a także powiązane z tymi genami funkcje stanowią dość przekonujący dowód na rolę czynników epigenetycznych w zdolności do bezbliznowego gojenia ran skóry.

7. Podsumowanie

Podsumowując, wyniki oraz analizy przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej wnoszą nowy wkład do dotychczasowej wiedzy na temat molekularnych podstaw regeneracyjnych ssaków. Analiza uzyskanych wyników dla myszy MRL/MpJ oraz skóry grzbietowej płodów myszy C57BL/6J na różnym etapie rozwoju, pozwoliła na wyznaczenie nowych potencjalnych celów molekularnych, w tym szlak kwasu retinowego i szlak sygnalizacji PPAR, które w przyszłości mogą zostać zastosowane w terapiach regeneracyjnych. Przedstawione wyniki badań w niniejszej rozprawie doktorskiej dotyczące molekularnych podstaw potencjału regeneracyjnego ssaków są unikalne na skalę światową. W badaniach tych wykazano, że:

1. Cechą wspólną badanych modeli ssaczy była:
 - obniżona ekspresja transkryptów genów związanych z odpowiedzią immunologiczną (wspólne geny o obniżonej ekspresji w poszczególnych tkankach myszy MRL/MpJ oraz w tkance skóry z dnia E15);
 - podwyższona ekspresja szeregu genów związanych z funkcją synaps w tkankach uszu, serca, wątroby i śledziony myszy MRL/MpJ oraz w tkance skóry płodów myszy przed tranzycją;
 - podwyższona ekspresja genów homeotycznych (choć nie znaleziono tych samych genów homeotycznych dla obu modeli).
2. W przypadku myszy MRL/MpJ analiza transkryptomoczną wskazała na podwyższony poziom ekspresji genów związanych z metabolizmem lub wiązaniem retinolu oraz z szlakiem sygnalizacji PPAR. Powyższe transkrypty mogą odgrywać ważną rolę w podwyższonej odpowiedzi regeneracyjnej.
3. Wykazano podobieństwo w poziomie ekspresji różnych genów u myszy MRL/MpJ do poziomu ekspresji tych genów w sercach noworodkowych myszy.
4. Analiza zmian w poziomie metylacji oraz ekspresji zachodzących w skórze grzbietowej płodów po dniu E15 wykazała, że kluczowe znaczenie dla procesów regeneracyjnych mogą mieć geny związane z embriogenezą oraz geny związane z rozkładem kwasu hialuronowego, a w szczególności gen *Hyal1*.

5. Dynamiczne zmiany epigenetyczne w poziomie metylacji DNA mogą być jednym z kluczowych czynników odpowiedzialnych za utratę zdolności regeneracyjnych płodów po dniu embrionalnym 15.

8. Dorobek naukowy

Publikacje naukowe:

Górnikiewicz B., Ronowicz A., **Podolak J.**, Madanecki P., Stanisławska-Sachadyn A, Sachadyn P. *Epigenetic Basis of Regeneration: Analysis of Genomic DNA Methylation Profiles in the MRL/MpJ Mouse*; DNA RESEARCH 20, (2013), s.605-621;

Publikacje w recenzji:

Podolak-Popinigis J., Ronowicz A., Dmochowska, M., Jakubiak, A., Sachadyn P. *The methylome of murine foetal skin and scarless wound healing*;

Podolak-Popinigis J., Górnikiewicz B., Ronowicz A., Sachadyn P. *Transcriptome profiling reveals distinctive traits of retinol metabolism and neonatal parallels in the MRL/MpJ mouse*;

Zgłoszenia patentowe:

Krajowe zgłoszenie patentowe nr P.407389. Sachadyn P., **Podolak J.**, Banasik M.: *Sposób selektywnego wychwytywania fragmentów DNA zawierających niesparowane zasady przez białko MutS immobilizowane w fazie stałej oraz ich kolorymetrycznego oznaczania i ilościowej analizy.*

Plakaty

1. Sass P., **Podolak J.**, Górnikiewicz B., Sachadyn P.: *Transcriptomic signature of tissue injury: Meta-analysis of microarray gene expression data*; Acta Biochimica Polonica. Supplement. -Vol. 60., nr. suppl. 2, 2013;
2. Górnikiewicz B., **Podolak J.**, Madanecki P., Ronowicz A., Sachadyn P.: *The epigenetic basis of the regeneration phenomenon in the MRL/MpJ mouse*; The molecular & cellular basis of regeneration & tissue repair; Oxford, 2-6.09.2012;
3. Sachadyn P., Górnikiewicz B., **Podolak J.** : *Regeneration and epigenetics*; I Ogólnopolskie Sympozjum Interdyscyplinarne Inter-Mix: Nowe idee w naukach przyrodniczych, Pułtusk (Polska), 2013;
4. **Podolak J.**, Górnikiewicz B., Ronowicz A., Madanecki P., Sachadyn P.: *Epigenetic regulation and regeneration: the search for differentially methylated*

genes in the MRL mouse; Acta Biochimica Polonica. Supplement. -Vol. 59., nr. 3; 2012; Poznań;

5. **Podolak-Popinigis J.**, Górnikiewicz B., Ronowicz A., Madanecki P., Sachadyn P.: *Genome-wide transcriptomic profiling of the MRL/MpJ mouse, the mammalian model of regeneration*; The molecular & cellular basis of regeneration & tissue repair, EMBO Conference, Sant Feliu de Guixols, Spain, 6-10.09.2014;
6. Górnikiewicz B., Ronowicz A., Krzemiński M., **Podolak-Popinigis J.**, Sachadyn P.: *Genome-wide DNA methylation profiles of the neonatal murine heart*; The molecular & cellular basis of regeneration & tissue repair, EMBO Conference, Sant Feliu de Guixols, Spain, 6-10.09.2014;
7. Górnikiewicz B., **Podolak-Popinigis J.**, Ronowicz A., Stanisławska-Sachadyn A., Madanecki P., Sachadyn P.: *Genome-wide DNA methylation profiles in the MRL/MpJ mouse and the epigenetic basis of regeneration*; The molecular & cellular basis of regeneration & tissue repair, EMBO Conference, Sant Feliu de Guixols, Spain, 6-10.09.2014.

Wystąpienia ustne

1. **Podolak J.:** *Metylotransferazy ssaków, inhibitory i aktywatory*; Młodzi Naukowcy dla Polskiej Nauki (12-14.04.2013, Gdańsk).
2. **Podolak-Popinigis J.** *Kwas retinowy jako czynnik stymulujący regenerację*; Konferencja młodych naukowców: Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki VI edycja (Gdańsk, 25.04-27.04.2014).

Granty:

Grant NCN 2011/01/B/NZ2/05352 - wykonawca projektu realizowanego w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej pod kierownictwem dr hab. inż. Pawła Sachadyna: *Epigenetyczne podstawy regeneracji ssaków: badanie profilu metylacji DNA myszy MRL*; czas realizacji: 2011-2014.

Stypendia:

1. Laureatka stypendium projakościowego za osiągnięcia naukowe w roku akademickim 2011/2012.
2. Laureatka stypendium za osiągnięcia naukowe w roku akademickim 2013/2014.
3. Laureatka stypendium za osiągnięcia naukowe z projektu „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii” (Projekt InterPhd) w roku akademickim 2014/2015.
4. Laureatka stypendium wyjazdowego finansowanego w ramach projektu „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii” (InterPhd) w roku akademickim 2013/2014.

9. Spis symboli i skrótów

DNA	kwask deoksyrybonukleinowy;
cDNA	ang. <i>complementary DNA</i> ; pol. komplementarne DNA;
ds cDNA	ang. <i>double stranded cDNA</i> ; pol. dwuniciowe komplementarne DNA;
dNTPs	ang. <i>deoxynucleotide triphosphates</i> ; pol. trifosforany deoksyrybonukleozydów;
EDTA	wersenian disodowy;
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> ;
HRM	<i>High Resolution Melting</i> ;
M	stężenie molowe;
MRL	<i>Murphy Roths Large</i> ;
NGS	<i>Next- Generation Sequencing</i> ;
PCR	ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i> ; pol. łańcuchowa reakcja polimerazy;
pz	par zasad;
RNA	kwask rybonukleinowy;
mRNA	matrycowy RNA;
tRNA	transportujący RNA;
qPCR	ang. <i>quantitative PCR</i> , pol. ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy;
SD	ang. <i>Standard Deviation</i> ; pol. odchylenie standardowe;
SDS	ang. <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> ; pol. dodecylosiarczan sodu;
TAE	bufor o składzie zasada Tris, kwas octowy, wersenian disodowy;
Tris	2-amino-2-(hydroksymetylo)-1,3-propanodiol;
TSS	ang. <i>Transcription Start Site</i> ; pol. początek startu transkrypcji;
U	ang. <i>Units</i> ; jednostka aktywności enzymu;
UV	ang. <i>Ultra Violet</i> ; pol. promieniowanie ultrafioletowe
UV-DAD	<i>Ultra Violet - Diode Array Detector</i> ;

10. Literatura

1. Clark LD, Clark RK, Heber-Katz E: **A new murine model for mammalian wound repair and regeneration.** *Clinical immunology and immunopathology* 1998, **88**(1):35-45.
2. Suzuki M, Yakushiji N, Nakada Y, Satoh A, Ide H, Tamura K: **Limb regeneration in *Xenopus laevis* froglet.** *TheScientificWorldJournal* 2006, **6 Suppl 1**:26-37.
3. Singh BN, Koyano-Nakagawa N, Garry JP, Weaver CV: **Heart of newt: a recipe for regeneration.** *Journal of cardiovascular translational research* 2010, **3**(4):397-409.
4. Yakushiji N, Suzuki M, Satoh A, Sagai T, Shiroishi T, Kobayashi H, Sasaki H, Ide H, Tamura K: **Correlation between Shh expression and DNA methylation status of the limb-specific Shh enhancer region during limb regeneration in amphibians.** *Developmental biology* 2007, **312**(1):171-182.
5. Yakushiji N, Yokoyama H, Tamura K: **Repatterning in amphibian limb regeneration: A model for study of genetic and epigenetic control of organ regeneration.** *Seminars in cell & developmental biology* 2009, **20**(5):565-574.
6. Tamura K, Ohgo S, Yokoyama H: **Limb blastema cell: a stem cell for morphological regeneration.** *Development, growth & differentiation* 2010, **52**(1):89-99.
7. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, Sadek HA: **Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart.** *Science* 2011, **331**(6020):1078-1080.
8. Furukawa F, Kanauchi H, Wakita H, Tokura Y, Tachibana T, Horiguchi Y, Imamura S, Ozaki S, Takigawa M: **Spontaneous autoimmune skin lesions of MRL/n mice: autoimmune disease-prone genetic background in relation to Fas-defect MRL/1pr mice.** *The Journal of investigative dermatology* 1996, **107**(1):95-100.
9. Buckley G, Metcalfe AD, Ferguson MW: **Peripheral nerve regeneration in the MRL/MpJ ear wound model.** *Journal of anatomy* 2011, **218**(2):163-172.
10. Li X, Gu W, Masinde G, Hamilton-Ulland M, Xu S, Mohan S, Baylink DJ: **Genetic control of the rate of wound healing in mice.** *Heredity* 2001, **86**(Pt 6):668-674.
11. Heber-Katz E: **The regenerating mouse ear.** *Seminars in cell & developmental biology* 1999, **10**(4):415-419.
12. Colwell AS, Krummel TM, Kong W, Longaker MT, Lorenz HP: **Skin wounds in the MRL/MPJ mouse heal with scar.** *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2006, **14**(1):81-90.
13. Leferovich JM, Bedelbaeva K, Samulewicz S, Zhang XM, Zwas D, Lankford EB, Heber-Katz E: **Heart regeneration in adult MRL mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(17):9830-9835.
14. Hunt DLC, P.H.; Zambon, A.C.; Vranizan, K.; Evans, S.M.; Kuo, HCh.; Yamaguchi, K.D.; Omens, J.H.; McCulloch, A.D.: **Early post-myocardial infarction survival in MRL mice is mediated by attenuated apoptosis and inflammation but depends on genetic background.** *Exp Physiol* 2012, **97**(1):102-114.

15. Naseem RH, Meeson AP, Michael Dimaio J, White MD, Kallhoff J, Humphries C, Goetsch SC, De Windt LJ, Williams MA, Garry MG *et al*: **Reparative myocardial mechanisms in adult C57BL/6 and MRL mice following injury.** *Physiological genomics* 2007, **30**(1):44-52.
16. Heber-Katz E, Leferovich J, Bedelbaeva K, Gourevitch D, Clark L: **The scarless heart and the MRL mouse.** *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 2004, **359**(1445):785-793.
17. Robey TE, Murry CE: **Absence of regeneration in the MRL/MpJ mouse heart following infarction or cryoinjury.** *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 2008, **17**(1):6-13.
18. Abdullah I, Lepore JJ, Epstein JA, Parmacek MS, Gruber PJ: **MRL mice fail to heal the heart in response to ischemia-reperfusion injury.** *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2005, **13**(2):205-208.
19. Moseley FF, ME; Lockwood, W; Marber, MS; Bicknel, I KA; Valasek, P; Brooks, G.: **Limitations of the MRL mouse as a model for cardiac regeneration.** *J Pharm Pharmacol* 2011, **63**(5):648-656.
20. Grisel P, Meinhardt A, Lehr HA, Kappenberger L, Barrandon Y, Vassalli G: **The MRL mouse repairs both cryogenic and ischemic myocardial infarcts with scar.** *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 2008, **17**(1):14-22.
21. Cimini M, Fazel S, Fujii H, Zhou S, Tang G, Weisel RD, Li RK: **The MRL mouse heart does not recover ventricular function after a myocardial infarction.** *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 2008, **17**(1):32-39.
22. Thuret S, Thallmair M, Horky LL, Gage FH: **Enhanced functional recovery in MRL/MpJ mice after spinal cord dorsal hemisection.** *PloS one* 2012, **7**(2):e30904.
23. Chadwick RB, Bu L, Yu H, Hu Y, Wergedal JE, Mohan S, Baylink DJ: **Digit tip regrowth and differential gene expression in MRL/MpJ, DBA/2, and C57BL/6 mice.** *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2007, **15**(2):275-284.
24. Gourevitch DL, Clark L, Bedelbaeva K, Leferovich J, Heber-Katz E: **Dynamic changes after murine digit amputation: the MRL mouse digit shows waves of tissue remodeling, growth, and apoptosis.** *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2009, **17**(3):447-455.
25. Tucker B, Klassen H, Yang L, Chen DF, Young MJ: **Elevated MMP Expression in the MRL Mouse Retina Creates a Permissive Environment for Retinal Regeneration.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2008, **49**(4):1686-1695.
26. Xia H, Krebs MP, Kaushal S, Scott EW: **Enhanced retinal pigment epithelium regeneration after injury in MRL/MpJ mice.** *Experimental eye research* 2011, **93**(6):862-872.
27. Ueno M, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Shaffer DJ, Roopenian DC, Shultz LD: **Accelerated wound healing of alkali-burned corneas in MRL mice is associated with a reduced inflammatory signature.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2005, **46**(11):4097-4106.

28. Fitzgerald J, Rich C, Burkhardt D, Allen J, Herzka AS, Little CB: **Evidence for articular cartilage regeneration in MRL/MpJ mice.** *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 2008, **16**(11):1319-1326.
29. Mak J, Leonard C, Foniok T, Rushforth D, Dunn JF, Krawetz R: **Evaluating endogenous repair of focal cartilage defects in C57BL/6 and MRL/MpJ mice using 9.4T magnetic resonance imaging: A pilot study.** *Magnetic resonance imaging* 2015, **33**(5):690-694.
30. Lalley AL, Dymont NA, Kazemi N, Kenter K, Gooch C, Rowe DW, Butler DL, Shearn JT: **Improved biomechanical and biological outcomes in the MRL/MpJ murine strain following a full-length patellar tendon injury.** *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2015.
31. Masinde GL, Li X, Gu W, Davidson H, Mohan S, Baylink DJ: **Identification of wound healing/regeneration quantitative trait loci (QTL) at multiple time points that explain seventy percent of variance in (MRL/MpJ and SJJ/J) mice F2 population.** *Genome research* 2001, **11**(12):2027-2033.
32. Gourevitch D, Clark L, Chen P, Seitz A, Samulewicz SJ, Heber-Katz E: **Matrix metalloproteinase activity correlates with blastema formation in the regenerating MRL mouse ear hole model.** *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2003, **226**(2):377-387.
33. Heber-Katz E, Chen P, Clark L, Zhang XM, Troutman S, Blankenhorn EP: **Regeneration in MRL mice: further genetic loci controlling the ear hole closure trait using MRL and M.m. Castaneus mice.** *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2004, **12**(3):384-392.
34. McBrearty BA, Clark LD, Zhang XM, Blankenhorn EP, Heber-Katz E: **Genetic analysis of a mammalian wound-healing trait.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(20):11792-11797.
35. Yu H, Mohan S, Masinde GL, Baylink DJ: **Mapping the dominant wound healing and soft tissue regeneration QTL in MRL x CAST.** *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 2005, **16**(12):918-924.
36. Naviaux RK, Le TP, Bedelbaeva K, Leferovich J, Gourevitch D, Sachadyn P, Zhang XM, Clark L, Heber-Katz E: **Retained features of embryonic metabolism in the adult MRL mouse.** *Molecular genetics and metabolism* 2009, **96**(3):133-144.
37. Gornikiewicz B, Ronowicz A, Podolak J, Madanecki P, Stanislawska-Sachadyn A, Sachadyn P: **Epigenetic basis of regeneration: analysis of genomic DNA methylation profiles in the MRL/MpJ mouse.** *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 2013, **20**(6):605-621.
38. Bedelbaeva K, Snyder A, Gourevitch D, Clark L, Zhang XM, Leferovich J, Cheverud JM, Lieberman P, Heber-Katz E: **Lack of p21 expression links cell cycle control and appendage regeneration in mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**(13):5845-5850.
39. Masinde G, Li X, Baylink DJ, Nguyen B, Mohan S: **Isolation of wound healing/regeneration genes using restrictive fragment differential display-**

- PCR in MRL/MPJ and C57BL/6 mice.** *Biochemical and biophysical research communications* 2005, **330**(1):117-122.
40. Li X, Mohan S, Gu W, Baylink DJ: **Analysis of gene expression in the wound repair/regeneration process.** *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 2001, **12**(1):52-59.
41. Canhamero T, Garcia LV, De Franco M: **Acute Inflammation Loci Are Involved in Wound Healing in the Mouse Ear Punch Model.** *Advances in wound care* 2014, **3**(9):582-591.
42. Gawronska-Kozak B, Bogacki M, Rim JS, Monroe WT, Manuel JA: **Scarless skin repair in immunodeficient mice.** *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2006, **14**(3):265-276.
43. Manuel JA, Gawronska-Kozak B: **Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is upregulated during scarless wound healing in athymic nude mice.** *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2006, **25**(8):505-514.
44. Gawronska-Kozak B: **Scarless skin wound healing in FOXN1 deficient (nude) mice is associated with distinctive matrix metalloproteinase expression.** *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2011, **30**(4):290-300.
45. Wilgus TA: **Regenerative healing in fetal skin: a review of the literature.** *Ostomy/wound management* 2007, **53**(6):16-31; quiz 32-13.
46. Lorenz HP, Longaker MT, Perkocho LA, Jennings RW, Harrison MR, Adzick NS: **Scarless wound repair: a human fetal skin model.** *Development* 1992, **114**(1):253-259.
47. Ferguson MW, O'Kane S: **Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention.** *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 2004, **359**(1445):839-850.
48. Colwell AS, Longaker MT, Peter Lorenz H: **Identification of differentially regulated genes in fetal wounds during regenerative repair.** *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2008, **16**(3):450-459.
49. Schultz GS, Wysocki A: **Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing.** *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2009, **17**(2):153-162.
50. Lo DD, Zimmermann AS, Nauta A, Longaker MT, Lorenz HP: **Scarless fetal skin wound healing update.** *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews* 2012, **96**(3):237-247.
51. Sawai T, Usui N, Sando K, Fukui Y, Kamata S, Okada A, Taniguchi N, Itano N, Kimata K: **Hyaluronic acid of wound fluid in adult and fetal rabbits.** *Journal of pediatric surgery* 1997, **32**(1):41-43.
52. Rolfe KJ, Grobbelaar AO: **A review of fetal scarless healing.** *ISRN dermatology* 2012, **2012**:698034.
53. Iocono JA, Ehrlich HP, Keefer KA, Krummel TM: **Hyaluronan induces scarless repair in mouse limb organ culture.** *Journal of pediatric surgery* 1998, **33**(4):564-567.
54. Cowin AJ, Brosnan MP, Holmes TM, Ferguson MW: **Endogenous inflammatory response to dermal wound healing in the fetal and adult mouse.** *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 1998, **212**(3):385-393.

55. Liechty KW, Adzick NS, Crombleholme TM: **Diminished interleukin 6 (IL-6) production during scarless human fetal wound repair.** *Cytokine* 2000, **12(6):671-676.**
56. Liechty KW, Crombleholme TM, Cass DL, Martin B, Adzick NS: **Diminished interleukin-8 (IL-8) production in the fetal wound healing response.** *The Journal of surgical research* 1998, **77(1):80-84.**
57. Liechty KW, Kim HB, Adzick NS, Crombleholme TM: **Fetal wound repair results in scar formation in interleukin-10-deficient mice in a syngeneic murine model of scarless fetal wound repair.** *Journal of pediatric surgery* 2000, **35(6):866-872; discussion 872-863.**
58. Soo C, Beanes SR, Hu FY, Zhang X, Dang C, Chang G, Wang Y, Nishimura I, Freymiller E, Longaker MT *et al*: **Ontogenetic transition in fetal wound transforming growth factor-beta regulation correlates with collagen organization.** *The American journal of pathology* 2003, **163(6):2459-2476.**
59. Stelnicki EJ, Komuves LG, Holmes D, Clavin W, Harrison MR, Adzick NS, Largman C: **The human homeobox genes MSX-1, MSX-2, and MOX-1 are differentially expressed in the dermis and epidermis in fetal and adult skin.** *Differentiation; research in biological diversity* 1997, **62(1):33-41.**
60. Stelnicki EJ, Arbeit J, Cass DL, Saner C, Harrison M, Largman C: **Modulation of the human homeobox genes PRX-2 and HOXB13 in scarless fetal wounds.** *The Journal of investigative dermatology* 1998, **111(1):57-63.**
61. Stelnicki EJ, Komuves LG, Kwong AO, Holmes D, Klein P, Rozenfeld S, Lawrence HJ, Adzick NS, Harrison M, Largman C: **HOX homeobox genes exhibit spatial and temporal changes in expression during human skin development.** *The Journal of investigative dermatology* 1998, **110(2):110-115.**
62. Hu MS, Januszyk M, Hong WX, Walmsley GG, Zielins ER, Atashroo DA, Maan ZN, McArdle A, Takanishi DM, Jr., Gurtner GC *et al*: **Gene expression in fetal murine keratinocytes and fibroblasts.** *The Journal of surgical research* 2014, **190(1):344-357.**
63. Wulff BC, Parent AE, Meleski MA, DiPietro LA, Schrementi ME, Wilgus TA: **Mast cells contribute to scar formation during fetal wound healing.** *The Journal of investigative dermatology* 2012, **132(2):458-465.**
64. Longaker MT, Whitby DJ, Ferguson MW, Lorenz HP, Harrison MR, Adzick NS: **Adult skin wounds in the fetal environment heal with scar formation.** *Annals of surgery* 1994, **219(1):65-72.**
65. Coolen NA, Schouten KC, Boekema BK, Middelkoop E, Ulrich MM: **Wound healing in a fetal, adult, and scar tissue model: a comparative study.** *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2010, **18(3):291-301.**
66. Hohlfeld J, de Buys Roessingh A, Hirt-Burri N, Chaubert P, Gerber S, Scaletta C, Hohlfeld P, Applegate LA: **Tissue engineered fetal skin constructs for paediatric burns.** *Lancet* 2005, **366(9488):840-842.**
67. Beanes SR, Dang C, Soo C, Wang Y, Urata M, Ting K, Fonkalsrud EW, Benhaim P, Hedrick MH, Atkinson JB *et al*: **Down-regulation of decorin, a transforming growth factor-beta modulator, is associated with scarless fetal wound healing.** *Journal of pediatric surgery* 2001, **36(11):1666-1671.**
68. Soo C, Hu FY, Zhang X, Wang Y, Beanes SR, Lorenz HP, Hedrick MH, Mackool RJ, Plaas A, Kim SJ *et al*: **Differential expression of fibromodulin, a transforming growth factor-beta modulator, in fetal skin development and scarless repair.** *The American journal of pathology* 2000, **157(2):423-433.**

69. Whitby DJ, Longaker MT, Harrison MR, Adzick NS, Ferguson MW: **Rapid epithelialisation of fetal wounds is associated with the early deposition of tenascin.** *Journal of cell science* 1991, **99** (Pt 3):583-586.
70. Whitby DJ, Ferguson MW: **The extracellular matrix of lip wounds in fetal, neonatal and adult mice.** *Development* 1991, **112**(2):651-668.
71. Hopkinson-Woolley J, Hughes D, Gordon S, Martin P: **Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse.** *Journal of cell science* 1994, **107** (Pt 5):1159-1167.
72. Wilgus TA, Bergdall VK, Tober KL, Hill KJ, Mitra S, Flavahan NA, Oberyszyn TM: **The impact of cyclooxygenase-2 mediated inflammation on scarless fetal wound healing.** *The American journal of pathology* 2004, **165**(3):753-761.
73. Wilgus TA, Ferreira AM, Oberyszyn TM, Bergdall VK, Dipietro LA: **Regulation of scar formation by vascular endothelial growth factor.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2008, **88**(6):579-590.
74. Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A: **Structure and function of mammalian DNA methyltransferases.** *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 2011, **12**(2):206-222.
75. Ti D, Li M, Fu X, Han W: **Causes and consequences of epigenetic regulation in wound healing.** *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2014, **22**(3):305-312.
76. Cheng X, Blumenthal RM: **Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective.** *Structure* 2008, **16**(3):341-350.
77. Takai D, Jones PA: **Origins of bidirectional promoters: computational analyses of intergenic distance in the human genome.** *Molecular biology and evolution* 2004, **21**(3):463-467.
78. Takai D, Jones PA: **Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(6):3740-3745.
79. Pinney SE: **Mammalian Non-CpG Methylation: Stem Cells and Beyond.** *Biology* 2014, **3**(4):739-751.
80. Barrero MJ, Izpisua Belmonte JC: **Regenerating the epigenome.** *EMBO reports* 2011, **12**(3):208-215.
81. Jaenisch R, Bird A: **Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals.** *Nature genetics* 2003, **33** Suppl:245-254.
82. Robertson KD: **DNA methylation, methyltransferases, and cancer.** *Oncogene* 2001, **20**(24):3139-3155.
83. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA: **The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors.** *Nucleic acids research* 1999, **27**(11):2291-2298.
84. Doherty AS, Bartolomei MS, Schultz RM: **Regulation of stage-specific nuclear translocation of Dnmt1o during preimplantation mouse development.** *Developmental biology* 2002, **242**(2):255-266.
85. Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE, Bestor TH: **Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2.** *Science* 2006, **311**(5759):395-398.
86. Scourzic L, Mouly E, Bernard OA: **TET proteins and the control of cytosine demethylation in cancer.** *Genome medicine* 2015, **7**(1):9.

87. Zhang P, Su L, Wang Z, Zhang S, Guan J, Chen Y, Yin Y, Gao F, Tang B, Li Z: **The involvement of 5-hydroxymethylcytosine in active DNA demethylation in mice.** *Biology of reproduction* 2012, **86**(4):104.
88. Santiago M, Antunes C, Guedes M, Sousa N, Marques CJ: **TET enzymes and DNA hydroxymethylation in neural development and function - how critical are they?** *Genomics* 2014, **104**(5):334-340.
89. Ndlovu MN, Denis H, Fuks F: **Exposing the DNA methylome iceberg.** *Trends in biochemical sciences* 2011, **36**(7):381-387.
90. Jones PA: **Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond.** *Nature reviews Genetics* 2012, **13**(7):484-492.
91. Farthing CR, Ficzk G, Ng RK, Chan CF, Andrews S, Dean W, Hemberger M, Reik W: **Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes.** *PLoS genetics* 2008, **4**(6):e1000116.
92. Palacios D, Puri PL: **The epigenetic network regulating muscle development and regeneration.** *Journal of cellular physiology* 2006, **207**(1):1-11.
93. Iskandar BJ, Rizk E, Meier B, Hariharan N, Bottiglieri T, Finnell RH, Jarrard DF, Banerjee RV, Skene JH, Nelson A *et al*: **Folate regulation of axonal regeneration in the rodent central nervous system through DNA methylation.** *The Journal of clinical investigation* 2010, **120**(5):1603-1616.
94. Katsuyama T, Paro R: **Epigenetic reprogramming during tissue regeneration.** *FEBS letters* 2011, **585**(11):1617-1624.
95. Down TA, Rakyan VK, Turner DJ, Flicek P, Li H, Kulesha E, Graf S, Johnson N, Herrero J, Tomazou EM *et al*: **A Bayesian deconvolution strategy for immunoprecipitation-based DNA methylome analysis.** *Nature biotechnology* 2008, **26**(7):779-785.
96. Bock C, Tomazou EM, Brinkman AB, Muller F, Simmer F, Gu H, Jager N, Gnirke A, Stunnenberg HG, Meissner A: **Quantitative comparison of genome-wide DNA methylation mapping technologies.** *Nature biotechnology* 2010, **28**(10):1106-1114.
97. Palmke N, Santacruz D, Walter J: **Comprehensive analysis of DNA-methylation in mammalian tissues using MeDIP-chip.** *Methods* 2011, **53**(2):175-184.
98. Emes RD, Farrell WE: **Make way for the 'next generation': application and prospects for genome-wide, epigenome-specific technologies in endocrine research.** *Journal of molecular endocrinology* 2012, **49**(1):R19-27.
99. Meissner A, Gnirke A, Bell GW, Ramsahoye B, Lander ES, Jaenisch R: **Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis.** *Nucleic acids research* 2005, **33**(18):5868-5877.
100. Wang L, Sun J, Wu H, Liu S, Wang J, Wu B, Huang S, Li N, Wang J, Zhang X: **Systematic assessment of reduced representation bisulfite sequencing to human blood samples: A promising method for large-sample-scale epigenomic studies.** *Journal of biotechnology* 2012, **157**(1):1-6.
101. Zhao S, Fung-Leung WP, Bittner A, Ngo K, Liu X: **Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells.** *PLoS one* 2014, **9**(1):e78644.
102. Gay J, Kokkotou E, O'Brien M, Pothoulakis C, Karalis KP: **Corticotropin-releasing hormone deficiency is associated with reduced local inflammation in a mouse model of experimental colitis.** *Endocrinology* 2008, **149**(7):3403-3409.

103. McFarlane L, Truong V, Palmer JS, Wilhelm D: **Novel PCR assay for determining the genetic sex of mice.** *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation* 2013, **7**(4):207-211.
104. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA: **Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.** *Nature protocols* 2009, **4**(1):44-57.
105. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA: **Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists.** *Nucleic acids research* 2009, **37**(1):1-13.
106. Cheng CH, Leferovich J, Zhang XM, Bedelbaeva K, Gourevitch D, Hatcher CJ, Basson CT, Heber-Katz E, Marx KA: **Keratin gene expression profiles after digit amputation in C57BL/6 vs. regenerative MRL mice imply an early regenerative keratinocyte activated-like state.** *Physiological genomics* 2013, **45**(11):409-421.
107. Tanaka T, Urade Y, Kimura H, Eguchi N, Nishikawa A, Hayaishi O: **Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) is a newly recognized type of retinoid transporter.** *The Journal of biological chemistry* 1997, **272**(25):15789-15795.
108. Duester G: **Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis.** *Cell* 2008, **134**(6):921-931.
109. Lopez-Boado YS, Klaus M, Dawson MI, Lopez-Otin C: **Retinoic acid-induced expression of apolipoprotein D and concomitant growth arrest in human breast cancer cells are mediated through a retinoic acid receptor RARalpha-dependent signaling pathway.** *The Journal of biological chemistry* 1996, **271**(50):32105-32111.
110. Brown GT, Cash BG, Blihoghe D, Johansson P, Alnabulsi A, Murray GI: **The expression and prognostic significance of retinoic acid metabolising enzymes in colorectal cancer.** *PloS one* 2014, **9**(3):e90776.
111. Lampen A, Meyer S, Arnhold T, Nau H: **Metabolism of vitamin A and its active metabolite all-trans-retinoic acid in small intestinal enterocytes.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2000, **295**(3):979-985.
112. Mercader N, Leonardo E, Piedra ME, Martinez AC, Ros MA, Torres M: **Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes.** *Development* 2000, **127**(18):3961-3970.
113. Pineault N, Helgason CD, Lawrence HJ, Humphries RK: **Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny.** *Experimental hematology* 2002, **30**(1):49-57.
114. Hattori N, Imao Y, Nishino K, Hattori N, Ohgane J, Yagi S, Tanaka S, Shiota K: **Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells.** *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 2007, **12**(3):387-396.
115. Hattori N, Nishino K, Ko YG, Hattori N, Ohgane J, Tanaka S, Shiota K: **Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells.** *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(17):17063-17069.
116. Stroncek JD, Reichert WM: **Overview of Wound Healing in Different Tissue Types.** In: *Indwelling Neural Implants: Strategies for Contending with the In Vivo Environment.* Edited by Reichert WM. Boca Raton (FL); 2008.

117. Lewis JS, Jr., Furman BD, Zeitler E, Huebner JL, Kraus VB, Guilak F, Olson SA: **Genetic and cellular evidence of decreased inflammation associated with reduced incidence of posttraumatic arthritis in MRL/MpJ mice.** *Arthritis and rheumatism* 2013, **65**(3):660-670.
118. Mescher AL, Neff AW: **Regenerative capacity and the developing immune system.** *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 2005, **93**:39-66.
119. Rhinn M, Dolle P: **Retinoic acid signalling during development.** *Development* 2012, **139**(5):843-858.
120. Blum N, Begemann G: **Retinoic acid signaling controls the formation, proliferation and survival of the blastema during adult zebrafish fin regeneration.** *Development* 2012, **139**(1):107-116.
121. Monaghan JR, Maden M: **Visualization of retinoic acid signaling in transgenic axolotls during limb development and regeneration.** *Developmental biology* 2012, **368**(1):63-75.
122. Smith PD, Sun F, Park KK, Cai B, Wang C, Kuwako K, Martinez-Carrasco I, Connolly L, He Z: **SOCS3 deletion promotes optic nerve regeneration in vivo.** *Neuron* 2009, **64**(5):617-623.
123. Angione AR, Jiang C, Pan D, Wang YX, Kuang S: **PPARdelta regulates satellite cell proliferation and skeletal muscle regeneration.** *Skeletal muscle* 2011, **1**(1):33.
124. Michalik L, Desvergne B, Tan NS, Basu-Modak S, Escher P, Rieusset J, Peters JM, Kaya G, Gonzalez FJ, Zakany J *et al*: **Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice.** *The Journal of cell biology* 2001, **154**(4):799-814.
125. Shibata S, Tada Y, Asano Y, Hau CS, Kato T, Saeki H, Yamauchi T, Kubota N, Kadowaki T, Sato S: **Adiponectin regulates cutaneous wound healing by promoting keratinocyte proliferation and migration via the ERK signaling pathway.** *Journal of immunology* 2012, **189**(6):3231-3241.
126. Sacks HS, Fain JN, Holman B, Cheema P, Chary A, Parks F, Karas J, Optican R, Bahouth SW, Garrett E *et al*: **Uncoupling protein-1 and related messenger ribonucleic acids in human epicardial and other adipose tissues: epicardial fat functioning as brown fat.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2009, **94**(9):3611-3615.
127. Bienengraeber M, Ozcan C, Terzic A: **Stable transfection of UCP1 confers resistance to hypoxia/reoxygenation in a heart-derived cell line.** *Journal of molecular and cellular cardiology* 2003, **35**(7):861-865.
128. Kumar A, Brockes JP: **Nerve dependence in tissue, organ, and appendage regeneration.** *Trends in neurosciences* 2012, **35**(11):691-699.
129. Cheng C, Singh V, Krishnan A, Kan M, Martinez JA, Zochodne DW: **Loss of innervation and axon plasticity accompanies impaired diabetic wound healing.** *PloS one* 2013, **8**(9):e75877.
130. West DC, Shaw DM, Lorenz P, Adzick NS, Longaker MT: **Fibrotic healing of adult and late gestation fetal wounds correlates with increased hyaluronidase activity and removal of hyaluronan.** *The international journal of biochemistry & cell biology* 1997, **29**(1):201-210.