

Streszczenie rozprawy doktorskiej

mgr Aleksandry Pisarek

„Opracowanie narzędzi epigenetycznych do przewidywania wieku
w próbkach nasienia ludzkiego”

Badania metylacji DNA, które prowadzone są od kilkunastu lat na dużą skalę, pozwoliły na wyłonienie szeregu praktycznych markerów znajdujących zastosowanie do oceny ryzyka rozwoju wielu chorób. Jednym z najbardziej spektakularnych odkryć było wykazanie silnej korelacji pomiędzy metylacją DNA a starzeniem organizmu człowieka. Konsekwencją tego odkrycia są szeroko zakrojone badania o charakterze aplikacyjnym, których celem jest identyfikacja markerów metylacyjnych umożliwiających dokładne szacowanie wieku człowieka. Predykcja wieku epigenetycznego ma znaczenie kliniczne oraz znajduje zastosowanie w kryminalistyce. Wiek to istotny czynnik wystąpienia wielu chorób, a przyspieszone tempo starzenia się organizmu powiązано na przykład z chorobami układu sercowo-naczyniowego, cukrzycą, nadwagą lub chorobami neurodegeneracyjnymi. Wiek stanowi jedną z podstawowych informacji, które podczas dochodzeń policyjnych mogą skutecznie zawęzić krąg potencjalnych podejrzanych i tym samym przyspieszyć proces dochodzeniowo-śledczy. Przewidywanie wieku poprzez analizę metylacji DNA zapewnia wysoką dokładność, co wykazano dla różnych komórek i tkanek somatycznych badanych w kontekście kryminalistycznym. Jednak, predykcja wieku epigenetycznego w próbkach nasienia pozostaje wciąż wyzwaniem, mimo że próbki nasienia stanowią jedno z ważniejszych źródeł DNA badanych w laboratoriach kryminalistycznych w sprawach przestępstw na tle seksualnym.

Celem niniejszej pracy doktorskiej była ewaluacja dostępnych markerów oraz kalkulatorów do predykcji wieku epigenetycznego oraz poszukiwanie nowych markerów estymacji wieku i opracowanie skutecznych modeli predykcyjnych dla nasienia. W badaniach wykorzystano materiał badawczy od 467 mężczyzn w wieku od 19 do 60 lat. Realizując pierwszy cel pracy skupiono się na ewaluacji dwóch dostępnych narzędzi do predykcji wieku epigenetycznego w nasieniu. Pierwszy z kalkulatorów uwzględnia metylację 3 miejsc CpG analizowanych z zastosowaniem metody minisekwencjonowania. Uzyskane wyniki potwierdziły istotną statystycznie korelację metylacji DNA z wiekiem dla wszystkich analizowanych markerów. Średni błąd predykcji (MAE, ang. *mean absolute error*) dla analizowanego zestawu próbek nasienia z populacji polskiej wynosił 6 lat. Druga oceniana metoda polegała na badaniu poziomu metylacji DNA w obrębie 51 *loci* z zastosowaniem technologii mikromacierzowej. Analiza statystyczna wykazała istotną korelację z wiekiem dla 98% analizowanych *loci* oraz dużo wyższą dokładność predykcji, z błędem MAE < 3 lat. Realizacja drugiego celu pracy wymagała przeprowadzenia badań wielkoskalowych z zastosowaniem mikromacierzy Infinium MethylationEPIC v1.0 BeadChip (EPIC), którym poddano 38 próbek

nasienia od mężczyzn w wieku od 24 do 58 lat. Z pomocą pakietów programu R wyselekcjonowano 10 kandydackich miejsc CpG, które razem z 3 cytozynami uwzględnionymi w pierwszym z testowanych wcześniej narzędzi (geny *TTC7B*, *FOLH1B* i *LOC401324*) poddano ewaluacji na próbie 179 próbek od mężczyzn w wieku od 26 do 57 lat. W tym celu zastosowano opracowany z użyciem celowanej technologii sekwencjonowania nowej generacji (NGS, ang. *next-generation sequencing*) protokół, który posłużył jednocześnie do zebrania danych metylacyjnych dla potrzeb opracowania narzędzia predykcyjnego VISAGE Enhanced Tool. Zaproponowany predyktor VISAGE uwzględnia poziomy metylacji DNA dla 6 miejsc CpG w obrębie 5 genów *FOLH1B*, *SH2B2*, *EXOC3*, *IFITM2* i *GALR2*. Wykazano, że wybrane markery wyjaśniają 60% zmienności w grupie uczącej i pozwalają na uzyskanie dokładności predykcji z błędem MAE = 5,1 lat w grupie testowej. Na kolejnym etapie badań, zgromadzone dane mikromacierzowe wykorzystano do opracowania optymalnego modelu predykcyjnego EPIC-8CpG. Model regresji zawiera 8 miejsc CpG z 8 różnych *loci* genetycznych i umożliwia predykcję wieku epigenetycznego w nasieniu z błędem MAE = 3,2 lat. Model ten posiada optymalną dla kryminalistyki proporcję liczby markerów i dokładności predykcji. W ramach ostatniego etapu badań, dane zebrane dla 391 próbek (wiek 19 – 57 lat) za pomocą metod NGS i mikromacierzy EPIC umożliwiły przeprowadzenie pogłębionej analizy wartości metylacji DNA uzyskanych dla obu technologii oraz wpływu różnic na predykcję wieku epigenetycznego. Kolejnym celem badań nad opracowaniem dokładnych narzędzi do przewidywania wieku w nasieniu jest testowanie wpływu czynników związanych ze stylem życia lub jakością nasienia na precyzję estymacji wieku.

Akceptuję

Dr Z. C.