

Głównym celem projektu jest poszerzenie obecnego stanu wiedzy na temat mechanizmów regulujących rozwój procesu autoimmunologicznej demielinizacji. Jak powszechnie wiadomo, proces leczenia chorób z kręgu autoagresji, do których zalicza się Stwardnienie Rozsiane (Multiple Sclerosis, MS), opiera się na próbach łagodzenia ich przebiegu, gdy patogenezę choroby pozostaje nieznana. Zakłada się istotny wpływ na indukcję choroby ma wiele czynników takich jak: predyspozycje genetyczne, niedobór witaminy D co wiąże się z szerokości geograficznej i intensywności ekspozycji na słońce, jak również stres. W autoimmunologicznej demielinizacji dochodzi do rozpadu osłonek mielinowych włókien nerwowych co prowadzi do obumierania neuronów. Spowodowane jest to przenikaniem do ośrodkowego układu nerwowego (OUN) przez barierę krew-mózg limfocytów pomocniczych T CD4+ (T helper cells, Th), głównie populacji autoreaktywnych Th17 oraz Th1 rozpoznających antygeny mielinowe jako obce. Najnowsze doniesienia wskazują na istotną funkcję mechanizmów epigenetycznych w regulacji procesu różnicowania się limfocytów pomocniczych T CD4+. W naszych wcześniejszych badaniach wykazaliśmy wzrost ekspresji trzech mikroRNA (microRNA, miRNA) miR-21, miR-155 oraz miR-301a w populacjach limfocytów T CD4+, jak również wskazaliśmy mechanizm regulacji różnicowania się Th17 przez miR-301a poprzez hamowanie ekspresji Pias3, będącego inhibitorem Stat3 - kluczowego czynnika transkrypcyjnego dla Th17. MikroRNA są krótkimi cząsteczkami RNA o długości około 18-22 nukleotydów, które nie kodują białek. Charakteryzują się post-transkrypcyjną regulacją mRNA, głównie przez blokowanie translacji określonego białka lub degradację nici mRNA.

W tym projekcie pragniemy skupić się na kontynuacji badań nad funkcją miRNA, w szczególności miRNA-155 poprzez regulację genów z rodziny białek szoku cieplnego 40 (Heat shock protein 40, HSP40) w procesie różnicowania się limfocytów pomocniczych T CD4+ oraz przebiegu autoimmunologicznej demielinizacji.

Proponowany model badań w tym projekcie ma charakter nowatorski. W badaniach wstępnych wykazaliśmy znaczny wzrost ekspresji miR-155 w limfocytach T CD4+ odpowiadających na antygen mielinowy. Wyniki tego eksperymentu potwierdziliśmy *in vivo* na mysim modelu SM – eksperymentalnym zapaleniu mózgu i rdzenia kręgowego (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE). Zaobserwowano, że u myszy genetycznie pozbawionych ekspresji miR-155 (miR-155^{-/-}) przebieg choroby był znacznie łagodniejszy niż u myszy kontrolnych (miR-155^{+/+}). Celem zbadania mechanizmu regulacji EAE przez miR-155 planujemy zbadać ekspresję obydwu nici miR-155: miR-155-3p oraz miR-155-5p w dwóch głównych populacjach komórek zapalnych limfocytach T CD4+ oraz makrofagach/mikrogleju CD11b+ z zastosowaniem technik biologii molekularnej takich jak RT-qPCR, zarówno względnej jak i absolutnej oceny ilościowej. W następnym etapie projektu zbadamy funkcjonalne znaczenie obu nici miR-155-3p oraz miR-155-5p w limfocytach T CD4+ poprzez zastosowanie wektorów wzmagających działanie poszczególnych nici (mimikr) a następnie zmierzemy ekspresję genów markerowych dla poszczególnych frakcji limfocytów pomocniczych. Wektory modyfikujące ekspresję poszczególnych nici miRNA-155 wprowadzone będą do komórek z zastosowaniem techniki elektroporacji. W kolejnym etapie projektu zostanie zbadana funkcjonalność obydwu nici miR-155-3p oraz miR-155-5p w procesie blokowania ekspresji Dnaja2 i Dnajb1 poprzez transfekcję limfocytów T CD4+ antagomirami przeciw określonej nici miR-155. Wyniki powyższego eksperymentu zostaną zweryfikowane z zastosowaniem reporterowego systemu lucyferazy. Celem sprawdzenia istotności ekspresji genów Dnaja2 i Dnajb1 w limfocytach T CD4+ zostaną one poddane transfekcji plazmidami wzmagającymi ekspresję odpowiednio Dnaja2 lub Dnajb1 lub obydwu genów razem. Profil białkowy ukazywany przez komórki na modyfikację genetyczną zostanie zweryfikowany za pomocą metody Western Blot. Wyniki badań prowadzonych *in vitro*, zostaną potwierdzone przez serie doświadczeń na myszach immunizowanych w kierunku wywołania EAE. Zakładamy, że wyniki badań realizowanych w obrębie tego projektu poszerzą stan wiedzy z zakresu mechanizmów leżących u podstaw procesu autoimmunologicznej demielinizacji i mogą się przyczynić do ulepszenia nowych terapii genowych w przyszłości.

Tematyka tego projektu wpisuje się w nurt badań nad procesem autoimmunologicznej demielinizacji prowadzonych w Laboratorium Neuroimmunologii i Katedrze i Klinice Neurologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi od wielu lat. Liczne doniesienia naukowe wskazują na powiązanie między ekspresją miR-155 a procesem różnicowania się limfocytów T CD4+, ponadto był on jednym z pierwszych miRNA, którego wzrost ekspresji został zaobserwowany podczas stymulacji TCR. Pomimo licznych badań prowadzonych nad miR-155 rola funkcjonalności różnych nici miR-155, miR-155-3p oraz miR-155-5p w limfocytach T CD4+ w odpowiedzi na antygen mielinowy nie została jeszcze zweryfikowana.