

Poszukiwanie genów zwi zanych z białkiem histonowym H3K4me3 odpowiedzialnych za polaryzacj neutrofilii w kierunku komórek supresorowych w stanach zapalnych trudno poddaj cych si leczeniu

Wprowadzenie

W toku ewolucji ludzki organizm rozwin ł szereg mechanizmów prowadz cych do eliminacji patogenów. W chwili inwazji mikroorganizmów dochodzi do ich rozpoznania przez komórki immunokompetentne i zostaje uruchomiony zło ony system odpowiedzi immunologicznej. Wiele infekcji jest eliminowanych na etapie odporno ci nieswoistej bez aktywnego udziału odpowiedzi swoistej. System odporno ci nieswoistej cechuje m.in. bardzo szybka reakcja, wynikaj ca bezpo rednio z konstytutywnej obecno ci receptorów rozpoznaj cych drobnoustroje, oraz brak trwałej pami ci immunologicznej po reakcji z patogenem. Regulacja odpowiedzi zapalnej jest procesem niezwykle zło onym i odbywaj cym si na wielu poziomach reakcji obronnych organizmu. W zale no ci od rodzaju patogenu i poprawno ci funkcjonowania układu immunologicznego gospodarza zostaj uruchomione zło one interakcje, które mog prowadzi do ró nych efektów klinicznych — eliminacji zaka enia z pełn odbudow tkanek, eliminacji zaka enia z destrukcj tkanek otaczaj cych, przetrwania czynnika infekcyjnego z przeci gaj cym si stanem zapalnym (zapalenie przewlekłe), kontroli czynnika infekcyjnego z zapocz tkowaniem nowej odpowiedzi immunologicznej (autoimmunizacja), oraz braku kontroli nad zaka eniem.

Wyniki ostatnich bada pozwalaj s dzi , e droga samoograniczenia si procesu zapalenia poprzez system limfocytów regulatorowych mo e by precyzyjnym narz dziem autokontroli układu immunologicznego. Ten rodzaj nadzoru nad komórkami efektorowymi mo e chroni przed skutkami reakcji obronnych nadmiernych w stosunku do panuj cego zagro enia, prowadz cych do niszczenia własnych tkanek przez komórki immunokompetentne.

Zaburzenie deaktywacji neutrofilii, głównych i najbardziej licznych komórek nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, stanowi istotn przyczyn powikła przewlekłych stanów zapalnych. Obecnie stosowane leki przeciwzapalne oparte na hamowaniu szlaku cyklooksygenazy lub glikokortykosteroidy powoduj stan ogólnoustrojowej supresji i s obci one wieloma skutkami ubocznymi. Wcze niejsze nasze badania wykazały, i nadrz dn rol w regulacji procesu zapalenia odgrywaj limfocyty Treg, które w zale no ci od rodzaju zapalenia i czynnika go wywołuj cego (aseptyczne czy septyczne) po interakcji z neutrofilami polaryzuj je w kierunku komórek supresorowych. Kluczowym elementem w indukcji supresorowych neutrofilii jest metylacja białka histonowego H3K4 (H3K4me3), aktywuj ca m.in. transkrypcj genu dla IL-10, podstawowej cytokiny ograniczaj cej zapalenie.

Celem prowadzonych bada jest wyłonienie ró nic zwi zanych z aktywacj neutrofilii poprzez wskazanie promotorów genów odpowiedzialnych za polaryzacj neutrofilii z komórek pro- na przeciwzapalne oraz cie ek przeka nictwa komórkowego przez nie uruchamianych. Uzyskane wyniki mog by wykorzystane do opracowania skutecznego sposobu wpływu na odblokowanie lub wymuszon aktywacj genów, czy te cie k aktywacji zwi zanych z polaryzacj neutrofilii w kierunku komórek supresorowych. Wskazanie potencjalnych celów terapii mo e mie praktyczne znaczenie w projektowaniu celowanej (farmakologiczna modulacja linii mieloidalnej), wysoce swoistej terapii genowej (np. siRNA, lub na poziomie genomu krótkie sekwencje palindromowe CRISPR). Swoista ingerencja w genom komórek mielopojezy mo e wydu y czas niezb dny do neutralizacji czynników odpowiedzialnych za aktywacj neutrofilii i tym samym np. pozwoli na skuteczn antybiotykoterapi .

Zastosowana metoda badawcza

Do osi gnienia celu badawczego zastosowana zostanie analiza porównawcza materiału genetycznego (DNA) zwi zanego z histonem H3K4me3 (nukleosom ulegaj cy remodelingowi pod wpływem czynników pro- i przeciwzapalnych), oraz mRNA w czterech stanach klinicznych w których nast puje aktywacja/deaktywacja neutrofilii. Do bada wykorzystamy neutrofile krwi obwodowej uzyskane od: 1. Osób zdrowych; 2. Pacjentów z przewlekłym aseptycznym zapaleniem, w którym neutrofile nie ulegaj deaktywacji (choroba Devica); 3. pacjentów z zapaleniem przyz bia wywołanym przez bakterie Gram (-), w którym neutrofile prawidłowo reaguj na deaktywacj ; 4. pacjentów z seps wywołan bakteriami Gram (-) u których neutrofile s aktywowane przez LPS i nie poddaj si deaktywacji. Zbadana zostanie: ekspresja prekursorów genów zwi zanych z H3K4me3 (technik ChIP-to-chip); sekwencjonowanie DNA zwi zanego z H3K4me3 w poszukiwaniu sekwencji trans-splicing'owych (transkrypt dla białka jest składany z genów oddalonych od siebie, co jest nie do wykrycia technik mikromacierzy); ekspresja mRNA technik hybrydyzacji i analizy mikromacierzy dwubarwnych; analiza ekspresji białka H3K4me3 (technik WB). Ostatni etap to analiza bioinformatyczna, trójetapowa dyskryminuj ca: 1. zestawienie genów przed i po immunoprecypitacji H3K4me3 w obr bie ka dej z grup badanych i pierwsza eliminacja genów niezwi zanych z H3K4me3; 2. analiza pomi dzy aktywacj LPS i hIL-10 a stanem spoczynkowym neutrofilii w grupach badanych i wyłonienie pierwszych genów kandydatów; 3. porównanie grup badanych w układach bez stymulacji, stymulowanych LPS lub hIL10.