

POPULARNONAUKOWE STRESZCZENIE PROJEKTU

Infekcjom i stanom zapalnym towarzyszy wzrost stężenia czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF), aktywującego różnicowanie monocytów w makrofagi, które następnie w wyniku klasycznej aktywacji m.in. w odpowiedzi na bakteryjne endotoksyny polaryzują te komórki w prozapalne makrofagi M1. Komórki o fenotypie M1 w odpowiedzi na wniknięcie obcych dla organizmu patogenów, charakteryzują się wysoką ekspresją czynników m.in. cytokin prozapalnych, takich $IL1\beta$ i $TNF\alpha$, których podstawową funkcją jest mobilizowanie innych komórek układu immunologicznego do gromadzenia się w miejscu objętym stanem zapalnym. Dużą rolę w przebiegu procesu różnicowania charakteryzującego się ogromną dynamiką struktury chromatyny odgrywają proksymalne (promotory) i dystalne (tzw. wzmacniacze, ang. *enhancers*) regiony *cis*-regulatorowe intensyfikujące transkrypcję czynników, które są odpowiedzialne za przebieg różnicowania i/lub charakterystyczne dla danego typu komórek.

Wstępne wyniki uzyskane przez Wnioskodawcę oraz dane literaturowe pozwalają wysunąć hipotezę o udziale procesu ADP-rybozylacji zachodzącego w obrębie proksymalnych i dystalnych (wzmacniaczy) regionów *cis*-regulatorowych genów $IL1\beta$ i $TNF\alpha$ w utrzymaniu tych regionów w formie nieaktywnej, a obniżenie ekspresji PARP1 podczas różnicowania monocytów w prozapalne makrofagi M1 ma fizjologiczne znaczenie dla predysponowania makrofagów do zwiększonej ekspresji cytokin prozapalnych. Polimerazy poli-ADP-rybozy (PARP) to enzymy uczestniczące w podstawowych dla życia komórki procesach. PARP1 jest najlepiej poznanym enzymem tej rodziny, który zlokalizowany jest w jądrze komórkowym, gdzie występuje w formie częściowo związanej z chromatyną, umożliwiając ADP-rybozylację histonów oraz innych białek zaangażowanych w warunkowanie struktury chromatyny. Dzięki temu, enzym ten odgrywa istotną rolę w regulowaniu dostępności chromatyny dla czynników transkrypcyjnych, co w konsekwencji wpływa na poziom ekspresji części genów. Brakuje informacji na temat przebiegu i mechanizmu odpowiedzialnego za zmiany statusu proksymalnych i dystalnych regionów *cis*-regulatorowych genów $IL1\beta$ i $TNF\alpha$ w trakcie różnicowania i polaryzowania prozapalnych makrofagów M1. Dlatego też, głównym celem proponowanego projektu jest identyfikacja molekularnych mechanizmów oddziaływania polimerazy poli(ADP-rybozy)-1 (PARP-1) na gotowość i/lub aktywację proksymalnych i dystalnych (wzmacniaczy) regionów *cis*-regulatorowych genów $IL1\beta$ i $TNF\alpha$ odgrywających ważną rolę w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej.

Projekt składa się z czterech tematycznie zorganizowanych etapów, w trakcie których dokonana zostanie identyfikacja wzmacniaczy ulegających aktywacji w trakcie różnicowania, funkcjonalnie zaangażowanych w ekspresję badanych cytokin, określenie fizjologicznego znaczenia obniżenia poziomu PARP1 dla aranzacji i aktywacji wyselekcjonowanych regionów *cis*-regulatorowych oraz identyfikacja elementów wzmacniacza i promotora ulegających ADP-rybozylacji w trakcie różnicowania monocytów w prozapalne makrofagi M1 i ich aktywacji endotoksyną oraz określenie ich wpływu dla represji transkrypcji genów $IL1\beta$ i $TNF\alpha$. W celu zrealizowania wyżej wymienionych założeń wykorzystane zostaną nowoczesne techniki biologii komórki oraz biologii molekularnej, takie jak: wyciszanie ekspresji genów za pomocą siRNA, nadekspresja genów za pomocą transfekcji/elektroporacji wektorem zawierającym cDNA dla konkretnego genu, western blot, cykliczna reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR), immunoprecypitacja chromatyny z analizą ilościową w czasie rzeczywistym (ChIP-qPCR) oraz metoda 3C (uchwycenie konformacji chromosomu). Uzyskane wyniki będą miały istotny wpływ na rozszerzenie wiedzy o regulacji ekspresji genów, która w przyszłości może zostać wykorzystana w projektach naukowych z różnych dziedzin nauki, m.in. biologii molekularnej, immunologii, genetyki i genomiki.