

Prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego wymaga **perfekcyjnie regulowanej komunikacji** między komórkami układu odpornościowego oraz między komórkami układu odpornościowego a innymi typami komórek (np. komórek wyścielejających naczyń krwionośnych czy drogi oddechowej). Ta komunikacja angażuje m.in. błonowe cząsteczki adhezyjne a także różne rozpuszczalne mediatory (cytokiny) oddziałujące ze specyficznymi błonowymi receptorami. W odpowiedzi na zagrożenie (np. infekcję) często dochodzi do rozwoju stanu zapalnego a układ odpornościowy kieruje wszystkimi jego etapami: od inicjacji po wygaszenie. Jeśli jednak nie udaje się wyeliminować zagrożenia lub zawodzi jakiś element kontroli, dochodzi do powstania chronicznego stanu zapalnego leżącego u podstaw szeregu wciąż nieuleczalnych, uciążliwych lub bardzo poważnych chorób takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, miażdżyca, czy stwardnienie rozsiane. Nie bez znaczenia są też dwukierunkowe relacje między chorobami o podłożu zapalnym a nowotworami.

ADAM17 (ang. *A Disintegrin And Metalloproteinase 17*) to powszechnie występujący enzym błonowy z rodziny ADAM pełniący istotną rolę w rozwoju stanu zapalnego: zarówno fizjologicznego, koniecznego do obrony organizmu przed patogenami jak i patologicznego. ADAM17 to szedaza, czyli enzym uwalniający z błony komórkowej biologicznie aktywne, zewnątrzkomórkowe domeny różnych białek: cząsteczek adhezyjnych, cytokin, czynników wzrostu a także ich receptorów. ADAM17 złuszcza białka błonowe modyfikuje powierzchnię komórek i jednocześnie wzbogaca mikrośrodowisko w rozpuszczalne i dyfundujące aktywne cząsteczki – w ten sposób wpływa na komunikację międzykomórkową podczas stanu zapalnego. Prozapalne działanie białka ADAM17 wynika z faktu uwalniania z błony komórkowej szeregu białek uczestniczących w rozwoju stanu zapalnego, w tym jednej z najważniejszych cytokin prozapalnych – TNF-u (ang. *tumor necrosis factor*, czynnik martwicy nowotworów). **Ale czy to jedyny mechanizm?**

Na podstawie własnych doświadczeń wysunęliśmy hipotezę, że ADAM17 promuje stan zapalny nie tylko przez dostarczanie mediatorów, ale również w inny sposób – „uwrażliwiając” komórki organizmu na prozapalne bodźce. Stwierdziliśmy bowiem, że gdy metodami genetyki molekularnej, silnie ograniczymy syntezę białka ADAM17 (innymi słowy: wyciszymy ekspresję genu *Adam17*) to komórki wielu typów stają się mało wrażliwe na działanie mediatorów stanu zapalnego: cytokin i produktów bakteryjnych, i nie podejmują efektywnej syntezy pewnych charakterystycznych „obronnych” białek, takich jak np. indukowalna syntaza tlenu azotu. Obserwujemy także zaburzenia w funkcjonowaniu szlaków sygnałowych zaangażowanych w regulację ekspresji genów istotnych dla stanu zapalnego. Ale co najciekawsze, wyciszeniu ekspresji *Adam17* towarzyszą zmiany we wzorze metylacji DNA, co zgodnie ze współczesną wiedzą, może znacząco wpływać na to, jaki zestaw genów i na jakim poziomie ulega w komórce ekspresji.

Celem naszego projektu jest wyjaśnienie tego nowego mechanizmu, poprzez który ADAM17 promuje rozwój stanu zapalnego. Zamierzamy osiągnąć ten cel badając efekty wyciszenia ekspresji *Adam17* w dwóch modelowych liniach komórkowych: P388D1 (komórki układu odpornościowego) i MC38 (komórki nabłonkowe). Zanalizujemy zmiany jakościowe i ilościowe w: (i) transkryptomie (czyli w zestawie genów ulegających transkrypcji), (ii) sekretomie (zestawie białek ulegających wydzielaniu z komórki i uwalnianiu z powierzchni komórki) i (iii) we wzorze metylacji DNA (wzór metylacji wskazuje, które dinukleotydy CpG w analizowanym DNA są, a które nie są zmetylowane). Planujemy także zidentyfikować elementy ścieżek sygnałowych ulegające odmiennej regulacji w komórkach z wyciszoną i normalną ekspresją *Adam17*. Do analizy transkryptomów zastosujemy technikę **RNA-seq**, bazującą na sekwencjonowaniu nowej generacji, pozwalającą na czułą i precyzyjną analizę ilościową mRNA oraz niekodujących RNA. Do analizy sekretomów zastosujemy porównawczą, ilościową technikę spektrometrii mas (MS) – **SILAC**. Sprawdzimy też, czy geny, których ekspresja wyraźnie zmienia się pod wpływem wyciszenia *Adam17* mają zmieniony wzór metylacji. Odpowiemy również na pytanie czy wyciszenie *Adam17* wpływa na całkowity poziom metylacji DNA w komórkach oraz na aktywność enzymów odpowiedzialnych za ten proces. Geny wyłonione na podstawie porównań transkryptomów i sekretomów zostaną poddane analizie pod kątem ich potencjalnych **funkcji w ścieżkach sygnałowych** przy użyciu zaawansowanego programu bioinformatycznego **Ingenuity Pathway Analysis tool**. Metody genetyki molekularnej oraz metody immunochemiczne zostaną wykorzystane do weryfikacji wyników analizy transkryptomów i sekretomów oraz do pogłębionych badań nad szlakami sygnałowymi. Jesteśmy przekonani, że to nowoczesne i wielotorowe podejście eksperymentalne pozwoli na osiągnięcie celu projektu. Badania przyniosą także dodatkowe efekty: (i) wyniki analiz wszystkich transkryptomów zostaną umieszczone w ogólnodostępnej bazie danych GEO i będą mogły być wykorzystane do różnych analiz bioinformatycznych, niekoniecznie dotyczących funkcji białka ADAM17; (ii) wyniki analiz porównawczych sekretomów być może pozwolą na identyfikację nowych substratów ADAM17, a przez to mogą rozszerzyć wiedzę o dodatkowych funkcjach tego enzymu. Te wyniki również zostaną udostępnione międzynarodowemu środowisku naukowemu; (iii) analiza bioinformatyczna wyników dotyczących transkryptomów oraz zmian w metylacji DNA może dostarczyć informacji na temat zależności między ścieżkami sygnałowymi, metylacją DNA i ekspresją niektórych genów – informacji znacznie wykraczających poza funkcjonowanie białka ADAM17.