

POPULARNONAUKOWE STRESZCZENIE PROJEKTU

Przewlekłe zapalenie i zaburzenie procesu gojenia ran stanowią podłoże mechanizmu wielu procesów chorobowych, w tym dotyczących chorób cywilizacyjnych. Zapalenie może być wywołane czynnikami fizycznymi, chemicznymi i biologicznymi. Przewlekłe zapalenie przyczynia się do rozwoju miażdżycy naczyń, reumatoidalnego zapalenia stawów, astmy, raka i wielu innych chorób. Procesowi temu towarzyszy upośledzenie podziałów komórkowych, różnicowania komórek i biosyntezy składników macierzy pozakomórkowej (ECM), głównie kolagenu. Pomimo, że mechanizm zapalenia jest dobrze zbadany, to jednak kompleksowość molekularnych regulacji tego procesu nie jest do końca poznana. W niniejszym projekcie przedstawiono hipotezę o podwójnej funkcji prolidazy (wewnątrzkomórkowego enzymu oraz liganda EGFR) jako ważnego białka w regulacji procesów regeneracyjnych w eksperymentalnym modelu zapalenia oraz mechanicznego uszkodzenia komórek skóry.

Prolidaza jest cytoplazmatyczną egzoptydazą katalizującą hydrolizę imidodipeptydów zawierających prolinę lub hydroksyprolinę. Enzym ten odgrywa ważną rolę w odzyskiwaniu proliny z imidodipeptydów (pochodzących głównie z produktów degradacji kolagenu) do ponownej biosyntezy kolagenu i innych białek zawierających prolinę. Warto zauważyć, że specyficznym ligandem receptora $\beta 1$ -integrynowego jest kolagen typu I. Charakterystycznym zjawiskiem pobudzenia receptora $\beta 1$ -integrynowego jest wzrost biosyntezy kolagenu. Mechanizm tego zjawiska polega na pobudzeniu czynników transkrypcyjnych indukujących ekspresję genów kolagenu i wielu innych zaangażowanych w regulację proliferacji, różnicowania i metabolizmu komórkowego. Powiązanie aktywności prolidazy z procesem biosyntezy kolagenu wykazano w wielu modelach komórkowych i zwierzęcych, jak np. we wspomnianym wcześniej procesie gojenia ran i starzenia, zwłóknieniu tkanek oraz wrodzonej łamliwości kości. Regulacja tych procesów zachodzi na poziomie szlaku sygnałowego indukowanego przez receptor $\beta 1$ -integrynowy, a także insulinopodobny czynnik wzrostowy-I (IGF-I) – najsilniejszy stymulator biosyntezy kolagenu. Mechanizm prolidazo-zależnej regulacji biosyntezy kolagenu wykazano zarówno na poziomie pre- i post-transkrypcyjnym poprzez regulację czynnika NF-kB – inhibitora ekspresji genów kolagenu typu I. Modułacja integryno-zależnego szlaku sygnałowego poprzez aktywujące lub hamujące ligandy receptora $\beta 1$ -integrynowego lub donory tlenu azotu wpływa na aktywność prolidazy. Wykazano również, że prolidaza jest ligandem receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), który odpowiada za aktywację pro-wzrostowych ścieżek sygnałowych. To podwójne działanie prolidazy sugeruje jej ważną rolę w promowaniu wzrostu komórek i regeneracji tkanek. Jednak ta funkcja prolidazy nie została dotychczas zbadana.

W związku z tym, celem projektu jest zbadanie słuszności postawionej hipotezy o zewnątrzkomórkowej roli prolidazy jako aktywatora wewnątrzkomórkowej ścieżki sygnałowej pobudzającej procesy naprawcze w uszkodzonych tkankach.

Projekt ten ma na celu wyjaśnienie molekularnego mechanizmu działania prolidazy w procesach regeneracyjnych w hodowlach komórek skóry. Efekty biologiczne wpływu prolidazy na komórki skóry ocenione zostaną w odniesieniu do potencjalnego wykorzystania w procesie gojenia ran oraz w chorobie spowodowanej niedoborem prolidazy. Wyniki tych badań mogą przyczynić się do zaproponowania nowej farmakoterapii zaburzeń gojenia ran.

W celu realizacji projektu zostanie uzyskana rekombinowana prolidaza oraz jej zmutowane formy przy użyciu metod biotechnologicznych. Następnie zostanie oceniony wpływ uzyskanych białek na niektóre procesy metaboliczne komórek skóry (fibroblasty i keratynocyty) w warunkach indukowanego stanu zapalnego oraz uszkodzenia mechanicznego. Planowana jest ocena wpływu prolidazy na proliferację komórek, cykl komórkowy, biosyntezę kolagenu oraz białka szlaków sygnałowych indukowanych poprzez prolidazo-zależne pobudzenie receptora EGF przy użyciu techniki RT-qPCR, Western immunoblott, immunocytochemicznych z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej oraz cytometrii przepływowej. W końcowym etapie badań zostanie wykonana analiza metabolomiczna oceniająca wpływ zewnątrzkomórkowej prolidazy na metabolizm aminokwasów w komórkach skóry w warunkach imitujących uszkodzenie tkanki.