

1. Cel prowadzonych badań/hipoteza badawcza

Hipoteza badawcza zakłada, że białka z rodziny ALKBH, które oprócz naprawy uszkodzeń alkilacyjnych w DNA i RNA pełnią różne funkcje biologiczne łącznie z rolą w metabolizmie komórek nowotworowych, biorą również udział w rozwoju otyłości i cukrzycy typu 2 (T2D). Nadrzędnym celem Projektu jest określenie udziału białek ALKBH w rozwoju wspomnianych chorób cywilizacyjnych oraz wskazanie mechanizmów regulacji tych procesów na modelu świni, który jest znacznie bliższy człowiekowi w porównaniu z modelem mysim, najczęściej stosowanym w badaniach nad dioksygenazami ALKBH.

2. Zastosowana metoda badawcza/metodyka

Obiekt badań:

Do badań nad rolą białek z rodziny ALKBH w rozwoju otyłości i T2D zastosujemy model świński, najbardziej zbliżony w aspekcie metabolizmu do człowieka. Wcześniej opracowaliśmy i oceniliśmy kilka modeli przydatnych w realizacji projektu: 1) model predyspozycji do otyłości IUGR-novorodki z wewnątrzmacicznym zahamowaniem wzrostu; 2) model rozwijającej się otyłości w czasie spożywania nadwyżki energetycznej bez objawów T2D; 3) model rozwiniętej otyłości z objawami cukrzycy; 4) model ustępowania objawów T2D i otyłości po operacji bariatrycznej, oraz 5) model otyłości i cukrzycy typu 2 o podłożu genetycznym - dorosłe osobniki IUGR. Zastosowanie kilku modeli badawczych pozwoli odpowiedzieć na pytanie o uniwersalne mechanizmy związane z otyłością i cukrzycą typu 2, w których białka ALKBH mogą brać udział.

Metodyka badawcza

Na uzyskanym materiale biologicznym zostanie przeprowadzony szereg analiz. Projekt obejmuje porównanie ekspresji białek ALKBH1-8 i FTO w narządach i tkankach kluczowych dla rozwoju otyłości i T2D jak mięśnie, wątroba, trzustka, tkanka tłuszczowa, nadnercza, tarczyca w wyżej wymienionych modelach przy zastosowaniu metody Western blot i cytometrii tkankowej. Ponadto, na wybranych tkankach będzie przeprowadzona analiza całego proteomu przy użyciu spektrometrii mas, a analiza bioinformatyczna pozwoli na wytypowanie potencjalnych zmian w przypadkach otyłości i T2D, z możliwą rolą białka/białek z rodziny ALKBH. Przypuszczalne mechanizmy zostaną potwierdzone metodami western blot, wizualizacji koekspresji przy użyciu mikroskopii skaningowej i konfokalnej a także metodami biologii molekularnej takimi jak koimmunoprecypitacja, termoforeza, przeszukiwania biblioteki w drożdżowym systemie dwuhybrydowym czy różnicowe skanowanie fluorymetrii (DSF) na białkach oczyszczonych w prokariotycznym i/lub eukariotycznym systemie bakulowirusowym.

3. Wpływ spodziewanych rezultatów na rozwój nauki

Rola białka AlkB *E.coli* (EcAlkB) została rozpoznana na początku XXI w prowadząc do odkrycia homologów tego białka w prawie wszystkich organizmach, w tym dziewięciu homologów u człowieka (ALKBH1-8 i FTO). U *E.coli* AlkB tworzy jedno-białkowy system naprawy uszkodzeń alkilacyjnych w DNA i RNA. Odkryto, że homologi EcAlkB oprócz funkcji naprawczych pełnią różnorodne funkcje biologiczne, również w metabolizmie nowotworów (badania własne). Wielkie zainteresowanie wzbudziło odkrycie, że białko FTO może być powiązane z otyłością. Najnowsze badania wskazują raczej na określone polimorfizmy w genie *Fto* jako przyczynę zwiększenia masy ciała, ale nasze badania wstępne silnie sugerują udział samego białka FTO w rozwoju otyłości i powiązanie tego zjawiska z T2D. Wydaje się, że również inne białka ALKBH (homologi 1, 5, 7) biorą udział w funkcjonowaniu określonych ścieżek metabolicznych. Zastosowanie modelu świńskiego jest wartością samą w sobie, gdyż w porównaniu z powszechnie stosowanym, niedoskonałym modelem mysim, model świński w pełni można ekstrapolować na człowieka. Uzyskane wyniki przyczynią się do rozwoju wiedzy na temat kształtowania się mechanizmów insulinooporności w otyłości zarówno wywołanych czynnikami środowiskowymi jak i genetycznymi. Ponadto uzyskamy wiedzę na temat dystrybucji tkankowej białek ALKBH, poznane zostaną nowe funkcje tych białek, co znacznie poszerzy obszar dotychczasowej wiedzy.