

Lipopolisacharyd (LPS) jest składnikiem budulcowym bakterii Gram-ujemnych. W czasie infekcji LPS staje się czynnikiem, który wywołuje reakcję zapalną organizmu, ułatwiającą zwalczanie zakażenia. Do najważniejszych typów komórek odpowiedzialnych za ten proces należą makrofagi. Komórki te wyposażone są w receptory rozpoznające cząsteczki budulcowe patogenów, takie jak LPS. W rozpoznaniu LPS uczestniczy przede wszystkim białko błony komórkowej CD14 i receptor TLR4 zasocjowany z białkiem MD2. Aktywowany przez LPS receptor TLR4 uruchamia dwa szlaki sygnałowe prowadzące do produkcji mediatorów reakcji zapalnej, w tym cytokin. Aktywacja makrofagów musi podlegać ścisłej kontroli, ponieważ nadmierna odpowiedź komórek na LPS może prowadzić do ogólnoustrojowej reakcji zapalnej, sepsy, na którą narażeni są m.in. pacjenci poddani zabiegom chirurgicznym. Ciężka sepsa i szok septyczny kończą się śmiercią w 30-50% przypadków. Niestety, dieta bogata w tłuszcze nasycone, tzw. dieta świata zachodniego, sprzyja pojawianiu się we krwi niskich dawek LPS pochodzącego z mikroflory jelitowej, co prowadzi do chronicznej reakcji zapalnej wiązanej m.in. z rozwojem cukrzycy typu II i arteriosklerozy.

Nasz projekt zmierza do ujawnienia nowego mechanizmu kontrolującego odpowiedź prozapalną makrofagów na LPS. Opiera się on na regulacji funkcjonowania enzymu, kinazy diacyloglicerolowej epsilon (DGK ϵ), której aktywność wpływa na poziom określonych lipidów, fosfatydyloinozytoli, w komórce. Wyniki naszych wcześniejszych badań ujawniły, że jeden z tych lipidów, fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan [PI(4,5)P₂], wzbogaca się w błonie komórkowej makrofagów stymulowanych przez LPS. Wiadomo też, że PI(4,5)P₂ kontroluje przebieg szlaków sygnałowych indukowanych przez LPS, gdyż on sam jak i jego pochodne wpływają na aktywność i lokalizację szeregu białek, które składają się na kaskadę przenoszącą sygnał od receptora do jądra, prowadząc ostatecznie do ekspresji genów kodujących cytokiny. Fosfatydyloinozytyle ulegają wzajemnym przemianom, a PI(4,5)P₂ podlega też ważnej w punkcie widzenia przekazywania sygnału hydrolizie, po której musi zostać w komórce odtworzony. Taki obieg lipidów nazywa się cyklem fosfatydyloinozytolowym (PI). W tym cyklu, kinaza DGK ϵ fosforyluje diacylglicerol powstający w wyniku hydrolizy PI(4,5)P₂, do kwasu fosfatydowego, umożliwiając jego recykling do PI, następnie do PI(4)P, a ostatecznie do PI(4,5)P₂.

W naszym projekcie chcemy wykazać, że określona modyfikacja kinazy DGK ϵ -palmitoilacja- jest kluczowym modulatorem funkcjonowania tego enzymu w makrofagach stymulowanych przez LPS. Tym samym ta modyfikacja kinazy DGK ϵ może być istotna dla utrzymania właściwego poziomu PI(4,5)P₂ w makrofagach poddanych działaniu LPS. Nasze ostatnie badania proteomiczne wykazały, że pod wpływem LPS poziom palmitoilowanej formy kinazy DGK ϵ w makrofagach wzrasta. Palmitoilacja polega na przyłączeniu reszty kwasu tłuszczowego -kwasu palmitynowego- do białka. Taka modyfikacja diametralnie zmienia właściwości białek. Ułatwia ich interakcje z błonami, zmienia aktywność enzymów i ich lokalizację w komórce. **Uważamy, że palmitoilacja decyduje o włączaniu kinazy DGK ϵ do cyklu PI w makrofagach stymulowanych przez LPS, a przez to jest istotna dla przebiegu prozapalnych szlaków sygnałowych.**

Palmitoilacja kinazy DGK ϵ nie była dotąd badana, ale nasza hipoteza ma uzasadnienie w danych na temat struktury i funkcji tego enzymu w komórce, a także w wynikach naszych badań wstępnych. Chcemy wykryć, które aminokwasy DGK ϵ są modyfikowane przez przyłączenie reszty kwasu palmitynowego. Następnie, chcemy ustalić czy palmitoilacja DGK ϵ jest istotna dla jej udziału w szlakach sygnałowych indukowanych w makrofagach przez LPS. W tym celu otrzymamy formy DGK ϵ zmutowane w miejscach palmitoilacji, które następnie wprowadzimy do komórek. Będą to również komórki, które uprzednio pozbawimy endogennej DGK ϵ przy pomocy wektorów wirusowych. Zbadamy, czy w takich komórkach zmieni się przebieg prozapalnych szlaków sygnałowych receptora TLR4, a także poziom badanych lipidów. Równolegle ustalimy jak LPS wpływa na palmitoilację kinazy DGK ϵ i jakie jest znaczenie tej modyfikacji dla oddziaływania DGK ϵ z błonami komórkowymi, jej lokalizacji w komórce i aktywności enzymatycznej. Zidentyfikujemy enzym(y) katalizujące palmitoilację DGK ϵ . **Uważamy, że palmitoilacja jest sygnałem zapewniającym właściwe umiejscowienie DGK ϵ w komórce, tj. jej wiązanie z błoną komórkową lub retikulum endoplazmatycznym, przez co decyduje o jej udziale w cyklu PI, a przez to w szlakach sygnałowych indukowanych przez LPS.** Nasze badania będą oparte na nowoczesnych technikach, począwszy od użycia spektrometrii mas do identyfikacji palmitoilowanych aminokwasów DGK ϵ , biochemicznych analiz palmitoilacji kinazy przy użyciu tak zwanej reakcji „click”, testów immunologicznych do analizy reakcji makrofagów, poprzez pomiary lipidów, do mikroskopii konfokalnej.

Całościowo, proponowane w projekcie badania charakteryzują po raz pierwszy palmitoilację DGK ϵ i odpowiedzą na pytanie, jak palmitoilacja kinazy DGK ϵ moduluje odpowiedź makrofagów na LPS. Te zagadnienia nie były dotąd badane, dlatego też proponowane badania są oryginalne i nowatorskie. Przyczynią się one do poszerzenia wiedzy o mechanizmach regulacji aktywności prozapalnej makrofagów. W przyszłości mogą być przydatne do opracowania skutecznych leków przeciwdziałających nadmiernej odpowiedzi na LPS. Ponadto, dysfunkcja kinazy DGK ϵ jest obecnie wiązana z kilkoma chorobami, m.in. chorobą nerek, dlatego też nasze badania przyniosą informacje ważne w kontekście wykraczającym poza patogenezę sepsy.