

## **W poszukiwaniu roli karpiego białka aklimatyzacji do chłodu cap31 – nowy gracz w odporności ryb na drobnoustroje?**

**Cel.** Celem projektu jest uzyskanie informacji na temat nieopisanego do tej pory białka Cap31, w tym jego struktury, charakterystyki, lokalizacji, dynamiki zmian podczas aklimatyzacji do chłodu oraz zakażeń ryb drobnoustrojami. Naszym zadaniem Cap31 jest nowym, niezmiernie ważnym graczem w ochronie ryb przed drobnoustrojami. Hipoteza badawcza zakłada, że Cap31 ma aktywność deaminazy cytydynamowej, enzymu który ma zdolność modyfikacji jednoniciowego DNA i RNA drobnoustrojów i którego ekspresja jest uzależniona od zakażeń drobnoustrojami, a także od czynników ontogenetycznych i filogenetycznych. Cap31 może być także istotnym biomarkerem dobrostanu ryb.

**Opis badań.** Istnienie białka Cap31 zostało wydedukowane z analizy genomu karpia oraz wyników spektrometrii mas spotu białkowego uzyskanego w elektroforezie dwuwymiarowej, ale nikt jeszcze nie zbadał jego właściwości. Z tego powodu uznajemy za niezmiernie ważne wyizolowanie omawianego białka z krwi karpia w celu zbadania jego struktury i funkcji. Badania rozpoczną się izolacją Cap31, co doprowadzi do uzyskania czystych preparatów białkowych umożliwiających jego charakterystykę. W następnym etapie planuje się opracowanie narzędzi do pomiarów analitycznych stężeń Cap31 (test immunoenzymatyczny, ELISA) oraz jego lokalizacji w tkankach metodami immunohistochemicznymi. Omawiane narzędzia (wraz z pomiarami ekspresji genu Cap31) zostaną zastosowane w doświadczeniach ukierunkowanych na poszerzenie wiedzy na temat lokalizacji Cap31 w tkankach ryb w celu ustalenia jego miejsca produkcji i dystrybucji. Ponadto zbadamy ekspresję Cap31 w czasie rozwoju ryb, co umożliwi ustalenie etapu jego pojawienia się w stadiach rozwojowych. Następne doświadczenia będą skupiały się na uzyskaniu szczegółowych informacji dotyczących pojawienia się Cap31 podczas aklimatyzacji do chłodu. Z naszych doświadczeń wiadomo, że Cap31 jest syntetyzowany u karpia w odpowiedzi na ochłodzenia, ale nie wiemy kiedy omawiana synteza się rozpoczyna i jaka jest jej dynamika. We współpracy z Fish Disease Research Unit, Institute for Parasitology, University of Veterinary Medicine Hannover, przeprowadzimy szereg doświadczeń ukierunkowanych na określenie zmian Cap31 w trakcie eksperymentalnych bakteryjnych, wirusowych i pleśniowych zakażeń ryb przeprowadzonych w różnych temperaturach. Tą drogą spodziewamy szczegółowo dowiedzieć się o możliwej roli Cap31 w zakażeniach ryb drobnoustrojami. Badania zakończą się doświadczeniami ukierunkowanymi na sprawdzenie możliwości przydatności Cap31 do monitorowania dobrostanu ryb utrzymywanych w akwakulturze, w szczególności pod kątem stresu oraz zdrowotności.

**Uzasadnienia.** Wstępnym uzasadnieniem badań była ciekawość związana z brakiem identyfikacji białka o statucie „niescharakteryzowane” które odkryliśmy w naszych wcześniejszych badaniach. Jednakże kluczowe okazały się wyniki naszych badań wstępnych oraz analizy ostatnio zaktualizowanych baz danych, które wyraźnie wskazały że Cap31 może być nowym, dotąd nieopisanym, graczem w odporności ryb na drobnoustroje. Niedawno udało się wykazać homologię Cap31 z wydzielniczymi indukowanymi aktywacją deaminazami AID/APOBEC (SNAD), które należą do enzymów zdolnych do przekształcenia cytydyny do uracylu w jednoniciowych kwasach nukleinowych i tym samym doprowadzając do mutacji DNA lub RNA zarówno u gospodarza jak i patogenu. Z tego powodu badania nad Cap31 wydają się niezmiernie ważne w świetle jego znaczenia w omawianym mechanizmie odporności u ryb, który nie został do tej pory opisany.

**Oczekiwane efekty.** Naszym zdaniem projekt powinien wnieść niezmiernie ważny wkład do immunologii ryb poprzez opisanie nieznanego do tej pory mechanizmu obrony przed drobnoustrojami. Uzyskane wyniki powinny przyczynić się do pogłębienia wiedzy nad temat mechanizmów infekcji u ryb i roli Cap31 w zwalczaniu chorób u ryb. Uważamy, że zastosowanie Cap31 dla lepszego zrozumienia problemów dobrostanu u ryb może także przyczynić się do poprawy warunków ich bytowania, z wykorzystaniem Cap31 jako biomarkera do monitorowania zdrowia ryb i mechanizmów odpornościowych.