

Streszczenie

Chemeryna, białkowy produkt genu TIG2 (ang. *tazarotene induced gene 2*), to niedawno odkryty czynnik chemotaktyczny regulujący migrację komórek układu immunologicznego, posiadających na swej powierzchni receptor CMKLR1. Chemeryna kontroluje również rozwój i fizjologię komórek tłuszczowych, osteoblastów, miocytów oraz reguluje metabolizm glukozy, co czyni ją łącznikiem pomiędzy procesami metabolicznymi, a układem odporności. Chociaż za głównych producentów chemeryny uważa się wątrobę i tkankę tłuszczową, chemeryna obecna jest również w nabłonkach, np. w naskórku, jednak jej funkcja i forma, w jakiej występuje oraz mechanizmy jej regulacji w tkankach nabłonkowych pozostają niewyjaśnione. Co ciekawe, ekspresja chemeryny w naskórku zanika w łuszczycy, chorobie o podłożu autoimmunizacyjnym, co sugeruje ochronne funkcje chemeryny w tej tkance.

Aby określić mechanizmy regulacji ekspresji chemeryny w naskórku, przygotowano trójwymiarowe (3D), organotypowe hodowle pierwotnych ludzkich keratynocytów, które naśladują morfologicznie i funkcjonalnie wielowarstwowy, ludzki naskórek. Naskórek stanowi naturalną barierę ciała, w związku z tym oddziałują na tą tkankę zarówno obecne w środowisku mikroorganizmy, jak i czynniki uwalniane przez komórki układu odporności naciekające skórę w stanach zapalnych. Założono zatem, że wśród czynników wpływających na poziom ekspresji chemeryny w naskórku znajdują się zarówno bakterie, jak również cytokiny o kluczowym znaczeniu w indukcji łuszczycy, a także cytokiny ostrej fazy, których zadanie polega na przywróceniu naturalnej homeostazy organizmu naruszonej w wyniku stanu zapalnego. Wykazano, że chemeryna w hodowlach naskórka, jest różnicowo regulowana przez bakterie. Podczas gdy cytokiny „ostrej fazy” tj. onkostatyna M i/lub IL-1 β stymulują ekspresję chemeryny w keratynocytach, cytokiny pełniące kluczową rolę w patogenezie łuszczycy, IL-17 i/lub IL-22 hamują syntezę tego białka w naskórku. Zgadza się to z obrazem klinicznym łuszczycy, gdzie ekspresja chemeryny w zmienionym chorobowo naskórku jest zahamowana.

Chemeryna wydzielana jest poza komórkę jako nieaktywna biologicznie cząsteczka, która ulega aktywacji w wyniku usunięcia hamującej sekwencji zlokalizowanej na końcu C przez proteinazy serynowe i cysteinowe. Chemeryna występuje w różnych izoformach, które różnią się długością i stopniem aktywności. Podjęto próbę zidentyfikowania izoformy w jakiej chemeryna występuje w naskórku. Wykazano, iż chemeryna ulega potranslacyjnym

modyfikacjom *in vitro* w wyniku reakcji transglutaminacji katalizowanej przez transglutaminazy naskórkowe. Tego rodzaju modyfikacje mogą być potencjalnie odpowiedzialne za tworzenie wysokocząsteczkowych form chemeryny wykrywanych w naskórku.

Chemeryna pod względem budowy zbliżona jest do katelicydyn, czynników o działaniu antybakteryjnym. Postawiono zatem hipotezę, iż chemeryna może posiadać własności antybakteryjne. Pokazano po raz pierwszy, że zarówno rekombinowana ludzka chemeryna jak i chemeryna wydzielana przez keratynocyty w hodowlach organotypowych hamuje wzrost bakterii. Ponadto, wykazano, że myszy z genetycznym deficytem chemeryny charakteryzują się ograniczoną zdolnością kontroli wzrostu bakterii w modelu infekcji skórnej. Odkryto tym samym zupełnie nową funkcję tego białka. Ponadto zidentyfikowano region Val⁶⁶-Pro⁸⁵ (peptyd 4) zlokalizowany w środkowej części chemeryny, jako fragment głównie odpowiedzialny za własności antybakteryjne całego białka. Syntetyczny peptyd Val⁶⁶-Pro⁸⁵ charakteryzuje się dużym potencjałem bakteriobójczym w porównaniu do znanych czynników przeciwbakteryjnych oraz szerokim spektrum działania.

Podsumowując, w niniejszej pracy zidentyfikowano po raz pierwszy czynniki mogące regulować poziom ekspresji chemeryny w naskórku. Pokazano niebadane do tej pory modyfikacje chemeryny, które mogą wpływać na jej stabilność i funkcję w naskórku. Ponadto zaprezentowano nową, przeciwbakteryjną funkcję tego białka. Sugeruje to, iż chemeryna jest istotnym czynnikiem biorącym udział w utrzymaniu homeostazy naskórka.

Cele pracy

Chemeryna jest białkowym chemoatraktantem i adipokiną o istotnej funkcji w procesach zapalnych i metabolicznych. Wydzielana jest w postaci nieaktywnej biologicznie proformy i do uzyskania pełnej aktywności chemotaktycznej wymaga proteolitycznej modyfikacji końca C. Chociaż chemeryna jest wykrywana w naskórku osób zdrowych, a jej stężenie w naskórku drastycznie maleje w niektórych chorobach skóry, to jej funkcja, mechanizmy regulacji ekspresji oraz forma w jakiej występuje w tej tkance pozostawała niewyjaśniona. W niniejszej pracy postawiono następujące cele badawcze:

1. Określenie poziomu ekspresji chemeryny w naskórku w porównaniu do innych tkanek oraz identyfikacja czynników potencjalnie regulujących ekspresję chemeryny w tej tkance. Opis tych badań zawarto w pracy:

Banas M, Zegar A, Kwitniewski M, Zabieglo K, Marczyńska J, Kapinska-Mrowiecka M, LaJevic M, Zabel BA, Cichy J. (2015) The expression and regulation of chemerin in the epidermis. Plos ONE 10(2): e0117830 (Załącznik 1)

2. Określenie formy w jakiej chemeryna występuje w ludzkim naskórku oraz opis potencjalnych modyfikacji jakim chemeryna może być poddawana w tej tkance. Uzyskane wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy nie zostały opublikowane.

3. Określenie roli chemeryny w naskórku. Założono, że ze względu na strategiczną pozycję chemeryny w naskórku reprezentującym naturalną barierę ciała, oraz podobieństwo strukturalne do przeciwbakteryjnych katelicyn, funkcja chemeryny w naskórku będzie polegała na kontroli wzrostu bakterii mających kontakt z tą tkanką. Weryfikacja tej hipotezy zawierała trzy etapy:

- a) Zbadanie funkcji rekombinowanej chemeryny jako czynnika przeciwbakteryjnego oraz identyfikację potencjalnej domeny odpowiedzialnej za przeciwbakteryjną funkcję tego białka. Opis tych badań zawarto w pracach:

Kulig P, Kantyka T, Zabel BA, Banas M, Chyra A, Stefanska A, Tu H, Allen SJ, Handel TM, Kozik A, Potempa J, Butcher EC, Cichy J. (2011) Regulation of chemerin chemoattractant and antibacterial activity by human cysteine cathepsins. *J Immunol* 187: 1403-1410 (Załącznik 2)

Banas M, Zabieglo K, Kasetty G, Kapinska-Mrowiecka M, Borowczyk J, Drukala J, Murzyn K, Zabel BA, Butcher EC, Schroeder JM, Schmidtchen A, Cichy J. (2013) Chemerin is an antimicrobial agent in human epidermis. *Plos ONE* 8(3): e58709 (Załącznik 3)

- b) Zbadanie czy chemeryna wydzielana przez pierwotne, ludzkie keratynocyty posiada własności bakteriobójcze. Opis tych badań zawarto w pracy:

Banas M, Zabieglo K, Kasetty G, Kapinska-Mrowiecka M, Borowczyk J, Drukala J, Murzyn K, Zabel BA, Butcher EC, Schroeder JM, Schmidtchen A, Cichy J. (2013) Chemerin is an antimicrobial agent in human epidermis. *Plos ONE* 8(3): e58709 (Załącznik 3)

- c) Analizę porównawczą podatności na infekcje bakteryjne skóry zwierząt produkujących funkcjonalną chemerynę i zwierząt z deficytem chemeryny. Opis tych badań zawarto w pracy:

Banas M, Zegar A, Kwitniewski M, Zabieglo K, Marczyńska J, Kapinska-Mrowiecka M, LaJevic M, Zabel BA, Cichy J. (2015) The expression and regulation of chemerin in the epidermis. *Plos ONE* 10(2): e0117830 (Załącznik 1)