

Streszczenie

Limfocyty Th17 należą do populacji efektorowych limfocytów T pomocniczych odgrywających w organizmie człowieka rolę zarówno pozytywną jak i negatywną m.in. poprzez wydzielane cytokiny IL-17A, IL-17F, IL-21 oraz IL-22. Rozwój limfocytów Th17 z dziewiczych komórek CD4⁺ zapoczątkowywany jest przez zestaw cytokin inicjujących odpowiedni program różnicujący prowadzący do ekspresji czynników transkrypcyjnych (STAT3, ROR γ T) oraz genów kodujących cytokiny (IL-17).

Limfocyty Th17 uczestniczą głównie w zwalczaniu patogenów grzybiczych (*Candida albicans*) oraz bakteryjnych (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*) w obrębie błon śluzowych układu oddechowego i pokarmowego. Często jednak zapalenie, w którym pośredniczą komórki Th17, w warunkach zaburzonej równowagi w układzie odpornościowym, prowadzi do wielu chorób autoimmunologicznych, np. reumatoidalnego zapalenia stawów, zapalenia mózgu i rdzenia, stwardnienia rozsianego i łuszczycy.

Komórki Th17 są stosunkowo słabo poznane pod względem molekularnym. Zidentyfikowane do tej pory geny podlegające zmianom w ekspresji w trakcie ich różnicowania z prekursorowych komórek CD4⁺ nie do końca dobrze je charakteryzują, gdyż zdarza się, że ulegają zmianom ekspresji także w innych typach komórek.

Celem rozprawy doktorskiej była identyfikacja genów, których ekspresja podlega zmianom w trakcie różnicowania limfocytów Th17 z prekursorowych komórek CD4⁺ izolowanych z krwi obwodowej człowieka, i wyodrębnienie genów które mogą stanowić dokładniejszą sygnaturę molekularną dla tych komórek. Kolejnym celem badań była analiza wybranych zmian epigenetycznych związanych ze zróżnicowaną ekspresją zidentyfikowanych genów w komórkach Th1, Th2, Th17 i Treg i próba identyfikacji markerów epigenetycznych korelujących z wysoką ekspresją zidentyfikowanych genów.

W ramach realizacji pracy doktorskiej z komórek PBMC izolowanych z kożuszków limfocytarno-leukocytarnych pozyskiwanych od zdrowych, anonimowych dawców uzyskiwano komórki CD4⁺, które następnie różnicowano w kierunku komórek Th1, Th2, Th17 i Treg. Różnicowanie w kierunku limfocytów Th17 prowadzono w medium Yssel z ludzką surowicą AB i cytokinami (IL-1 β , IL-6, IL-23, TGF- β) w obecności antygenów CD2/CD3/CD28. Całkowite zróżnicowanie otrzymanych populacji komórek Th17 potwierdzano pomiarem ilości wydzielanej IL-17 przy użyciu

techniki ELISA oraz pomiarem ekspresji genów *ROR γ T*, *IL17A*, i *IL17F* na poziomie mRNA przy użyciu techniki RT-PCR w czasie rzeczywistym.

Ze zróżnicowanych komórek Th17 oraz komórek CD4⁺ wytworzono biblioteki cDNA, które następnie przeanalizowano metodą sekwencjonowania RNA o wysokiej rozdzielczości (RNA-seq). Po zlokalizowaniu otrzymanych krótkich sekwencji DNA w obrębie genomu referencyjnego wytypowano geny o statystycznie istotnych różnicach w wartościach ekspresji pomiędzy próbkami. Wytypowane geny poddano następnie analizie funkcjonalnej z zastosowaniem bazy KEGG oraz bazy danych ontologii genowych. Zaobserwowano udział produktów analizowanych genów m.in. w szlakach sygnałowych związanych z różnicowaniem komórek Th17, w szlakach sygnałowych inicjowanych przez IL-17 czy też w szlakach sygnałowych aktywnych w nowotworach. Analiza ontologii genowych w kontekście procesów biologicznych, w których uczestniczą ich produkty wykazała, że najliczniej reprezentowane były geny kodujące białka powiązane z procesami różnicowania komórek oraz z regulacją procesów zachodzących w układzie odpornościowym. Spośród uzyskanej grupy genów, które zmieniały swoją ekspresję podczas różnicowania limfocytów Th17 podjęto próbę wytypowania genów specyficznych dla komórek Th17. W celu identyfikacji genów specyficznych dla Th17, przeprowadzono analizę ekspresji kilkudziesięciu genów w komórkach Th1, Th2, Th17 i Treg pochodzącymi od dwóch dawców przy zastosowaniu metody RT-PCR w czasie rzeczywistym. Ta wstępna analiza pozwoliła na wytypowanie trzech genów: *APOD* (koduje apolipoproteinę D), *CIQL1* (koduje składnik dopełniacza 1, q podobnego do podkomponentu 1) i *CTSL* (koduje katepsynę L), których ekspresja była najwyższa w komórkach Th17. Zgodnie z wstępnymi badaniami, analiza ekspresji wytypowanych genów na poziomie mRNA wykazała, że ich ekspresja w komórkach Th17 była istotnie statystycznie wyższa w porównaniu do pozostałych subpopulacji komórek CD4⁺. Ekspresję badanych genów potwierdzono także na poziomie białka przy zastosowaniu metod western blottingu i ELISA. Obecność białka katepsyny L (CTSL) zaobserwowano wyłącznie w limfocytach Th17 natomiast ekspresja białka APOD w pozostałych analizowanych subpopulacjach limfocytów CD4⁺ była na znacznie niższym poziomie. Występowanie białka CIQL1 zaobserwowano w komórkach Th17 i Treg, przy czym w limfocytach Th17 ekspresja była kilkukrotnie wyższa.

W kolejnym etapie badań podjęto próbę określenia występowania specyficznych modyfikacji epigenetycznych, które mogłyby być związane z wysoką ekspresją *APOD*, *CIQL1* i *CTSL* w limfocytach Th17. Analizie poddano wybrane wzorce metylacji

i acetylacji histonów w regionach promotorowych zidentyfikowanych genów w subpopulacjach limfocytów T *in vivo* przy zastosowaniu techniki immunoprecypitacji chromatyny (ChIP). Stwierdzono, że wysoka ekspresja genów *APOD*, *CIQL1* i *CTSL* w ludzkich komórkach Th17 jest związana z wysokimi poziomami acetylowanego histonu H2BK12 w ich regionach promotorowych.

Ekspresja zidentyfikowanych specyficznych genów i ich produktów białkowych mają potencjalne znaczenie kliniczne w identyfikacji zapalenia związanego z komórkami Th17 i w przyszłości mogą stanowić cele terapeutyczne w przebiegu chorób z udziałem komórek Th17.

