

Ścieżka sygnałna kalcyneuryny u wyższych Eukaryota jest zaangażowana w wrodzoną odpowiedź immunologiczną na zakażenie grzybami patogennymi. Mechanizmy immunologiczne błon śluzowych gospodarza (funkcja komórek tucznych) oraz czynniki wirulencji *Candida* wyzwalające odpowiedź obronną pozostają nieznane. W Projekcie prezentujemy nowatorskie podejście, jak dotąd nieopisane w literaturze, koncentrujące się na interakcji regulatorowej podjednostki kalcyneuryny *Candida albicans Cal* (kodowanej przez gen *CNBI*) z komórkami tuczными (mastocytami) - sensorami wrodzonej i efektorami nabytej odporności. Receptor lektynowy typu C - dektyna-1 (rodzina CLR) aktywuje ścieżkę sygnałną, gdy komórka odpornościowa wchodzi w bezpośredni kontakt z patogenem grzybiczym. Podczas realizacji Projektu odpowiemy na pytania: (a) czy kalcyneuryna *Cal* posiadająca aktywność fosfatazy serynowo-treoninowej (zależnej od jonów Ca<sup>2+</sup>), kontroluje rozpoznanie beta-glukanu przez dektynę-1 obecną w błonie mastocytów oraz (b) w jaki sposób mastocyty reagują na zakażenie *Cal* pod wpływem pochodnej proksyfilinowej (inhibitora grzybiczej kalcyneuryny) w warunkach *in vitro* i *in vivo*? Wieloetapowe postępowanie badawcze obejmujące dzikie (C57BL/6J i BALB/c) i transgeniczne szczepy mysie (Cpa3-Cre; IL-10fl/fl; Lyst) zmierza do poznania funkcji genu *CNBI Cal* w patogenezie kandydozy i aktywacji mastocytów do jej hamowania *in vivo* (Medyczny Uniwersytet w Wiedniu, MUW). Ustalimy czy beta-glukan (wzorzec molekularny dzikiego szczepu *Cal* SC5314 ATCC i mutantów *cnb1Δ*) wiążący bezpośrednio dektynę-1 indukuje mastocyty do degranulacji i uwalniania cytokin/chemokin (TNF- $\alpha$ , IL-1/6/18, IL-17, type I IFNs, CXCL/CCL) *in vivo* (MUW) oraz *in vitro* (Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii Politechnika Warszawska – CEZAMAT PW). Uściślając, ustalimy czy zwiększony poziom beta-glukanu w komórkach *cnb1Δ* wpływa na zmianę tempa transkrypcji mRNA dektyny-1 podczas infekcji. Określimy czy delecja lub chemiczna inhibicja kalcyneuryny z udziałem pochodnej proksyfilinowej (nasze wstępne badania aktywności *in vitro* oraz zastosowanie modelowania molekularnego), indukują mechanizmy obronne w miejscu wniknięcia *Cal*: organizację synaps immunologicznych, zdolność fagocytarną mastocytów i produkcję NO, ROS i IL-10 (kluczowych w odpowiedzi przeciwgrzybiczej) (CEZAMAT). Sprecyzujemy rolę komórek tucznych w rozwoju wczesnej odpowiedzi immunologicznej, poprzez badanie wpływu genu *CNBI Cal* na indukcję mastocytów do produkcji IL-4. W miejscu inwazji *Cal* (szczepu dzikiego i mutantu *cnb1Δ*), zdefiniowane zostanie zjawisko zewnątrzkomórkowej sieci mastocytów (MCET). Badając odpowiedź immunologiczną na zakażenie *Cal* (szczepem dzikim i *cnb1Δ*), nakreślimy funkcję mastocytów w rozwoju reakcji zapalnej poprzez analizę poziomu uwalnianych mediatorów magazynowanych w ziarnistościach i syntetyzowanych *de novo* (histaminy, beta-heksozaminidazy, TNF- $\alpha$ , IL-1, -4, -6, -10). Ustalimy czy kooperacja dektyny-1 z glukanem *Cal* (szczepu dzikiego lub *cnb1Δ*) wyzwała tolerancję immunologiczną (poziom uwalnianej IL-10 hamującej zapalenie). Porównamy poziom cytokin (IL-1, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ ) u pacjentów immunosupresyjnych (z potwierdzoną kandydozą) do zdrowych dawców (CEZAMAT). Nasze wstępne badania dowodzą, iż delecja jak również inhibicja genu *CNBI Cal* zwiększa oporność na kandydozę *in vitro* i *in vivo*. W Projekcie cele realizowane będą przy użyciu: testów immunoenzymatycznych ELISA (uwalnianie cytokin, histaminy), metod cytometrii przepływowej (sortowanie mastocytów, detekcja wiązania glukan-dektyna-1, uwalnianie TNF- $\alpha$ , IL-1/6/18, IL-17, type I IFNs, CXCL/CCL), pomiarów spektrofotometrycznych (degranulacji mastocytów, reaktywnych form tlenu), analiz histologicznych (mikroskopia świetlna), konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej i mikroskopii sił atomowych i QCM (charakterystyka MCET i sił wiązania glukanu z dektyną-1), analizy poziomu tempa transkrypcji genów TNF- $\alpha$ , IL-1/6/18, IL-17, type I IFNs, CXCL/CCL oraz dektyny-1 (RT-PCR). Dowiedzimy roli *CNBI Cal* w aktywacji mastocytów *in vivo* (badanie etapów: zakażenia/zapalenia okrężnicy > rozsianej kandydozy) do zachowania homeostazy/ generowania reakcji zapalnej. Ustalimy czy mastocyty są niezbędne do ustanowienia wrodzonej odpowiedzi na kandydozę. Zgłębimy wiedzę odnośnie patogenezy zakażeń grzybiczych u pacjentów z obniżoną odpornością, kluczową dla interakcji gospodarz – *Cal* (dodatknie sprzężenie zwrotne w syntezie mediatorów prozapalnych indukowanych grzybiczą kalcyneuryną). Opracujemy strategię immunoterapeutyczną i przeciwgrzybiczą (kalcyneuryna cel dla pochodnej proksyfilinowej)