

JAKUB KOCHAN

Regulacja ekspresji genu wczesnej odpowiedzi komórkowej *IER3* na poziomie aktywacji promotora i kontroli czasu półtrwania transkryptu.

Zastosowanie metody immunofluorescencji połączonej z smRNA FISH.

Regulacja ekspresji genów jest złożonym, wieloetapowym procesem umożliwiającym komórkom odpowiedź na zmieniające się otoczenie. Do niedawna skupiano się głównie na pierwszym etapie regulacji ekspresji genów jakim jest aktywacja transkrypcji. W ostatnich latach liczne badania wykazały jednak, iż niemniej ważną rolę odgrywa regulacja post-transkrypcyjna. Dzięki znajdującym się w obrębie mRNA sekwencjom wiążącym specyficzne białka i miRNA możliwe są dynamiczne i zarazem precyzyjne zmiany ekspresji określonych genów.

Gen wczesnej odpowiedzi komórkowej *IER3* należy do genów szybko aktywowanych w trakcie reakcji zapalnej. Jego ekspresja jest indukowana przez cytokiny prozapalne takie jak TNF czy IL-1 β oraz przez czynniki bakteryjne i wirusowe. Białkowy produkt tego genu jest zaangażowany w regulację apoptozy, przy czym dokładny mechanizm jego działania w tym procesie nie jest do końca poznany. Najnowsze badania wskazują, że białko *IER3* chroni makrofagi przed indukowaną przez LPS śmiercią komórkową.

Pierwsza część przedstawionej rozprawy doktorskiej poświęcona jest regulacji ekspresji genu *IER3* na poziomie aktywacji transkrypcji. Kinetyka ekspresji genów wczesnej odpowiedzi komórkowej jest bardzo szybka, stąd udział w niej biorą czynniki transkrypcyjne, które w wyniku stymulacji komórek określonym bodźcem ulegają jedynie aktywacji bez konieczności czasochłonnej syntezy *de novo*. Uzyskane wyniki pokazują, że w zależną od IL-1 β indukcję ekspresji *IER3* zaangażowany jest szlak kinaz MEK/ERK prowadzący do fosforylacji czynnika transkrypcyjnego ELK1. W oparciu o analizy *in silico* oraz doświadczenia z wykorzystaniem systemu genów reporterowych zidentyfikowano miejsce wiązania czynnika ELK1 w promotorze *IER3* oraz wykazano, że obserwowana aktywacja jest niezależna od SRF - czynnika transkrypcyjnego, często występującego w kompleksie z ELK1. Ostatecznie, metodą immunoprecypitacji chromatyny, potwierdzono wiązanie ELK1 do promotora *IER3* *in vivo*. Wyniki badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Cytokine* (Kochan *et al.*, 2014).

Przedmiotem drugiej części pracy jest regulacja post-transkrypcyjna. Transkrypty genów wczesnej odpowiedzi komórkowej charakteryzuje nie tylko szybka indukcja, ale również szybka degradacja - czas półtrwania mRNA *IER3* wynosi poniżej 30 minut. Mechanizmy odpowiedzialne za ten proces są w dalszym ciągu słabo poznane. Jedynym jak dotąd opisanym białkiem destabilizującym mRNA *IER3* jest tristetrapolina (TTP). Wiąże się ona do sekwencji bogatych w adeninę i uracyl (ang. *adenylate-uridylate-rich element*, ARE) obecnych w rejonie 3'-nieulegającym translacji (ang. *3'-untranslated region*, 3'UTR). Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej analizy *in silico* rejonu 3'UTR *IER3* wykazały obecność potencjalnego miejsca wiązania dla niedawno zidentyfikowanego białka o aktywności rybonukleazy – MCPIP1. Badania nad funkcją tego białka zaowocowały opracowaniem nowej metody, pozwalającej na jednoczesną ilościową detekcję transkryptów i białek w oparciu o podejście badawcze wykorzystujące metodę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* do detekcji pojedynczych cząsteczek RNA (ang. *single-molecule RNA fluorescence in situ hybridization*, smRNA FISH) (Kochan *et al.*, 2015 *BioTechniques*). Opracowana w niniejszej pracy metoda pozwala na analizę oddziaływań białka z transkryptem w pojedynczej komórce, co daje możliwość bezpośredniego zbadania skutków tego oddziaływania. Równocześnie umożliwia ona precyzyjną detekcję ilości transkryptu w pojedynczej komórce. Metoda ta, wraz z systemem genów reporterowych oraz immunoprecypitacją RNA, pozwoliła na uzyskanie ostatecznych dowodów na oddziaływanie *in vivo* białka MCPIP1 z mRNA *IER3*. Dzięki jej zastosowaniu wykazano również, że obecność aktywnej RNazowo formy MCPIP1 skorelowana jest ze zmniejszoną ilością transkryptów *IER3*. Zidentyfikowano ponadto konserwatywne sekwencje obecne w 3'UTR *IER3* odpowiedzialne za przyłączanie do tego transkryptu białka MCPIP1 (Kochan *et al.* 2016, *Biology Open*, praca przyjęta do druku).