

Streszczenie pracy doktorskiej Kamili Kwiecień pt. „Regulacja ekspresji chemeryny”

Chemeryna to białko o właściwościach chemotaktycznych, kodowane przez gen *RARRES2*. Zaangażowane jest w regulację różnych procesów biologicznych, od odpowiedzi immunologicznej, adipogenezy, osteoblastogenezy czy angiogenezy, przez metabolizm glukozy i lipidów, aż do właściwości przeciwbakteryjnych. Chemeryna ulega ekspresji w większości tkanek i komórek, choć za głównych producentów uważa się wątrobę oraz białą tkankę tłuszczową, skąd wydzielana jest do krwiobiegu. Mimo, iż jest to białko wielofunkcyjne, szeroko rozpowszechnione w organizmie, niewiele wiadomo na temat mechanizmów regulacji jego ekspresji.

W niniejszej pracy opisano jak na produkcję mysiej chemeryny wpływają czynniki prozapalne, takie jak cytokiny interleukina 1 β (IL-1 β) oraz onkostatyna M (OSM). Wykazano, że adipocyty białej tkanki tłuszczowej reagują na stymulację cytokinami prozapalnymi zwiększeniem ekspresji chemeryny, zarówno na poziomie transkryptu jak i wydzielonego białka. Jednocześnie pokazano, że zastosowanie obu cytokin jednocześnie ma efekt addytywny. W hepatocytach natomiast poziom transkryptu *Rarres2* utrzymuje się na stałym poziomie, niezależnym od warunków zapalnych. Zaobserwowana specyficzność tkanki tłuszczowej w indukowanym cytokinami wzroście produkcji chemeryny, przyczyniła się do próby szerszego scharakteryzowania mechanizmów zaangażowanych w komórkowo-specyficzną kontrolę jej ekspresji.

W tym celu określono wzór metylacji cytozyn rejonu promotorowego mysiej chemeryny. Wykazano, że metylacja istotnie wpływa na poziom konstytutywnej ekspresji chemeryny – w komórkach nie produkujących tego białka poziom metylacji promotora był wysoki. Natomiast w komórkach charakteryzujących się aktywną transkrypcją chemeryny zaobserwować można podział promotora *Rarres2* na dwa fragmenty – dystalny o wyższej, i proksymalny o niższej średniej metylacji. Po stymulacji cytokinami prozapalnymi zaobserwowano zwiększenie poziomu metylacji dystalnego fragmentu promotora w dojrzałych adipocytach, natomiast w hepatocytach pozostawał on bez zmian. Sekwencję promotora chemeryny, jak i jego fragmentów dystalnego i proksymalnego, wykorzystano w lucyferazowych testach reporterowych w celu określenia ich aktywności transkrypcyjnej. Wykazano, że fragment proksymalny (+258/-252 par zasad od miejsca startu transkrypcji) promotora *Rarres2* odpowiedzialny jest za konstytutywną ekspresję chemeryny, a do optymalnego funkcjonowania wymaga niskiego poziomu metylacji oraz wysokiej metylacji przyległego fragmentu dystalnego. Badane fragmenty promotora *Rarres2* nie odpowiadały jednak na stymulację cytokinami prozapalnymi. Wykonano dodatkową analizę z wykorzystaniem ogólnodostępnych baz danych zawierających wyniki precypitacji chromatyny z zastosowaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania (ChIP-Seq). Wykazała ona brak obecności miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych związanych ze stanem

zapalnym w obrębie 1000 par zasad promotora chemeryny, sugerując, że elementy odpowiedzialne za wzmożoną ekspresję w warunkach prozapalnych znajdują się poza badanym obszarem. Dodatkowa analiza odległych elementów promotora chemeryny wyodrębniła wyspę odległą o 7000 par zasad od miejsca startu transkrypcji *Rarres2*, o przewidywanej aktywności transkrypcyjnej. Zastosowane testy reporterowe z użyciem sekwencji tego oddalonego fragmentu nie wykazały jednak jego udziału w zależnej od czynników zapalnych wzmożonej ekspresji chemeryny. Natomiast badania z wykorzystaniem inhibitorów wytypowanych czynników transkrypcyjnych wykazały, że ekspresja chemeryny po stymulacji IL-1 β zależna jest od czynnika NF κ B, a po stymulacji OSM – od STAT3.

Oprócz mechanizmów regulacji transkrypcji, za docelowy produkt ekspresji genu odpowiadają także modyfikacje post-transkrypcyjne, takie jak alternatywny splicing. W niniejszej pracy wykazano, że ludzka chemeryna posiada jeden wariant transkrypcyjny w wątrobie oraz w białej tkance tłuszczowej, natomiast mysia chemeryna posiada takich wariantów trzy, które generują dwie izoformy białka. Wariant 2/3 kodujący krótszą formę białka stanowi ok. 65% wszystkich wariantów, a wariant 1 kodujący białko dłuższe o jeden aminokwas – ok. 30%. Dodatkowo, w wyniku zastosowania metody RACE PCR udało się scharakteryzować nowy, czwarty wariant transkrypcyjny mysiej chemeryny, który stanowi około 1,5% wszystkich wariantów. Opisane izoformy mysiej chemeryny wyprodukowano w prokariotycznych systemach ekspresyjnych, z tym, że nowoodkrytej izoformy nie udało się oczyścić, prawdopodobnie ze względu na obniżoną stabilność białka w wyniku utraty mostka disiarczkowego. Izofomy 1 oraz 2 poddano testom funkcjonalnym, które wykazały, że obie izoformy mają podobne właściwości chemotaktyczne, natomiast izoforma 1 posiada wyższy potencjał przeciwbakteryjny.

Podsumowując, przedstawione badania pozwalają na lepsze zrozumienie regulacji transkrypcji chemeryny, zarówno konstytutywnej, jak i regulowanej czynnikami zapalnymi. Praca ta może przybliżyć do określenia roli zaburzonego wydzielania tego białka w trakcie patologicznego procesu zapalnego, charakterystycznego dla rozwoju otyłości czy tuszczycy.

Kwiecień Kamila

Kumarsuła Marcin

