

Interferony (IFN) są cząsteczkami pełniącymi bardzo ważną funkcję w obronie organizmów przed infekcjami wirusowymi. Ich zdolność do szybkiej i silnej indukcji antywirusowej odpowiedzi immunologicznej powoduje, że molekuly te zdolne są do kontroli praktycznie wszelkiego rodzaju infekcji wirusowych, przy braku odporności adaptacyjnej. Jednak *in vivo*, wirusy mogą nadal replikować i wywoływać stan chorobowy. Wiąże się to z ich zdolnością do częściowego unikania odpowiedzi indukowanej IFN. Z tego względu lepsze poznanie molekularnego mechanizmu działania szlaków sygnałowych podlegających indukcji przez IFN stanowi ogromne wyzwanie. Interferony typu I (IFN α i IFN β) indukują ekspresję genów ISG (IFN-stimulated gene) z udziałem szlaku sygnalizacyjnego JAK/STAT. Białka z rodziny JAK (Janus Kinases) prowadzą do autofosforylacji czynników STAT1 i STAT2 (Signal Transducer and Activator of Transcription). Homodimery STAT1 inicjują transkrypcję genów, które zawierają w swojej sekwencji promotorowej domenę GAS (IFN γ activation site). Natomiast wyższe kompleksy ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3), złożone ze STAT1 i STAT2, w połączeniu z białkowymi adaptorami IRF9 (Interferon Regulatory Factor), w odpowiedzi na interferony typu I, aktywują ekspresję genów posiadających w swej sekwencji nukleotydowej tzw. ISRE (Interferon-Stimulated Response Element). Dane literaturowe sugerują, że odpowiedź stymulowana przez interferony typu I może zachodzić również w przypadku braku STAT1. Molekularne podstawy tego procesu w dużym stopniu pozostają jednak niezrozumiałe; jak również mechanizm zależności pomiędzy szlakiem alternatywnym a klasyczną odpowiedzią na IFN typu I.

Stawiamy więc hipotezę, że istnieją szlaki sygnalizacyjne indukowane interferonem typu I niezależne od STAT1, oraz że kompleksy białkowe STAT2/IRF9 aktywują odpowiedź antywirusową na poziomie transkryptomu poprzez wiązanie się do sekwencji promotorowych posiadających domenę ISRE. Odpowiedź transkrypcyjna indukowana IFN α z udziałem czynników transkrypcyjnych STAT2 i IRF9 jest podobna do indukowanej przez kompleks ISGF3. Ponadto zakładamy, że istnieje grupa genów zależnych od STAT2/IRF9, ale niezależnych od ISGF3, co sugeruje nową rolę dla czynnika STAT2. Postulujemy, że typ odpowiedzi aktywowanej interferonem typu I jest uzależniony od ilości występowania komponentów kompleksu ISGF3.

W **rozdziale 1** opracowaliśmy metodę, która umożliwiła korelację odpowiedzi aktywowanej interferonem typu I na poziomie transkryptomu z wiązaniem czynników transkrypcyjnych, należących do kompleksu ISGF3. W tym celu wykorzystaliśmy dobrze poznany system komórkowy 2fTGH. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, w komórkach 2fTGH typu dzikiego, gdzie trzy komponenty kompleksu ISGF3 występują w dostatecznej ilości, całogenomowa odpowiedź interferonowa była silna i gwałtowna, o trendzie spadkowym, co było uzależnione od profilu fosforylacji = aktywacji czynników transkrypcyjnych STAT1 i STAT2 w obecności IRF9. Analiza transkryptomu pozwoliła na identyfikację 473 genów o zwiększonym poziomie ekspresji w odpowiedzi na stymulację IFN α . Dla większości tych genów potwierdziliśmy, że aktywacja ekspresji zależy od wiązania się wszystkich trzech składników kompleksu ISGF3 z sekwencją ISRE w promotorach tych genów. Ponadto, wśród genów o zwiększonym poziomie ekspresji zidentyfikowaliśmy grupę o przedłużonym w czasie profilu ekspresji, co sugeruje alternatywny mechanizm regulacji ich transkrypcji w późniejszej fazie odpowiedzi na IFN α .

W **rozdziale 2** skoncentrowaliśmy się na zbadaniu odpowiedzi indukowanej

interferonem typu I w komórkach pozbawionych STAT1. W celu zwiększenia efektu odpowiedzi na IFN α , wyprowadziliśmy stabilną linię komórkową ST2-U3C o zwiększonym poziomie ekspresji czynnika STAT2. Nasze wyniki wskazują, że odpowiedź transkrypcyjna na stymulację IFN α w komórkach ST2-U3C była podobna do odpowiedzi w komórkach typu dzikiego 2fTGH. Pula genów wspólnych była zaangażowana w odpowiedź antywirusową, a kompleks STAT2/IRF9 podobnie jak ISGF3, wiązał się z tymi samymi elementami ISRE w promotorach tych genów. Co ciekawe, profil ekspresji genów wspólnych uległ zmianie w komórkach ST2-U3C po stymulacji IFN α . Ekspresja genów stała się opóźniona i przedłużona w czasie, co silnie korelowało z przedłużonym profilem fosforylacji czynnika transkrypcyjnego STAT2 w obecności IRF9. Odpowiedź antywirusowa przeciwko zakażeniu wirusami VSV i EMCV została przywrócona po zwiększeniu poziomu ekspresji czynnika STAT2 (w komórkach ST2-U3C) i stała się porównywalna do odpowiedzi w komórkach typu dzikiego 2fTGH, wskazując na biologiczne znaczenie kompleksu STAT2/IRF9. Na podstawie analiz porównawczych odpowiedzi interferonowej w obu systemach komórkowych sądzimy, że kompleks STAT2/IRF9 może przejąć rolę ISGF3 w przypadku braku czynnika STAT1. Dodatkowo, zidentyfikowanie genów zależnych od działania kompleksu STAT2/IRF9, a niezależnych od ISGF3, sugeruje nową rolę tego kompleksu w odpowiedzi indukowanej interferonem typu I. Następnie zadaliśmy pytanie, czy kompleks STAT2/IRF9 może funkcjonować w obecności czynnika STAT1? Jeśli tak, to czy STAT2/IRF9 przejmuje rolę kompleksu ISGF3 czy odgrywa rolę komplementarną/pomocniczą?

W **rozdziale 3** wykazaliśmy, że w komórkach NB4, w których obserwujemy różnice w profilach fosforylacji=aktywacji pomiędzy czynnikami STAT2 a STAT1, gdzie dla STAT2 jest on przedłużony a dla STAT1 przejściowy, a dodatkowo ekspresja czynnika IRF9 jest opóźniona, kompleks STAT2/IRF9 może uczestniczyć w późniejszej fazie odpowiedzi na IFN α , niezależnie od czynnika STAT1. Analizy porównawcze transkryptomu wykazały, że 75% genów wspólnych pomiędzy liniami 2fTGH, ST2-U3C i NB4, w komórkach NB4 prezentowało przedłużony profil ekspresji w odpowiedzi na indukcję IFN α podobnie jak w komórkach ST2-U3C, co może sugerować podobny mechanizm aktywacji tych genów w obu typach komórek. Jednakże całogenomowa analiza wiązania czynników STAT1 i STAT2 po stymulacji IFN α wskazała na bardziej złożony mechanizm aktywacji genów wspólnych w komórkach NB4. Wczesna faza odpowiedzi interferonowej okazała się być zależna od czynników STAT1 i STAT2, które najprawdopodobniej wraz z czynnikiem IRF9 wiążą się jako kompleks ISGF3 do sekwencji promotorowych posiadających domenę ISRE. Natomiast, przedłużona w czasie odpowiedź transkrypcyjna wydaje się być zależna od czynnika STAT2, ale niezależna od STAT1. W komórkach NB4, kompleks STAT2/IRF9 może odgrywać rolę komplementarną/pomocniczą w późniejszej fazie odpowiedzi na stymulację interferonem typu I. Identyfikacja dwóch dodatkowych grup genów o przejściowym i dwufazowym profilu ekspresji sugeruje bardziej złożony mechanizm sygnalizacji w komórkach NB4, gdzie oprócz ISGF3 dodatkowe kompleksy odgrywają rolę w indukcji transkrypcji.

Podsumowując, nasze badania wskazują, że regulacja transkrypcji indukowana IFN α wydaje się w dużej mierze zależna od typu komórek. Dostateczna ilość składników kompleksu ISGF3 występujących w komórkach, jak również profil fosforylacji=aktywacji czynników STAT, dyktuje naturę i czas trwania odpowiedzi na IFN α . Co ważniejsze, gromadzone są dowody sugerujące, że udział kompleksów ISGF3 i/lub STAT2/IRF9 w ogólnej odpowiedzi na

IFN α zależy od modulacji aktywności czynnika STAT1. Nasze badania rzucają światło na wielorakie efekty działania IFN w różnych typach komórek i poprawią rozumienie funkcjonowania alternatywnych szlaków, mediowanych interferonem typu I, który generuje odpowiedź antywirusową podczas nieobecności białka STAT1. Ten szlak może mieć duże znaczenie w zwalczaniu wirusów, które blokują aktywność STAT1 i tworzenie się kompleksu ISGF3. Zrozumienie tego procesu może przyczynić się do odkrycia nowych terapii interferonowych, efektywniejszego sposobu leczenia przewlekłych infekcji, a nawet do zapobiegania ich rozwojowi.