

Streszczenie w języku polskim

Schorzenia układu sercowo-naczyniowego, w tym miażdżycy naczyń krwionośnych, stanowią główną przyczynę śmiertelności na świecie. Obecnie jako kluczowy czynnik etiologiczny miażdżycy wymienia się chroniczną aktywację odpowiedzi immunologicznej w obrębie naczyń krwionośnych. W reakcji na szereg czynników środowiskowych, dochodzi do uszkodzenia warstwy śródbłonka naczyń i nadmiernej ekspresji czynników prozapalnych takich jak chemokiny, cytokiny i cząsteczki adhezyjne, zarówno przez komórki budujące ścianę naczyń (komórki mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych), jak i komórki układu odpornościowego (makrofagi i komórki dendrytyczne), infiltrujące naczynia krwionośne. Wraz z akumulacją cząsteczek lipidowych, prowadzi to do powstania płytki miażdżycowej, zmniejszenia światła naczyń krwionośnych, a w konsekwencji ograniczonej dystrybucji tlenu i substancji odżywczych niesionych wraz z krwią do wszystkich organów ciała.

Istotną rolę w mediacji odpowiedzi zapalnej naczyń krwionośnych odgrywa integracja sygnałowa (SI) pomiędzy szlakami przekazywania sygnału aktywowanymi przez interferon gamma ($IFN\gamma$), alfa ($IFN\alpha$) oraz czynniki wpływające na receptor Toll-podobny 4 (TLR4), jak lipopolisacharyd (LPS). Odpowiednio, szlaki JAK-STAT oraz TLR4 współdziałają ze sobą poprzez aktywację białek STAT1 oraz $NF\kappa B$. Jak wykazały wcześniejsze badania, SI mediowana przez powyższe czynniki transkrypcyjne stanowi mechanizm indukujący silną i intensywną odpowiedź komórek układu immunologicznego.

Dane przedstawione w rozdziale drugim niniejszej pracy dowodzą, że podobna integracja sygnałowa zarówno pomiędzy $IFN\gamma$ -, jak i $IFN\alpha$ -zależnym szlakiem JAK-STAT oraz LPS-zależnym szlakiem TLR4, mediuje synergiczną ekspresję genów prozapalnych za pośrednictwem kompleksów transkrypcyjnych STAT1 i $NF\kappa B$, także w komórkach mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych. Całogenomowa analiza transkryptomu (RNA-seq) połączona z immunoprecypitacją chromatyny (ChIP-seq) w pierwotnych komórkach immunologicznych (makrofagach i komórkach dendrytycznych) oraz komórkach mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych traktowanych $IFN\alpha$, $IFN\gamma$ oraz LPS, pozwoliła na odkrycie nowego mechanizmu SI. Udowodniono, że kompleksy transkrypcyjne GAF, ISGF3 oraz STAT1-IRF9 współdziałają z kompleksami $NF\kappa B$, wiążąc się do miejsc kompozytowych GAS/ISRE oraz $NF\kappa B$ znajdujących się w bliskiej odległości w łańcuchu DNA, dzięki STAT1-zależnej otwartej konformacji chromatyny.

W rozdziale trzecim podano natomiast argumenty na istnienie SI pomiędzy szlakami JAK-STAT i TLR4 w kontekście obniżonej ekspresji genów prozapalnych. Potwierdzono wiązanie IFN γ +LPS-zależnych czynników transkrypcyjnych STAT1 oraz NF κ B w regionach regulatorowych genów o obniżonej ekspresji oraz wykazano zależność ekspresji od czynnika STAT1 w komórkach mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych pozbawionych STAT1 (STAT1 KO). Zaproponowano także potencjalny mechanizm leżący u podstaw powyższych obserwacji, w którym czynniki transkrypcyjne STAT1 oraz NF κ B pośredniczą w negatywnym znakowaniu histonów oraz wiązaniu korepresorów transkrypcji lub usuwaniu jej koaktywatorów.

Rozdział czwarty zawiera serię eksperymentów, które potwierdziły rolę czynnika STAT1 w IFN γ -zależnej ekspresji genów, specyficznej dla komórek śródbłonna naczyń krwionośnych. Wcześniej dowiedziono, że komórkowo specyficzna regulacja transkrypcji w komórkach układu immunologicznego, takich jak makrofagi, mediowana jest poprzez hierarchiczne współdziałanie Komórkowo-specyficznych czynników transkrypcyjnych (np. PU.1), charakteryzujących się zdolnością do działania w kontekście zamkniętej chromatyny oraz indukowanych sygnałem, Sygnałowo-specyficznych czynników transkrypcyjnych (takich jak aktywowany IFN γ STAT1). W niniejszym rozdziale potwierdzono, że podobny mechanizm, oparty na działaniu analogicznego komórkowo-specyficznego czynnika może być funkcjonalny w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych i regulować dostępność chromatyny dla IFN γ -zależnego białka STAT1 w komórkowo-specyficznych regionach genomowych.

W rozdziale piątym wyniki przedstawionych badań zostały podsumowane oraz przeanalizowane pod kątem potencjalnych możliwości ich aplikacji w diagnostyce oraz terapii chorób układu sercowo-naczyniowego.

Summary in english

Cardiovascular diseases, including atherosclerosis, are the leading cause of mortality world-wide. Nowadays, chronic activation of immunological response in the vessels is considered as the main etiological factor of atherosclerosis. Exposition to the numerous external cues, leads to the endothelium damage and excessive expression of pro-inflammatory stimuli, including chemokines, cytokines and adhesion molecules by vascular cells (vascular smooth muscle cells), as well as immune cells (macrophages and dendritic cells), infiltrating inflamed vessels. Lipid particles accumulation, leads to atherosclerotic plaque build-up, narrowing of the vessel lumen, and limited distribution of an oxygen and nutrients carried with the blood to all organs in the body.

Signal Integration (SI) between molecular pathways activated by interferon gamma ($IFN\gamma$), alpha ($IFN\alpha$) and Toll-like receptor 4 (TLR4)-inducers, like lipopolisaccharide (LPS), plays crucial role in mediating vascular pro-inflammatory response. JAK-STAT and TLR4 signaling pathways collaborate through STAT1 and $NF\kappa B$ transcription factors. As shown previously, STAT1- and $NF\kappa B$ -dependent SI serves the mechanism inducing robust pro-inflammatory response of immune cells.

Data presented in chapter two of this thesis prove, that a similar SI between $IFN\gamma$ -, but also $IFN\alpha$ -dependent JAK-STAT pathway and LPS-dependent TLR4 pathway, mediates synergistic expression of pro-inflammatory genes, through STAT1- and $NF\kappa B$ -containing transcriptional complexes also in vascular smooth muscle cells. Genome-wide transcriptome analysis (RNA-seq) combined with chromatin immunoprecipitation (ChIP-seq) in primary immune cells (macrophages and dendritic cells) and vascular smooth muscle cells, treated with $IFN\alpha$, $IFN\gamma$ and LPS let to identify a new mechanism of SI. It was shown that transcriptional complexes GAF, ISGF3 and STAT1-IRF9 collaborate with $NF\kappa B$, binding to GAS/ISRE and $NF\kappa B$ composite sites, closely spaced on DNA, in the regions of an open chromatin in STAT1-dependent way.

In chapter three, there was provided evidence for the existence of SI between JAK-STAT and TLR4 pathways in the context of pro-inflammatory gene down-regulation. Binding of $IFN\gamma$ +LPS-dependent STAT1 and $NF\kappa B$ in the regulatory regions of repressed genes and STAT1-dependence of gene expression in STAT1 KO vascular smooth muscle cells, was proven. Moreover, it was proposed a potential mechanism underlying abovementioned

observations, where STAT1 and NF κ B mediate the negative histone mark deposition and recruitment of transcriptional co-repressors or removal of co-activators.

In chapter four, there were presented experiments, which confirmed a role of STAT1 in IFN γ -dependent vascular smooth muscle cell-specific gene expression. Previously it was reported, that cell type-specific gene expression in immune cells, like macrophages, is mediated through hierarchical collaboration of Lineage-determining transcription factors (f.ex. PU.1) characterized by an ability to act in the context of closed chromatin and Signal-dependent transcription factors (like IFN γ -dependent STAT1). In this chapter it was proved that a similar mechanism, based on collaboration of an analogical cell type-specific factor could be functional in vascular smooth muscle cells and regulate chromatin accessibility for IFN γ -dependent STAT1 in cell type-specific genomic regions.

In chapter five, presented results were summarized and analyzed in the context of their potential application in the development of diagnostics and therapies against cardiovascular diseases.