Mgr Elżbieta Boratyn

Pracownia Genetyki Molekularnej i Wirusologii

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński

Promotor: prof. dr hab. Hanna Rokita

Promotor pomocniczy: dr Irena Horwacik

Rola białka indukowanego przez monocytarne białko chemotaktyczne (MCPIP1) w ludzkich komórkach neuroblastoma

Mimo wielu lat badań nad chorobami nowotworowymi są one ciągle jednym z głównych problemów współczesnej cywilizacji. Co ciekawe często odkrycie zmian, ale i podobieństw między stanem choroby a homeostazą organizmu jest kluczem do opracowania nowych terapii antynowotworowych. Przewlekły stan zapalny stanowi zagrożenie dla ustroju, przyczyniając się m.in. do rozwoju nowotworów, dlatego niezwykle istotna jest jego ścisła kontrola, za którą odpowiadają regulatory stanu zapalnego, będące obecnie w centrum zainteresowania wielu naukowców.

Białko MCPIP1 (ang. *monocyte chemoattractant protein-1-induced protein 1*), kodowane przez gen *ZC3H12A* (ang. *zinc finger CCCH-type containing12A*), charakteryzuje się wielodomenową budową, zapewniającą jego plejotropowe działanie. Aktywność rybonukleazowa i działanie w kompleksie deubikwitynazowym to najlepiej opisane molekularne funkcje wspomnianego białka. Natomiast główną fizjologiczną funkcją MCPIP1 jest negatywna regulacja stanu zapalnego. Ponadto w literaturze można znaleźć doniesienia świadczące o jego działaniu antywirusowym, wpływie na apoptozę, angiogenezę, adipogenezę czy różnicowanie. Ze względu na znaczenie przewlekłego stanu zapalnego w powstawaniu nowotworów, prowadzone są badania nad wpływem MCPIP1 na nowotwory piersi, jasnokomórkowego raka nerki oraz neuroblastoma.

Neuroblastoma (NB) to embrionalny, pozaczaszkowy guz lity współczulnego układu nerwowego, pojawiający się u dzieci. Charakteryzuje się on zróżnicowaną biologią i przebiegiem klinicznym. Ze względu na niejednoznaczność wczesnych objawów, choroba jest często rozpoznawana w zaawansowanym stadium. Obok wieku chorego oraz stanu zaawansowania choroby, jednym z ważniejszych kryteriów przydzielania pacjentów do grupy wysokiego ryzyka jest amplifikacja onkogenu *MYCN*. Mimo intensywnej terapii, postęp w leczeniu pacjentów z agresywnym nowotworem jest niewielki. Z tego względu usilnie poszukuje się nowych celów terapii neuroblastoma, również na poziomie molekularnym.

Nasze wcześniejsze badania wykazały obniżoną ekspresję genu *ZC3H12A* w kilku ludzkich liniach neuroblastoma oraz brak jego ekspresji w guzach pierwotnych pobranych od pacjentów. Ponadto stwierdziliśmy odwrotną korelację pomiędzy stopniem amplifikacji onkogenu *MYCN* i endogenną ekspresją genu *ZC3H12A* w komórkach NB. Co więcej niski poziom MCPIP1 może być kluczowy dla przeżycia nowotworu, ponieważ wymuszenie nadprodukcji MCPIP1 w ludzkiej linii nerwiaka zarodkowego BE(2)-C powoduje spadek żywotności i tempa proliferacji badanych komórek. W związku z powyższym poszerzenie wiedzy na temat roli białka MCPIP1 w ludzkich komórkach

neuroblastoma stanowiło ciekawe zagadnienie, które stało się celem mojej rozprawy doktorskiej. By osiągnąć założony cel, zrealizowano dwa szczegółowe zadania.

Pierwsze zadanie polegało na zbadaniu zmian profilu ekspresji genów i mikroRNA w komórkach z wymuszoną nadprodukcją MCPIP1 przy pomocy wysokoprzepustowych metod analitycznych. Po wykonaniu analizy mikromacierzowej na materiale z komórek neuroblastoma z wymuszoną nadprodukcją MCPIP1, naszą uwagę zwróciło kilka grup genów, których ekspresja związana jest z różnymi procesami niezbędnymi w rozwoju nowotworu. Do wspomnianych grup należą geny, których transkrypty zaangażowane są w metabolizm DNA i RNA, replikację DNA, adhezję komórek, unaczynienie guza i transport cząsteczek odżywczych jak cholina, monoaminy i aminokwasy. Następnie przy pomocy technik qPCR i western blot zweryfikowano zmiany ekspresji genów występujące w badanym układzie doświadczalnym. Ze względu na znaczenie choliny dla budowy błon i metabolizmu komórki, dla transportera tego związku wykonano dodatkowo test funkcjonalny pobierania przez komórki choliny znakowanej trytem, który potwierdził otrzymane wcześniej wyniki. Nadprodukcja MCPIP1 w badanym układzie ma również wpływ na integralność mikroRNA. Spadek ekspresji niedawno odkrytego i jeszcze słabo scharakteryzowanego mikroRNA-3613-3p wskazuje na potencjalne pośrednie zaangażowane MCPIP1 w ważne procesy biologiczne i ścieżki sygnałowania komórkowego, związane z apoptozą i metabolizmem RNA. Wpływ MCPIP1 na zmiany ekspresji tak szerokiego spektrum genów, może świadczyć o jego oddziaływaniu na metabolizm i obniżenie szybkości proliferacji nowotworu.

Drugie zadanie miało na celu określenie wpływu nadprodukcji MCPIP1 na kluczowy dla neuroblastoma onkogen *MYCN*. Przy pomocy technik qPCR i western blot potwierdzono, że nadprodukcja MCPIP1 w dwóch agresywnych ludzkich liniach neuroblastoma BE(2)-C i KELLY, przyczynia się do obniżenia ekspresji *MYCN* na poziomie transkryptu i białka. Ponadto w badanym układzie dochodzi do zwiększenia fosforylacji destabilizującej MYCN, prawdopodobnie przez obniżenie produkcji i fosforylacji bezpośrednich partnerów tego białka, którymi są kinazy GSK3β, CDC2 i Aurora A. Co więcej przy pomocy dodatkowych analiz z wykorzystaniem techniki western blot wykazano, że nadprodukcja MCPIP1 w komórkach NB powoduje też zahamowanie przekazu sygnału przez ścieżkę Akt/mTOR, która moduluje stabilność MYCN. Na podstawie przeprowadzonych badań i opisanego wcześniej w literaturze mechanizmu degradacji MYCN, został zaproponowany schemat destabilizacji MYCN w komórkach neuroblastoma z nadprodukcją MCPIP1. Ponadto, ze względu na zahamowanie ścieżki sygnałowania Akt/mTOR, zbadano również aktywację procesów apoptozy i różnicowania. Wyniki otrzymane po analizie mikromacierzy białkowych wykluczają proapoptotyczne działanie MCPIP1 w komórkach linii BE(2)-C po czterech dniach od wywołania nadprodukcji MCPIP1. Nie stwierdzono również jednoznacznie zainicjowania procesu różnicowania, mimo spadku ekspresji *ID1* na poziomie transkryptu i białka. Wynik ten jest zgodny z danymi literaturowymi świadczącymi, że mRNA dla genu *ID1* jest bezpośrednim celem białka MCPIP1.

Podsumowując, w oparciu o przeprowadzone badania można przypuszczać, że białko MCPIP1 pełni funkcję supresora nowotworu w neuroblastoma. Co więcej uzyskane dane niepublikowane wskazują nowe perspektywy badań. Po pierwsze, postulujemy, że ekspresja mikroRNA-3613-3p może być regulowana przez MCPIP1 na drodze cięcia prekursorowej formy tego mikroRNA. Po drugie, MCPIP1 może mieć wpływ na zahamowanie przejścia między fazami cyklu komórkowego, a w konsekwencji na zatrzymanie tego procesu w komórkach nerwiaka zarodkowego z nadprodukcją MCPIP1.

2 [illegible] PAŹ. 2017 Bogatyn Elżbieta