

Iwona Nowak,
Pracownia Genetyki Molekularnej i Wirusologii,
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński

Promotor: Prof. dr hab. Hanna Rokita

Rozprawa doktorska pod tytułem:

„Mechanizmy supresyjnej aktywności białka MCPIP1 w komórkach nowotworowych pochodzenia neuroektoderlanego”

Streszczenie

Białko MCPIP1 jest rybonukleazą biorącą udział w wyciszaniu odpowiedzi immunologicznej. Katalizuje ono degradację specyficznych substratów, wśród których można znaleźć mRNA, pre-miRNA oraz wirusowy RNA. Ostatnie lata przyniosły doniesienia sugerujące supresyjną rolę MCPIP1 w komórkach nowotworowych. Prace grupy badaczy z Pracowni Genetyki Molekularnej i Wirusologii, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego pozwoliły na scharakteryzowanie komórek neuroblastoma z wywołaną sztucznie nadprodukcją MCPIP1. Podwyższony poziom rybonukleazy powodował znaczące spowolnienie proliferacji komórek neuroblastoma, a także zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G1/S. Ponadto, wykazano szereg zmian w ekspresji licznych onkogenów oraz genów supresorowych w liniach komórkowych neuroblastoma BE(2)-C oraz KELLY pod wpływem nadprodukcji MCPIP1. Co więcej, opisano zależną od MCPIP1 zmianę profilu ekspresji miRNA w linii komórkowej BE(2)-C.

Przedstawiana rozprawa doktorska nakierowana jest na wyjaśnienie niektórych aspektów supresyjnej aktywności MCPIP1 w komórkach nowotworowych pochodzenia neuroektodermalnego. W tym celu nakreślono trzy szczegółowe zadania badawcze: i) wyjaśnienie roli negatywnie regulowanego przez MCPIP1 miRNA-3613-3p w komórkach neuroblastoma linii BE(2)-C; ii) identyfikację substratów MCPIP1 w komórkach neuroblastoma; iii) analizę działania rybonukleazy w komórkach innego nowotworu pochodzenia neuroektodermalnego, czerniaka.

W wyniku zastosowania mikromacierzy miRNA najbardziej istotną z zaobserwowanych różnic było zależne od aktywności rybonukleazowej MCPIP1 obniżenie ekspresji miRNA-3613-3p. Biologiczna funkcja tej cząsteczki miRNA została słabo scharakteryzowana, a jej aktywność w komórkach neuroblastoma nie była dotychczas badana.

Eksperymenty przeprowadzone na potrzeby niniejszej rozprawy doktorskiej wykazały znaczące obniżenie ekspresji kilku genów wykazujących supresorowy potencjał w komórkach neuroblastoma z nadekspresją miRNA-3613-3p. Najbardziej istotnie zmniejszonym transkryptem w komórkach z nadekspresją miRNA-3613-3p był pro-apoptotyczny *APAF1*. Jednakże wykorzystanie genu reporterowego nie wykazało bezpośredniej interakcji między mRNA *APAF1* a miRNA-3613-3p. Ponadto, w komórkach BE(2)-C z nadekspresją miRNA-3613-3p zaobserwowano obniżony poziom aktywowanej proteolitycznie kaspazy 9 a także brak aktywacji kaspaz wykonawczych. Możliwość hamowania apoptozy przez miRNA-3613-3p wskazuje na jego onkogenny potencjał w komórkach neuroblastoma.

Rozwikłanie mechanizmów działania rybonukleazy w komórkach wiąże się z charakterystyką jej substratowych RNA. Wykorzystanie immunoprecypitacji RNA oraz plazmidów reporterowych pozwoliło na identyfikację transkryptu *AURKA* jako bezpośredniego celu rybonukleazy. Ponadto, pokazano, że MCPIP1 wiąże sekwencję znajdującą się w obrębie konserwatywnego fragmentu 3'UTR transkryptu. mRNA *AURKA* koduje kinazę Aurora A, której działanie promujące proces nowotworzenia zostało szeroko opisane. W związku z tym degradacja transkryptu *AURKA* przez MCPIP1 może przyczyniać się do hamowania rozwoju wielu typów nowotworów.

Neuroblastoma należy do nowotworów pochodzenia neuroektodermalnego, które dzielą wiele cech biologicznych oraz klinicznych. Celem wstępnego wskazania uniwersalnego działania MCPIP1 w komórkach nowotworów neuroektodermalnych przeanalizowano ogólnodostępne dane pod kątem poziomu transkryptu *MCPIP1* w guzach czerniaka. Komórki złośliwych guzów czerniaka charakteryzowały się brakiem ekspresji *MCPIP1*, co może wskazywać na supresyjny charakter MCPIP1 w komórkach tego nowotworu. Ponadto, badania nad komórkami czerniaka linii MV3 wskazują na zahamowanie cyklu komórkowego oraz szlaku sygnałowego Akt/mTOR pod wpływem nadprodukcji MCPIP1. Ponieważ podobne obserwacje poczyniono wcześniej dla komórek neuroblastoma z nadprodukcją MCPIP1 można postulować uniwersalną aktywność rybonukleazy w nowotworach neuroektodermalnych

Podsumowując, poczynione obserwacje pozwalają na rozwikłanie niektórych aspektów mechanizmu działania MCPIP1 w komórkach nowotworowych pochodzenia neuroektodermalnego. Ponadto, uzyskane wyniki nie tylko istotnie poszerzają obecny stan wiedzy, ale także wskazują kierunki dalszych badań nad supresyjnym potencjałem tej rybonukleazy.

Słowa kluczowe: MCPIP1, miRNA-3613-3p, kinaza Aurora A, neuroblastoma, czerniak

Alan Robit

Nowak