

STRESZCZENIE

Stan zapalny to proces biologiczny uruchamiany przez organizm w odpowiedzi na szkodliwe bodźce, takie jak uszkodzenia tkanek, infekcje oraz obce substancje. Podstawowym jego celem jest wyeliminowanie przyczyny uszkodzenia komórek oraz inicjacja naprawy tkanek i procesów gojenia. Podczas gdy ostre zapalenie jest reakcją ochronną i korzystną, przewlekłe zapalenie może być szkodliwe. Długotrwałe zapalenie wiąże się z różnymi chorobami przewlekłymi, w tym chorobami autoimmunologicznymi, chorobami układu krążenia i chorobami neurodegeneracyjnymi. Utrzymujący się stan zapalny ośrodkowego układu nerwowego może przyczyniać się do rozwoju nowotworów mózgu, spośród których najczęstsze i najgroźniejsze są glejaki. Najbardziej agresywnym typem jest glejak wielopostaciowy, który jest wyjątkowo trudny w leczeniu, z prognozowanym czasem przeżycia pacjentów wynoszącym od kilku miesięcy do kilku lat od diagnozy. Charakteryzuje go utrzymujący się stan zapalny i immunosupresyjne środowisko promujące progresję nowotworu.

Do negatywnych regulatorów stanu zapalnego należą białka z rodziny ZC3H12/MCPIP nazywane również Regnazami. Wszystkie posiadają domenę palca cynkowego typu CCCH zaangażowaną w oddziaływanie z transkryptami oraz domenę NYN/PIN-podobną o aktywności RNazy. Dzięki obecności tych domen są w stanie degradować transkrypty różnych białek prozapalnych, czy też zaangażowanych w inne kluczowe procesy komórkowe, takie jak proliferacja i apoptoza. Najlepiej poznanym białkiem z tej rodziny jest ZC3H12A/MCPIP1/Regnaza-1 (Reg-1), ale należą do niej jeszcze trzy inne białka o podobnej budowie, i są to kolejno Regnaza-2 (Reg-2), Regnaza-3 (Reg-3) i Regnaza-4 (Reg-4).

Celem tej pracy było przybliżenie funkcji biologicznej Reg-2 oraz zbadanie jej roli w przebiegu stanu zapalnego mózgu oraz w patogenezie glejaka wielopostaciowego. Do realizacji badań posługiwano się systemem Tet-On opartym o transpozon *Sleeping Beauty*, które pozwala na uzyskanie linii komórkowych z indukowalną syntezą Reg-2, co umożliwia analizę funkcji i regulacji aktywności tego białka. Optymalizacja SB została opisana w pracy opublikowanej w czasopiśmie *Acta Biochimica Polonica*, która stanowi pierwszą część rozprawy.

W kolejnej części pracy doktorskiej, na którą składają się wyniki opublikowane w *FASEB Journal*, przeprowadzono badanie ekspresji genu kodującego *Reg-2* i potwierdzono jej wysoki poziom w mysim mózgu. Poziom transkryptu *Reg-2* ulega obniżeniu w warunkach sterylnego zapalenia ośrodkowego układu nerwowego oraz w mysich komórkach mikrogleju

stymulowanych LPS. Jednocześnie w obu układach obserwowany jest wzrost ilości transkryptu *Reg-1*. Podobną zależność zaobserwowano w próbkach glejaków pobranych od pacjentów. W guzach o najwyższym stopniu złośliwości dochodzi do obniżenia poziomu mRNA *Reg-2* oraz indukcji *Reg-1*, co koreluje z gorszą przeżywalnością pacjentów. Ponadto podwyższony jest poziom transkryptów dla interleukiny-6 (IL-6) oraz tristetraproliny (TTP). Wyniki uzyskane przy użyciu linii komórkowych spontanicznego mysiego glejaka oraz ludzkiego glejaka wielopostaciowego potwierdzają, że nadekspresji *Reg-2* towarzyszy obniżenie poziomu transkryptu *Reg-1* w sposób zależny od domeny NYN/PIN-podobnej *Reg-2*. Wykorzystując pierwotne ludzkie astrocyty wykazano również, że *Reg-2* jest zaangażowana w regulację stanu zapalnego oraz utrzymanie homeostazy poprzez wpływ na poziom transkryptów kodujących mediatory stanu zapalnego, takie jak cytokiny prozapalne (IL-6 i IL-1 β) oraz *Reg-1*. Ilość *Reg-2* jest precyzyjnie kontrolowana na poziomie stabilności transkryptu oraz na poziomie potranslacyjnym. *Reg-1* oraz TTP poprzez oddziaływanie z regionem 3'UTR *Reg-2* prowadzą do destabilizacji jej mRNA. Pod wpływem działania IL-1 β dochodzi z kolei do fosforylacji, ubikwitynacji i degradacji *Reg-2* w proteasomie, prawdopodobnie poprzez aktywację ścieżki sygnałowej zależnej od kompleksu IKK. Pokazano również zależny od aktywności RNazy hamujący wpływ *Reg-2* na proliferację komórek ludzkiej i mysiej linii glejaka (odpowiednio U251-MG i KMWT1), a mechanizm tej regulacji zgłębiono w kolejnej części rozprawy, którą zaprezentowano w formie manuskryptu przyjętego do publikacji w czasopiśmie *Scientific Reports*.

Wykorzystując linię ludzkiego glejaka wielopostaciowego U87-MG potwierdzono, że nadekspresja *Reg-2* prowadzi do zahamowania proliferacji i zatrzymania komórek w fazie G1 cyklu komórkowego. Przeprowadzone sekwencjonowanie RNA wykazało istnienie szeregu transkryptów regulowanych przez *Reg-2*, zaangażowanych w proliferację i cykl komórkowy. Wykorzystując metodę PCR w czasie rzeczywistym oraz immunoprecypitację RNA potwierdzono, że *Reg-2* bezpośrednio wiąże i reguluje poziom transkryptów kodujących cykliny D1, E1, E2, B1, B2, A2 oraz kinazy PLK1 i AURKA. Większość z tych substratów jest kontrolowana przez *Reg-2* w sposób NYN/PIN-zależny. Obserwowane zmiany w poziomie transkryptów badanych kinaz przekładają się również na zmiany w poziomie kodowanych przez nie białek. Analiza przeprowadzona z wykorzystaniem bazy Oncopression wykazała, że wszystkie z nowo zidentyfikowanych substratów *Reg-2* ulegają indukcji w glejakach, co częściowo udało się potwierdzić w próbkach klinicznych od pacjentów z nowotworami o różnym stopniu złośliwości.