

Streszczenie

Wstęp: Analiza całego genomu pozwoliła na identyfikację nowej klasy niekodujących RNA, długich niekodujących RNA (lncRNAs) – dłuższych niż 200 pz, które odgrywają ważną rolę w wielu procesach biologicznych. Zaburzenia w ich ekspresji mogą prowadzić do wielu stanów chorobowych w tym do nowotworzenia. Pojawiają się doniesienia dotyczące długich niekodujących RNA jako potencjalnych biomarkerów do diagnozowania i prognozowania klinicznego w chorobach nowotworowych. Spowodowane to może być tym, że lncRNA regulują poziom określonych białek zaangażowanych w procesy nowotworzenia w sposób bezpośredni lub pośredni (poprzez hamowanie/aktywowanie białka biorącego udział w szlaku sygnalizacyjnym np. β -kateniny) – przyczyną tego może być fakt, że występują one

zarówno w jądrze komórkowym jak i w cytoplazmie. Dodatkowo, lncRNA są tkankowo specyficzne, co więcej ich ekspresja może być regulowana przez komórkę zależnie od jej stanu.

Rak płuca jest najczęstszą przyczyną zgonów związanych z rakiem na całym świecie i dotyczy około 25% wszystkich zachorowań na raka na całym świecie. Ponadto wśród chorych na raka płuca 80% przypadków jest sklasyfikowanych jako niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP), a 20% jako drobnokomórkowy rak płuca (SCLC).

Zrozumienie procesów regulowanych przez długie niekodujące RNA jest kluczowe nie tylko z poznawczego punktu widzenia, ale także dla opracowania nowych biomarkerów i skutecznych celów terapeutycznych u pacjentów chorujących na raka.

Celem projektu była ocena ekspresji lncCDH5-3:3 i lncCXCR4-6:1 w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca i określenie ich wpływu na inwazyjność komórek nowotworowych.

Materiały i metody: Materiałem biologicznym wykorzystanym w badaniu były guzy nowotworowe pobrane od 20 pacjentów, z których wyizolowano RNA. Następnie, wykonano ocenę ekspresji lncCDH5-3:3 i lncCXCR4-6:1 i skorelowano ją ze stopniem zaawansowania choroby (TNM) oraz typem histopatologicznym.

Następnie, wykonano analizy *in-silico* mające na celu określenie stabilności badanych lncRNA, oraz w przypadku lncCXCR4-6:1 prawdopodobne miejsce wiązania białek. W kolejnym etapie wykonano knockout przy użyciu plazmidu px459V2.0 i zaprojektowanych gRNA oraz nadekspresję badanych lncRNA używając plazmidu pcDNA3.1. Dodatkowo, wykonano delecje w sekwencji lncCXCR4-6:1 o długości 440pz, 493pz i 540pz. Metody inżynierii genetycznej wykorzystano w liniach komórkowych raka płuca: H1703 (rak płaskonabłonkowy), H1975 i A549 (linie komórkowe gruczolakoraka płuca).

W niniejszym eksperymencie badano poziom mRNA: EpCAM, E-cadherin, Oct-4 (POU5F1) i CXCR-4 w komórkach po KO lncCDH5-3:3 oraz u pacjentów z NDRP. W dalszej kolejności oszacowano odsetek komórek proliferujących i apoptotycznych oraz określono odsetek komórek w fazie SubG1 (jedynie dla badań związanych z lncCDH5-3:3), G0/G1, S i G2/M. Testy te wykonano w komórkach z KO i nadekspresją lncCDH5-3:3 i lncCXCR4-6:1. Ponadto, testy te wykonywano również po uzyskaniu delecji w obrębie sekwencji lncCXCR4-6:1. Dodatkowo, aby potwierdzić wpływ lncCDH5-3:3 na proces apoptozy określono odsetek komórek żywych, apoptotycznych i martwych na podstawie aktywności kaspaz pro-apoptotycznych 3 i 7. Z kolei, w przypadku lncCXCR4-6:1 określono aktywność szlaku EGFR/ERK1/2 a także poziom czynnika transkrypcyjnego Nf- κ B oraz jego aktywność.

Następnym etapem było określenie poziomu: EpCAM, E-cadherin, EV-kadheryny

(w przypadku lncCDH5-3:3) CXCR-4 (w przypadku lncCXCR4-6:1), Oct-4 (POU5F1), fosforylowanej β -catenin, całkowitej ilości Akt i fosforylowanego Akt, całkowitej ilości ERK 1/2 i fosforylowanych ERK 1/2 w czasie nadekspresji omawianych lncRNA a także po ich KO oraz wykonaniu delecji w obrębie lncCXCR4-6:1. Dodatkowo, aby określić zdolności inwazyjne komórek nowotworowych po KO lub nadekspresji lncCXCR4-6:1 wykonano *scratch test* i monitorowano komórki do pełnego zarośnięcia rysy.

Wnioski: Wyniki przedstawione w niniejszej pracy dowodzą, że:

1. lncCDH5-3:3 reguluje apoptozę poprzez uruchomienie kaspaz pro-apoptotycznych 3 i 7,
2. lncCDH5-3:3 reguluje proliferację poprzez zwiększenie ekspresji EpCAM, Oct-4 i Nanog oraz aktywności Akt, ERK1/2,
3. lncCDH5-3:3 reguluje zdolności inwazyjne komórek nowotworowych poprzez aktywację ekspresji E-kadheryny i EV-kadheryny,
4. komórka nowotworowa ściśle kontroluje ekspresję lncCDH5-3:3, aktywując białka zaangażowane w proliferację lub migrację.
5. lncCXCR4-6:1 reguluje apoptozę oraz proliferację komórek nowotworowych poprzez regulację ekspresji czynników transkrypcyjnych Oct-4, Nanog, a także białek: Akt, ERK1/2, oraz CXCR-4 i fosforylację receptora dla EGF, Akt, ERK1/2 i β -kateniny,
6. lncCXCR4-6:1 reguluje szlaki sygnalizacyjne: EGFR/Akt/ERK, CXCR-4/Akt/NF- κ B oraz β -katenina/EpCAM/Oct-4/Nanog/E-kadheryna,
7. Delecja fragmentów w obrębie sekwencji pozwoliła udowodnić regulację ekspresji CXCR-4 przez lncCXCR4-6:1,
8. lncCXCR4-6:1 reguluje aktywność NF- κ B jedynie w komórkach raka płaskonabłonkowego,
9. Mutacja L858R w obrębie EGFR powoduje uruchomienie efektów kompensacyjnych mających na celu wzrost proliferacji oraz zatrzymanie apoptozy.