

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Tytuł: Udział mikroRNA w regulacji ekspresji symportera sodowo-jodowego NIS w raku brodawkowatym tarczycy.

mgr Marta Elżbieta Kotlarek

W Polsce diagnozuje się około 3000 nowych przypadków nowotworów tarczycy rocznie i liczba ta wciąż rośnie. Wśród nowotworów tarczycy wyróżniamy cztery główne typy: rak brodawkowaty, pęcherzykowy, rdzeniasty oraz anaplastyczny. Najczęściej występującym nowotworem złośliwym tarczycy jest rak brodawkowaty (PTC, ang. *Papillary Thyroid Carcinoma*), należący do raków zróżnicowanych, który stanowi około 85% wszystkich diagnozowanych przypadków. Nowotwory gruczołu tarczowego są najczęstszymi nowotworami gruczołów endokrynych.

Leczenie zróżnicowanych nowotworów tarczycy polega na chirurgicznej resekcji całego gruczołu i regionalnych węzłów chłonnych oraz zastosowaniu leczenia uzupełniającego przez podanie jodu promieniotwórczego (^{131}I). Celem leczenia jodem radioaktywnym jest zniszczenie pozostałych po operacji komórek nowotworowych. Leczenie ^{131}I jest możliwe dzięki unikalnej zdolności komórek gruczołu do pobierania jonów jodkowych z krwiobiegu do wnętrza pęcherzyków tarczycowych, wynikającej z aktywności specyficznych przenośników – między innymi symportera sodowo-jodowego NIS. Niestety, licznym przypadkom raka tarczycy towarzyszy znaczące obniżenie ekspresji genu *SLC5A5*, kodującego symporter sodowo-jodowy. Konsekwencją tego zaburzenia jest zmniejszona wydajność, a często zupełny brak poboru jodu radioaktywnego przez tkankę nowotworową. Obniżenie ekspresji genu kodującego NIS skutkuje upośledzeniem poboru jodu przez komórki tarczycy, zahamowaniem procesu syntezy hormonów tarczycy, w których jod jest niezbędnym składnikiem, oraz licznymi zmianami w fizjologii komórki. Zjawiska powodujące obniżenie poziomu NIS w raku tarczycy nie są dokładnie poznane. Podejmowane są próby przywrócenia właściwego poziomu symportera w tkance tarczycy, wśród nich np. stymulacja komórek rekombinowaną tyreotropiną, czy próby wprowadzenia funkcjonalnego genu za pomocą wirusowych i nie wirusowych transfekcji komórek.

Symporter sodowo-jodowy NIS jest kodowany przez gen *SLC5A5*, zlokalizowany na chromosomie 19. w pozycji 19p13 i zbudowany z 15 eksonów i 14 intronów. Gen *SLC5A5* ulega ekspresji w wielu tkankach, ale w tarczycy jego ekspresja jest największa.

Białkowy produkt genu należy do dużej rodziny białek odpowiadających za transport anionów (*SLC5*, ang. *Solute carrier family 5*). Mechanizmy prowadzące do obniżenia jego ekspresji w PTC nie są dobrze poznane, ale w nowotworach tarczycy obserwuje się deregulację licznych cząsteczek mikroRNA, co może leżeć u podłoża tego zjawiska.

MikroRNA są krótkimi ok. 22-nukleotydowymi niekodującymi cząsteczkami RNA, wpływającymi na regulację ekspresji genów poprzez wiązanie ze specyficznymi sekwencjami w regionie 3'UTR ich transkryptów. Każda dojrzała cząsteczka mikroRNA powstaje z jednego ramienia struktury spinki, i nazwana jest -3p albo -5p w zależności od tego, z którego ramienia spinki powstaje. Sekwencja odpowiadająca za wiązanie z 3'UTR genu docelowego nazywana jest regionem „seed”, będącym sekwencją siedmiu nukleotydów (od 2. do 8.) dojrzałej cząsteczki. Związanie mikroRNA w regionie 3'UTR transkryptu prowadzi do zahamowania dalszych etapów biosyntezy białka. W nowotworach dochodzi do znacznej nadekspresji wielu cząsteczek mikroRNA, co prowadzi do znacznego obniżenia poziomu docelowych transkryptów i białek. Deregulację poziomu mikroRNA opisano także w raku brodawkowatym tarczycy. Szczególną rodziną mikroRNA, której wpływ na rozwój PTC został potwierdzony w licznych badaniach, jest rodzina mikroRNA miR-146. MiR-146b-5p jest cząsteczką, która ulega najwyższej ekspresji w tkance PTC, zaś polimorfizm pojedynczego nukleotydu w sekwencji miR-146a-3p (SNP G>C, rs2910164) jest czynnikiem predysponującym do PTC. Ponadto, *locus* rs2910164 jest miejscem częstych mutacji somatycznych w tkance PTC. Fakt, że rs2910164 jest zlokalizowany w regionie odpowiedzialnym za wiązanie miR-146a-3p z docelowym mRNA powoduje, że powstające dojrzałe cząsteczki mikroRNA mają różne geny docelowe. Pacjenci, którzy posiadają heterozygotyczny wariant rs2910164 mają w komórkach 3 produkty genu dla mir-146a: miR-146a-5p, miR-146a-3p*C i miR-146a-3p*G.

Głównym celem niniejszej pracy była identyfikacja cząsteczek mikroRNA, które wiążą się z 3'UTR genu *SLC5A5* i odpowiadają za regulację jego ekspresji. Celem pracy było także wykazanie, że zmieniając poziom mikroRNA w komórce, można przywrócić prawidłową ekspresję i funkcję NIS oraz wpłynąć na fenotyp komórek nowotworowych.

Analiza PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzona na 47 parach tkanek pochodzących od pacjentów z PTC oraz kontroli od tego samego pacjenta wykazała 9-krotne obniżenie poziomu ekspresji genu *SLC5A5* w tkance nowotworowej ($p=8 \times 10^{-7}$). Dodatkowo, analiza danych klinicznych pacjentów wykazała ujemną korelację pomiędzy ekspresją *SLC5A5* a wielkością guza ($R=-0,32$; $p=0,026$). W kolejnych etapach podjęto zatem próbę

zidentyfikowania mechanizmów, które mogą prowadzić do obniżenia ekspresji symportera NIS w PTC.

Analiza *in silico* pozwoliła na identyfikację cząsteczek mikroRNA, które potencjalnie mogą wiązać oraz wpływać na regulację genu *SLC5A5*: miR-129-2-3p, miR-146a-5p, miR-146a-3p, miR-146b-5p, miR-146b-3p, miR-21-5p, miR-221-3p, miR-29b-3p oraz miR-339-5p. Bezpośrednie wiązanie pomiędzy zidentyfikowaną cząsteczką mikroRNA a *SLC5A5* było badane w systemie lucyferazowym, w którym obecność interakcji objawia się obniżeniem aktywności lucyferazy i spadkiem luminescencji. Znaczące obniżenie aktywności lucyferazy wykazano dla miR-146b-3p (34%, $p=0,03$), miR-146b-5p (25%, $p=0,006$), miR-146a-5p-3p*C (22%, $p=0,0001$), miR-146a-5p-3p*G (17%, $p=0,0004$), miR-339-5p (21%, $p=0,006$) oraz miR-129-2-3p (29%, $p=0,004$). Wyniki otrzymane dla miR-21-5p, miR-221-3p oraz miR-29b-3p wskazują, że te cząsteczki mikroRNA nie odpowiadają za bezpośrednią regulację ekspresji *SLC5A5* ponieważ nie wiążą się z 3'UTR tego genu.

Ponadto, poziom mRNA *SLC5A5* był zależny od genotypu rs2910164 w miR-146a-3p. W tkankach o genotypie GC, w których ekspresji ulegają wszystkie 3 cząsteczki polimorficznego mikroRNA (miR-146b-5p, miR-146a-5p-3p*C, miR-146a-5p-3p*G) poziom ekspresji *SLC5A5* jest obniżony 10,77-krotnie w stosunku do tkanek o genotypie GG ($p=0,001$).

Analiza PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzona w 47 parach tkanek PTC-tkanka kontrolna, w których uprzednio oznaczano poziom transkryptu *NIS*, wykazała 15,7-krotny wzrost ekspresji miR-146b-3p ($p=3,3 \times 10^{-8}$) oraz 15,6-krotny wzrost ekspresji miR-146b-5p ($p=2,1 \times 10^{-8}$). Dodatkowo, poziom ekspresji *NIS* wykazał ujemną korelację z poziomem obu cząsteczek mikroRNA: miR-146b-3p ($R=-0,40$; $p=0,01$) oraz miR-146-5p ($R=-0,47$; $p=0,002$). Różnica poziomu PTC/tkanka kontrolna dla miR-129-2-3p, miR-146a-5p oraz miR-339-5p nie była istotna statystycznie, jednakże z uwagi na udowodniony związek z PTC, miR-146a został włączony do dalszych badań.

Do badań funkcjonalnych wykorzystano komórki linii MCF7 indukowane kwasem retinowym i hydrokortyzonem (tRA/H). Jest to dobrze scharakteryzowany model, umożliwiający prowadzenie funkcjonalnych analiz białka *NIS*. Komórki poddawano transfekcji inhibitorami mikroRNA, będącymi cząsteczkami syntetycznymi, bądź wektorami plazmidowymi czyli tzw. *sponge*. Wzrost ekspresji mRNA genu *SLC5A5* uzyskano po wykorzystaniu inhibitorów mikroRNA: miR-146b-3p (1,76 krotny wzrost; $p=0,02$), miR-146b-5p (1,77 krotny wzrost; $p=0,0009$) oraz po równoczesnym zahamowaniu

miR-146b-3p i miR-146b-5p (miR-146b, 3 krotny wzrost; $p=0,0029$). Zastosowanie inhibitora, którego celem było usunięcie z komórki produktów polimorficznego genu miR-146a (miR-146a-5p-3p*C-3p*G) spowodowało 2,86 krotny wzrost poziomu NIS ($p=0,0001$). Wyniki uzyskane po zastosowaniu inhibitora dla miR-146a-5p nie były istotne statystycznie.

Po wykorzystaniu inhibitorów mikroRNA miR-146b oraz miR-146a-5p-3p*C-3p*G zaobserwowano także zwiększenie poboru jodu radioaktywnego przez komórki linii MCF7. Efektem zahamowania aktywności obu cząsteczek miR-146b był 1,22 krotny wzrost poboru jodu radioaktywnego ($p=0,03$), zaś zahamowanie wszystkich produktów polimorficznego miR-146a (miR-146a-5p-3p*C-3p*G) spowodowało 1,24 krotny wzrost poboru jodu ($p=0,006$). Dodatkowo, zastosowanie inhibitorów spowodowało zmniejszenie ruchliwości komórek 1,4 x (miR-146b-3p, $p=0,002$) i 1,3x (miR-146b-5p, $p=0,008$).

Wyniki niniejszej pracy wskazują, że mikroRNA z rodziny miR-146 oraz miR-129-2-3p i miR-339-5p uczestniczą w regulacji ekspresji genu *SLC5A5*, a inhibicja mikroRNA z rodziny miR-146 skutkuje przywróceniem prawidłowej ekspresji i funkcji symportera sodowo-jodowego NIS. W trakcie realizacji innego projektu wykazaliśmy, że mikroRNA miR-146 regulują także ekspresję receptora kwasu retinowego RAR β . Tym samym, zastosowanie specyficznych inhibitorów może skutkować równoczesną indukcją NIS i RAR β , zwiększając skuteczność terapii jodem radioaktywnym i kwasem retinowym. W przyszłości wyniki te mogą stanowić podstawę do terapii genowych w nowotworach opornych na leczenie jodem radioaktywnym.