

Słowa kluczowe: rak jajnika, lncRNA, mikrotubule, toksyny mikrotubularne, ekspresja *CRNDE*, mikropeptyd, CRNDEP, adhezja, migracja, inwazyjność, jąderka, centrosomy, cytoszkielet, NGS, chromatografia powinowactwa, spektrometria mas

Wstęp

Rak jajnika jest powodem największej liczby zgonów u kobiet ze zdiagnozowanymi nowotworami narządu rodowego. Niniejsza praca wpisuje się w nurt poszukiwań nowych markerów diagnostycznych, prognostycznych, a także pozwalających na określenie odpowiedzi raków jajnika na leczenie.

Gen *CRNDE* (ang. *Colorectal Neoplasia Differentially Expressed*) uznawany jest za onkogen ulegający ekspresji jako długie niekodujące RNA. Nasz zespół zidentyfikował dwa pierwsze, kompletne transkrypty genu *CRNDE* i umieścił ich sekwencje w bazie GenBank. Dowiedliśmy też, że podwyższona ekspresja obu opisanych przez nas transkryptów jest negatywnym czynnikiem prognostycznym u pacjentek z rakiem jajnika. Dodatkowo, z wykorzystaniem zaprojektowanego przeciwciała, wykryliśmy obecność mikropeptydu CRNDEP kodowanego przez krótką otwartą ramkę odczytu obecną w sekwencji jednego z wyżej wspomnianych transkryptów. Peptyd ten ulegał nadekspresji w komórkach o dużym potencjale proliferacyjnym zarówno w tkankach prawidłowych, jak i nowotworowych.

Cel pracy

Celem niniejszej pracy były dalsze badania roli transkryptów oraz mikropeptydu kodowanych przez gen *CRNDE* w procesie nowotworzenia. Zbadano, jak zróżnicowanie ekspresji produktów genu *CRNDE* wpływa na fizjologię i morfologię komórek nowotworowych. Oceniono też wpływ różnic w ekspresji CRNDE(P) na wrażliwość komórek raka jajnika na cytostatyki zaburzające metabolizm mikrotubul. Dodatkowo określono lokalizację komórkową mikropeptydu CRNDEP, a także podjęto próbę identyfikacji jego partnerów białkowych. Na koniec, w oparciu o przewidywania bioinformatyczne, oceniono zdolność wiązania RNA przez analizowany mikropeptyd.

Materiały i metody

Zrealizowanie badań opisanych w niniejszej pracy było możliwe dzięki stworzeniu linii komórkowych raka jajnika ze stabilnym wyciszeniem (linia SK-OV-3) genu *CRNDE* lub wymuszoną nadekspresją peptydu CRNDEP (linie SK-OV-3 i A2780), a także odpowiednich linii kontrolnych. Do ich wyprowadzenia wykorzystano między innymi system CRISPR/Cas9 do celowanej edycji genomów eukariotycznych, umożliwiający precyzyjne wbudowanie do genomu (w bezpieczne miejsce o nazwie AAVS1) odpowiednich kaset ekspresyjnych. Powstałe linie potomne, po potwierdzeniu zmian ekspresji *CRNDE* na poziomie RNA metodą ilościowego PCR, a także (w przypadku nadekspresji CRNDEP) techniką western blot na poziomie białka, zostały wykorzystane w badaniach komórkowych, mających na celu ocenę zmian tempa proliferacji, przebiegu cyklu komórkowego, parametrów morfologicznych komórek, a także parametrów związanych z ich adhezją do podłoża. Dodatkowo linie te zostały poddane działaniu substancji zaburzających metabolizm mikrotubul (paklitakselu, winblastyny, nokodazolu i noskapiny). Dla dwóch, niezależnie wyprowadzonych linii SK-OV-3 ze stabilnym wyciszeniem ekspresji CRNDE(P) oraz dwóch linii kontrolnych wykonano też analizę zmian w transkryptomie metodą sekwencjonowania następnej generacji (NGS), połączoną ze szczegółową analizą ontologii genów. Do identyfikacji partnerów białkowych

peptydu CRNDEP w linii HeLa wykorzystano chromatografię powinowactwa połączoną ze spektrometrią mas. Następnie wybrane interakcje potwierdzono techniką western blot oraz w badaniach kolokalizacji komórkowej pod mikroskopem konfokalnym. Linii komórkowej HeLa użyto też do oceny zmian lokalizacji mikropeptydu CRNDEP w różnych fazach cyklu komórkowego. Na koniec, w badaniach *in silico*, oszacowano prawdopodobieństwo, że peptyd CRNDEP może wiązać cząsteczki RNA.

Wyniki

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy pokazują, że wyciszenie ekspresji *CRNDE* w linii SK-OV-3 skutkuje obniżeniem potencjału proliferacyjnego i zahamowaniem progresji cyklu komórkowego w fazie S. Analizy transkryptomiczne wykonane dla tej samej linii potwierdzają powyższe obserwacje, dowodząc, że wyciszenie *CRNDE* może wpływać na poziom ekspresji genów związanych z regulacją cyklu komórkowego, a także z regulacją replikacji DNA. Ponadto, zgodnie z danymi literaturowymi, wykazano, że wyciszenie *CRNDE* zmienia ekspresję genów związanych z różnicowaniem komórek oraz z przejściem eipitelialno-mezenchymalnym, a także z aktywacją szlaków Wnt/ β -kateniny i PI3K/AKT/mTOR. Stwierdzono również, iż obniżenie poziomu *CRNDE* zaburza ekspresję genów kodujących białka cytoszkieletu aktynowego i mikrotubularnego, co potwierdzono także w badaniach mikroskopowych, dowodząc wpływu zmian ekspresji CRNDE(P) na kształt komórek. Wyciszenie ekspresji *CRNDE* spowodowało też zmniejszenie liczby i całkowitej powierzchni płytek przylegania (struktur warunkujących adhezję komórek do podłoża).

Ponadto wykazano, iż wymuszona nadekspresja CRNDEP w liniach SK-OV-3 i A2780 przyczyniła się do znaczącego wzrostu oporności komórek obu linii na działanie zarówno leków hamujących polimeryzację mikrotubul (nokodazol i noskapina), jak również zaburzających ich depolimeryzację (paklitaksel). Zwiększona oporność komórek raka jajnika na wymienione cytostatyki wynika najprawdopodobniej ze zwiększonej dynamiki przebudowy mikrotubul, którą zaobserwowano w linii SK-OV-3 z nadekspresją CRNDE(P). Co więcej, zaobserwowano synergistyczne działanie paklitakselu i noskapiny, skutkujące uwrażliwieniem komórek na oba leki pomimo nadekspresji CRNDE(P). Opisany mechanizm przełamывania oporności raków jajnika na chemioterapię mógłby mieć znaczenie kliniczne, prowadząc do poprawy skuteczności leczenia.

W badaniach mikroskopowych wykazano ponadto zmienność lokalizacji komórkowej peptydu CRNDEP w linii HeLa, który w zależności od fazy cyklu przemieszcza się pomiędzy jądrem, jąderkami a centrosomami, a w warunkach stresu migruje do granul stresu. Badania kolokalizacyjne wykonane w tej pracy potwierdziły interakcje CRNDEP z nukleoliną i fibrylaryną (markery jąderek) oraz z centryną (marker centrosomów). Z kolei, wykrycie białka p54 jako potencjalnego partnera CRNDEP wydaje się dowodzić zaangażowania tego mikropeptydu w metabolizm RNA, co zdają się potwierdzać wyniki analiz bioinformatycznych, sugerujące, że peptyd CRNDEP ma zdolność wiązania cząsteczek RNA.

Wnioski

Dzięki badaniom opisanym w niniejszej pracy uzyskano wiele oryginalnych wyników poszerzających aktualny stan wiedzy o fizjologicznej roli produktów ekspresji genu *CRNDE*, w tym o ich związku z procesem nowotworzenia. Szczególnie interesujące, w kontekście wcześniejszych badań naszego zespołu na materiale klinicznym, są wyniki pokazujące zależność pomiędzy wysoką ekspresją CRNDE(P) a wzrostem oporności komórek raka jajnika

na leczenie cytostatykami zaburzającymi dynamikę mikrotubul. Ponadto praca ta dostarcza nowych, istotnych informacji odnośnie stymulującego wpływu produktów ekspresji genu *CRNDE* na tempo proliferacji komórek, a także na aktywność cytoszkieletu mikrotubularnego oraz na zdolność formowania płytek przylegania. Omówione wyniki badań mogą przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów regulacyjnych, w które zaangażowane są produkty ekspresji genu *CRNDE*. Może to w przyszłości zaowocować stworzeniem mniej obciążających dla pacjentów i skuteczniejszych metod terapii molekularnej w przypadku nowotworów.