

„Badanie funkcjonalne genu *DIRC3* w zróżnicowanym raku tarczycy”

Wysocki, Piotr T.

STRESZCZENIE

Zróżnicowane raki tarczycy (ang. differentiated thyroid cancers, DTC) są nowotworami układu endokrynnego wykazującymi silne, lecz słabo poznane uwarunkowania genetyczne. Całogenomowe badania asocjacyjne wykazały obecność kilku miejsc w genomie związanych ze zwiększoną zachorowalnością na DTC. Względnie silne asocjacje wykazano dla wariantów germinalnych zlokalizowanych w *Disrupted in Renal Carcinoma 3 (DIRC3)*, słabo scharakteryzowanym genie, którego produktem jest długie niekodujące RNA (ang. long non-coding RNA). W niniejszej pracy doktorskiej po raz pierwszy na świecie zweryfikowałem rolę *DIRC3* w patogenezie raka tarczycy. Wykorzystując materiał pozyskany od pacjentów i dane bioinformatyczne wykazałem, że *DIRC3* ulega istotnemu wyciszeniu w DTC. Uzyskane dane wskazują także, że zmiany w ekspresji *DIRC3* w DTC mogą wpływać na ryzyko wznowy choroby. *DIRC3* wykazał silną ko-ekspresję z *insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5)*, pobliskim genem regulującym odpowiedź komórki na insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1). Używając zróżnicowanych technik badawczych *in vitro* pokazałem, że transkrypty *DIRC3* lokalizują się głównie w jądrach komórkowych, gdzie mogą regulować ekspresję *IGFBP5*. Wyciszenie *DIRC3* w liniach komórkowych raka tarczycy spowodowało dwojaki fenotyp: z jednej strony zwiększało zdolność komórek do migracji i inwazyjności, hamowało apoptozę wywołaną głodzeniem, ale z drugiej strony zmniejszało zdolność do redukcji MTT w badanych punktach czasowych (test pośrednio oceniającym wzrost liczby żywotnych komórek). Transfekcja komórek plazmidem powodującym zwiększoną ekspresję *IGFBP5* wywołała ograniczenie pro-migracyjnego działania obserwowanego w warunkach wyciszenia *DIRC3*, lecz nie wpłynęła na wyniki testów MTT. Profilowanie transkryptomu komórek raka tarczycy podlegających wyciszeniu *DIRC3* lub *IGFBP5* wskazało istotną współzależność tych dwóch genów. Analiza ontologii genów (GO) ujawniła, że pod wpływem wyciszenia *DIRC3* istotnej zmianie ekspresji podlegają geny zaangażowane w regulację potencjału migracyjnego komórek. Wykazałem również, że zmniejszenie ekspresji *DIRC3* uwrażliwia komórki nowotworowe na działanie IGF-1, co w konsekwencji aktywuje onkogenny szlak przekazywania sygnałów związany z białkiem AKT. Wynik ten jest zgodny

z wcześniej poznaną funkcją białka IGFBP5. Doświadczenia wykorzystujące mechanizmy *CRISPR activation* (CRISPRa) pozwoliły na zwiększenie ekspresji *DIRC3* w liniach komórkowych. Choć nie wpłynęło to na ekspresję *IGFBP5*, CRISPRa wywołał wzrost liczby żywotnych komórek w teście MTT. W ostatnim etapie projektu wykorzystałem CRISPR/Cas9 do edycji rs11693806, jednego z najważniejszych wariantów germinalnych determinujących ryzyko zachorowania na DTC. Wytworzyłem z heterozygotycznej linii komórkowej raka tarczycy (rs11693806[C/G]) izogeniczne klony komórkowe wykazujące homozygotyczność (rs11693806[G/G]) lub delecję allelu rs11693806[C]. Edycja ta w obu przypadkach spowodowała zmniejszenie ekspresji *DIRC3* oraz *IGFBP5*. Co więcej, powyższe modyfikacje genetyczne indukowały fenotyp komórkowy podobny do tego, który był wywoływany przez wyciszenie *DIRC3* (w tym efekt pro-migracyjny). Potwierdziłem również, że modyfikacja wariantu rs11693806 powoduje w komórkach globalne zmiany transkryptomu, w tym zmiany ekspresji wielu genów uczestniczących w procesach kancerogenezy.

Podsumowując, wyniki uzyskane podczas przygotowywania niniejszej rozprawy doktorskiej wskazują na to, że *DIRC3* jest funkcjonalnie zaangażowany w biologię raka tarczycy. Zmniejszenie ekspresji *DIRC3* wzmaga inwazyjność komórek, ale z drugiej strony może ograniczyć wzrost ich aktywności w teście MTT. Poznane mechanizmy wskazują, że *DIRC3* reguluje transkrypcję *IGFBP5*, przyczyniając się w ten sposób do zmiany wrażliwości komórek nowotworowych na działanie IGF-1. W oparciu o powyższe wyniki postawiłem hipotezę, że interakcja pomiędzy wariantami germinalnymi, ekspresją *DIRC3* oraz szlakiem przekazywania sygnałów z receptora dla IGF-1 stanowi mechanizm regulujący kancerogenezę w gruczole tarczowym.