

Cel prowadzonych badań

Nowotwory tarczycy stanowią najczęstsze grupy nowotworów gruczołów endokrynych a ich liczba w Polsce stale wzrasta. Podobne tendencje obserwuje się we wszystkich rozwiniętych krajach świata. Największa grupa nowotworów tarczycy rozwija się ze specyficznych dla tego narządu komórek pochodzących z gruczołu tarczycy. Dzielimy je na raki wysokozróżnicowane, a wśród nich brodawkowaty i papilarny, oraz niskozróżnicowane i raka anaplastycznego. Podstawą leczenia zróżnicowanych raków tarczycy, w tym raka brodawkowatego (PTC), stanowi przede wszystkim zabieg chirurgiczny, a następnie terapia hormonalna. Podstawą leczenia zróżnicowanych raków tarczycy, w tym raka brodawkowatego (PTC), stanowi przede wszystkim zabieg chirurgiczny, a następnie terapia hormonalna. Podstawą leczenia zróżnicowanych raków tarczycy, w tym raka brodawkowatego (PTC), stanowi przede wszystkim zabieg chirurgiczny, a następnie terapia hormonalna.

Produkt białkowy genu SLC5A8 pełni w tarczycy podwójnie istotną rolę. Został pierwotnie zidentyfikowany jako transporter jodkowy obecny w błonie szczycowej, czyli sąsiadującej z wiatłem papilarnej komórek tarczycy. Z tego powodu został nazwany AIT (ang. Apical Iodide Transporter). Jak już wspomniano, komórki tarczycy mają zdolność wychwytywania jodu, który następnie jest wbudowywany w hormony produkowane w gruczole tarczycy – tyroksynę i trijodotyroninę. Transport jodu przez błonę szczycową jest złożonym i nie do końca zbadanym procesem, w który najprawdopodobniej zaangażowanych jest wiele białek, a jego utrzymanie jest niezbędne dla prawidłowej syntezy hormonów tarczycy. Ponadto AIT jest supresorem nowotworzenia, czyli genem, którego produkt czuwa nad prawidłowymi podziałami komórki, a jego ekspresja jest obniżona nie tylko w nowotworach tarczycy, ale także w wielu innych, np. raku jelita grubego, ośrodkowego układu nerwowego, trzustki, płuca, prostaty, glejakach. Jego wyciszenie jest na tyle wczesnym i charakterystycznym zdarzeniem w kancerogenezie, że określenie jego metylacji – powszechnie występującego sposobu wyciszania poszczególnych genów – zostało nawet zaproponowane jako składowa część panelu diagnostycznego PTC. Poza tym jednak jego rola w tarczycy pozostaje stosunkowo niejasna, co implikuje potrzebę dalszych badań.

Najwięcej prac dotyczących jego funkcji supresorowej SLC5A8 odnosi się do jelita grubego i koncentruje na zdolności białka do transportu krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, w tym będących inhibitorami deacetylazy histonów 1 i 3 (HDAC1 i 3). Enzymy te, przez odłączenie reszt acetylowych od histonów, czyli białek, stanowi „rusztowanie” dla DNA, utrudniając odczyt informacji z pewnej puli genów. Tym samym takie zmiany acetylacji histonów w sposób bezpośredni skutkują obniżeniem ekspresji licznych białek.

Pomimo że SLC5A8 wydaje się pełnić niezwykle istotną rolę w zachowaniu prawidłowej fizjologii komórki, zwłaszcza tarczycowej – zarówno poprzez swoją rolę supresorową, jak i transport krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych i jodu – tylko kilka badań marginalnie wspomina o roli AIT w regulacji ekspresji innych genów zaangażowanych w proces nowotworzenia, m.in. TP53. Biorąc pod uwagę udział w regulacji namnaiania oraz eliminacji komórek, a więc nie zaburzenie równowagi tych procesów uważa się za przyczynę powstawania nowotworów. O istotnej roli SLC5A8 świadczy ten fakt, że wymuszenie jego ekspresji w liniach komórkowych wyprowadzonych z raka jelita grubego hamuje ich proliferację. **Zaskakujące jest zatem, że nikt nie przeprowadził analizy zmian wywołanych przez nadekspresję SLC5A8 na poziomie całego transkryptomu.** Taka analiza umożliwiłaby identyfikację wszystkich szlaków, które są w komórce regulowane przez AIT.

Opis zastosowanej metodyki

Otrzymane wyniki wstępne, stanowiące podstawę badania

Dotychczasowe badania wykazały, że obniżona ekspresja SLC5A8 w raku tarczycy jest bezwzględnie wynikiem zadziałania wielu czynników. Skierowało to naszą uwagę na rolę mikroRNA w regulacji ekspresji tego genu. MikroRNA (miRNA, miR) stanowi około 22 nukleotydowe niekodujące cząsteczki RNA, które hamują ekspresję genów poprzez wiązanie ze specyficznymi sekwencjami w ich transkryptach. Nasze badania na materiale tkankowym uzyskanym od pacjentów operowanych z powodu PTC potwierdziły, że spadkowi ekspresji genu towarzyszy wzrost ekspresji niektórych mikroRNA. W wykonanych przez nas badaniach **potwierdziliśmy wiązanie miR-181a-5p, miR-182-5p oraz miR-494-3p z 3'UTR SLC5A8. miR-181a-5p i -182-5p ulegają ponadto znacznej nadekspresji w raku tarczycy.** Również ekspresja miR-494-3p jest podwyższona. Wszystkie 3 mikroRNA zmniejszają ekspresję SLC5A8 na poziomie mRNA, a miR-182 obniża także zdolność transportu jodu. Zmiany w ekspresji mikroRNA mogą być modulowane przez specyficzne inhibitory, dlatego też potwierdziliśmy, że **wprowadzenie do komórek syntetycznego inhibitora miR-181a-5p zwiększa poziom mRNA SLC5A8.**

W odróżnieniu od zmian genetycznych, zmiany związane z mikroRNA są odwracalne. Ponieważ pojedyncze mikroRNA mogą regulować wiele genów docelowych, spodziewamy się, że efekty ich wyciszenia będą odbiegały od tych spowodowanych nadekspresją genu SLC5A8. Przegląd piśmiennictwa ujawnia, że powyższe mikroRNA ulegają nadekspresji także w innych nowotworach, wyciszając specyficzne dla nich szlaki. Możemy zatem, przez analogię do onkogenów, nazywać je onkomirmami. Tym bardziej interesującą i uzasadnioną wydaje się **zbadanie wpływu inhibicji miR-181a-5p, -182-5p i -494-3p na zmiany zachodzące na poziomie całego transkryptomu.**

Opis planowanych badań

Kolejnym krokiem będzie porównanie zmian w ekspresji genów wywołanych nadekspresją SLC5A8 oraz inhibicją mikroRNA. Podczas realizacji projektu stworzymy plazmid wyrażający gen SLC5A8 (czyli sklonujemy go) oraz stworzymy specyficzny konstrukt do wyciszenia funkcji wszystkich trzech badanych mikroRNA. Taki konstrukt nazywa się „sponge-miR”, ponieważ jego działanie polega na „wysysaniu” z komórki cząsteczek, na które jest skierowany. Tym samym ich poziom ulega znaczącej zmianie.

obni eniu.

Otrzymany w ten sposób materiał poddamy analizie sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Jest to bardzo nowoczesna metoda, umożliwiająca całą ciową analizę ekspresji wszystkich genów w komórce. W ten sposób otrzymamy listy genów o ekspresji zmienionej pod wpływem nadekspresji SLC5A8 oraz (osobno) wyciszenia mikroRNA. Następnie porównamy ze sobą te listy, celem określenia zmian wywołanych nadekspresją genu, zmian wywołanych przez wyciszenie wybranych mikroRNA, a w konsekwencji – określimy potencjalnie użyteczności inhibitorów mikroRNA w przywracaniu ekspresji SLC5A8 w raku brodawkowatym tarczycy.

Nie tylko dostarczy to listy genów regulowanych przez SLC5A8 i mikroRNA, ale także przybliży nas do odpowiedzi na pytanie, czy tkankospecyficzna inhibicja badanych mikroRNA mogłaby w przyszłości znaleźć zastosowanie terapeutyczne.

Podsumowując, cele niniejszego projektu to:

- określenie puli genów, których ekspresja w komórkach tarczycy jest zależna od SLC5A8,
- równoczesne wyciszenie mikroRNA miR-181a-5p, -182-5p i -494-3p w celu podniesienia ekspresji SLC5A8,
- zbadanie dokładnego wpływu wyciszenia mikroRNA na cały transkryptom, czyli na ekspresję wszystkich genów w komórce.

Uzasadnienie podjęcia badań

Będzie to pierwszy projekt w ramach którego zostanie scharakteryzowany wpływ SLC5A8 na ekspresję innych genów na poziomie całego transkryptomu.

Gen ten jest dla nas szczególnie interesujący, gdyż po pierwsze jako transporter jodu odgrywa rolę w produkcji hormonów przez tarczycę i terapii jodem radioaktywnym, a po drugie – spadek jego ekspresji jest typowy dla wielu nowotworów. W przypadku PTC jest nawet uważany za wczesne wydarzenie i z tego powodu jego oznaczenie zostało zaproponowane jako składowa część panelu diagnostycznego. Wobec powyższego, wywołując jego nadekspresję spodziewamy się wykazać jego szerokie działanie, w tym na liczne geny zaangażowane w procesy rozmnażania komórek (prolifracji) i ich planowej śmierci (apoptozy).

Określimy także możliwość przywrócenia ekspresji SLC5A8 za pomocą inhibitorów mikroRNA. Co istotne, dzięki zastosowaniu techniki NGS wskazywać będziemy użyteczne z terapeutycznego punktu widzenia inne geny docelowe dla tych mikroRNA. Każde z wskazanych przez nas mikroRNA, prócz SLC5A8, reguluje też wiele innych genów, a ich ekspresja jest zniżona również w innych nowotworach. Tylko dane pochodzące z NGS są w stanie dostarczyć nam informacji o wpływie ich wyciszenia na cały transkryptom. Nie są nam znane próby badania całych transkryptomów po wyciszeniu kilku mikroRNA, co dodatkowo wpływa na nowatorstwo niniejszego projektu.

Na koniec porównamy zmiany wywołane nadekspresją genu SLC5A8 z powodowanymi przez wyciszenie wybranych przez nas mikroRNA, dzięki czemu określimy potencjalnie użyteczność wyciszania wybranych mikroRNA u pacjentów cierpiących na raka brodawkowatego tarczycy.