

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Rak nerkowokomórkowy typu jasnokomórkowego (ccRCC, ang. *clear cell renal cell carcinoma*) jest najczęstszym i najbardziej agresywnym spośród nowotworów tego narządu, charakteryzującym się szybkim wzrostem i tworzeniem przerzutów. Możliwości terapii zaawansowanej postaci ccRCC są ograniczone, dlatego coraz większy nacisk jest kładziony na poszukiwanie sposobów wczesnego wykrywania tej choroby, ze szczególnym uwzględnieniem markerów molekularnych.

Jednym z mechanizmów zaburzonych w ccRCC jest różnicowe składanie pierwotnego transkryptu, czyli proces usuwania z pre-mRNA intronów i łączenia eksonów w ostateczną wersję transkryptu. W różnicowym składaniu pre-mRNA eksony mogą być łączone na różne sposoby, w wyniku czego na matrycy jednego genu możliwa jest synteza wielu różnych wariantów mRNA, a w konsekwencji różnych izoform białkowych. W regulacji tego procesu biorą udział liczne czynniki splicingowe, wśród których można wyróżnić białka SR i hnRNP. Białka te regulują składanie transkryptów onkogenów i supresorów nowotworowych, a ponadto same mogą działać jak protoonkogeny i promować powstawanie specyficznych izoform, bezpośrednio zaangażowanych w proces nowotworzenia. Ekspresja SRSF1, SRSF2 i hnRNP A1 jest zaburzona w ccRCC [Piekiełko-Witkowska i wsp., 2010], lecz przyczyny tych nieprawidłowości nie były znane.

Potencjalnymi regulatorami ekspresji czynników splicingowych w ccRCC mogą być cząsteczki mikroRNA – krótkie niekodujące RNA, regulujące ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym poprzez degradację mRNA lub zahamowanie translacji. mikroRNA regulują ekspresję docelowych genów oddziałując z rejonami 3'UTR transkryptów. Podobnie jak pozostałe rejony mRNA, również i rejony 3'UTR mogą podlegać procesowi różnicowego składania, co może skutkować powstawaniem transkryptów różniących się miejscami wiązania mikroRNA.

Z uwagi na powyższe przesłanki celem niniejszej pracy była identyfikacja wariantów rejonów 3'UTR czynników splicingowych SRSF1, SRSF2 i hnRNP A1 oraz określenie roli cząsteczek mikroRNA w regulacji ekspresji czynników splicingowych SRSF1 i hnRNP A1 w ccRCC.

Materiał do badań stanowiły linie komórkowe wyprowadzone z ccRCC, a także próbki RNA oraz białka, wyizolowane z 30 par próbek tkankowych, na które składały się próbki nowotworów ccRCC oraz odpowiadające im próbki kontrolne nerki, bez nacieku

nowotworowego. Metodyka obejmowała liczne techniki biologii molekularnej i komórkowej, w tym qPCR, RT-PCR, Western blot oraz testy w systemie lucyferazowym.

W toku przeprowadzonych badań zidentyfikowałam warianty splicingowe 3'UTR SRSF1, SRSF2 i hnRNP A1 występujące w próbkach ccRCC oraz próbkach kontrolnych, w tym dwa nowe, dotychczas nieopisane warianty splicingowe 3'UTR SRSF1 i jeden nowy wariant splicingowy 3'UTR SRSF2 oraz wykazałam, że ekspresja wariantów SRSF2-X2, SRSF2-4 i SRSF2-5 jest zaburzona w guzach ccRCC. Zidentyfikowałam również cząsteczki miR-10b-5p i miR-203a-3p jako bezpośrednie regulatory ekspresji SRSF1 oraz miR-135a-5p i miR-149-5p jako bezpośrednie regulatory ekspresji hnRNP A1 w ccRCC. Wykazałam także, że zidentyfikowane warianty splicingowe 3'UTR SRSF1 i SRSF2 różnią się miejscami wiązania regulujących je mikroRNA.

Na podstawie wyników uzyskanych w toku realizacji niniejszej pracy można wnioskować, że rejony 3'UTR czynników splicingowych SRSF1 i SRSF2 ulegają procesowi różnicowego składania pierwotnego transkryptu w ccRCC. Ponadto wykazałam, że ekspresja SRSF1 i hnRNP A1 jest bezpośrednio regulowana przez cząsteczki mikroRNA. Na tej podstawie można ostrożnie wnioskować, że zaburzona ekspresja mikroRNA może być jedną z przyczyn nieprawidłowej ekspresji czynników splicingowych w ccRCC.

STRESZCZENIE W JEZYKU ANGIELSKIM

Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is the most common and aggressive type of renal tumors, characterized by fast growth and metastasis. The possibilities of advanced ccRCC therapy are limited, so more and more emphasis is being put on early detection of the disease, with the special focus on molecular markers.

One of the mechanisms disturbed in ccRCC is alternative splicing, a process in which introns are removed from the primary transcript and exons are joined to form mature mRNA. In alternative splicing exons can be joined in different manner so numerous transcripts and consequently different protein variants can be produced on a basis of a single gene. Numerous splicing factors, including SR and hnRNP proteins, are involved in the regulation of this process. These proteins regulate splicing of oncogenes and tumor suppressors, moreover, they can act as proto-oncogenes themselves and promote the formation of specific isoforms directly involved in carcinogenesis. Expression of SRSF1, SRSF2 and hnRNP A1 is disturbed in ccRCC [Piekiełko-Witkowska et al., 2010], however the causes of these disturbances were not known.

Potential regulators of splicing factors expression in ccRCC may be microRNA – short non-coding RNAs that regulate gene expression at the post-transcriptional level by mRNA degradation or inhibition of translation. microRNAs regulate the expression of target genes by interacting with 3'UTRs of transcripts. Similarly to other regions of mRNA, also 3'UTRs may undergo a process of alternative splicing, which may result in the formation of transcripts differing in the microRNA binding sites.

Due to the above-mentioned reasons the aim of this study was to identify variants of 3'UTR regions of SRSF1, SRSF2 and hnRNP A1 and to determine the role of microRNAs in the regulation of expression of SRSF1 and hnRNP A1 in ccRCC.

The research material constituted of cell lines derived from ccRCC, as well as RNA and protein samples isolated from 30 pairs of tissue samples, which consisted of ccRCC tumor samples and corresponding kidney control samples without tumour infiltration. The methodology included numerous techniques of molecular and cellular biology, including qPCR, RT-PCR, Western blot and luciferase assays.

In the course of my research I identified splice variants of SRSF1, SRSF2 and hnRNP A1 3'UTRs present in ccRCC samples and controls, including two new, not previously described splice variants of SRSF1 3'UTR and one new splice variant of SRSF2 3'UTR. I showed that the expression of SRSF2-X2, SRSF2-4 and SRSF2-5 variants is impaired in

ccRCC tumors. I also identified miR-10b-5p and miR-203a-3p molecules as direct regulators of SRSF1 expression and miR-135a-5p and miR-149-5p as direct regulators of hnRNP A1 expression in ccRCC. I also found that the identified splice variants of SRSF1 and SRSF2 3'UTRs differ in the presence or absence of binding sites of the microRNAs that regulate them.

Based on the results obtained in the course of my research, it can be concluded that 3'UTR regions of SRSF1 and SRSF2 splicing factors undergo a process of alternative splicing in ccRCC. Additionally, I showed that the expression of SRSF1 and hnRNP A1 is directly regulated by microRNA. On the basis of these results, it can be cautiously concluded that disturbed expression of microRNA may be one of the causes of incorrect expression of splicing factors in ccRCC.