

W dzisiejszych czasach ryzyko rozwoju choroby nowotworowej wzrasta niezmiernie szybko, zarówno w krajach wysoko jak i słabo rozwiniętych. Głównymi przyczynami tego zjawiska jest ogólne wydłużenie przeciętnej długości życia populacji, jak i rozprzestrzenianie się czynników ryzyka, takich jak nieodpowiednia higiena życia, w tym palenie tytoniu, nieprawidłowa dieta czy niska aktywność fizyczna. Nowotwory są obecnie jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Rocznie, wśród kobiet najwięcej przypadków zachorowań oraz zgonów notuje się z powodu raka piersi, a wśród mężczyzn z powodu raka płuc.

Rozwój nowotworu jest konsekwencją wielu zmian upośledzających normalne mechanizmy odpowiedzialne za regulację prawidłowego wzrostu i rozwoju komórek. Dwie główne grupy genów zaangażowane w inicjację rozwoju nowotworu to onkogeny i geny supresorowe nowotworów. Ludzki genom koduje sekwencje tzw. proto-onkogenów, których produkty białkowe zaangażowane są w regulację wzrostu i różnicowanie się komórek. W wyniku mutacji bądź nadmiernej ekspresji, proto-onkogeny transformowane są do onkogenów, a procesy przez nie regulowane zostają zaburzone. Geny supresorowe nowotworów są odpowiedzialne za ochronę komórki przed procesami patologicznymi, mogącymi prowadzić do rozwoju nowotworu. W komórkach nowotworowych są one często inaktywowane. Zablockowanie ich funkcji może być spowodowane przez genetyczne bądź epigenetyczne mutacje. Mutacje epigenetyczne odnoszą się do zmian obserwowanych w komórce, które nie są związane ze zmianami sekwencji DNA, jednak wpływają na aktywność genów. Jedną z intensywnie badanych zmian epigenetycznych jest metylacja cytozyny. Metylacja jest procesem biochemicznym, polegającym na przyłączeniu grupy metylowej do cytozyny. Zmian tę obserwuje się najczęściej w kontekście dinukleotydu CpG, gdzie cytozyna występuje w siedztwie guaniny na 3' końcu. Dinukleotydy CpG występują w dużej ilości w obrębie elementów regulatorowych genów takich jak promotory. Metylacja cytozyny w sekwencji promotora wiąże się z inaktywacją ekspresji genu. Komórki nowotworowe cechują się niskim globalnym poziomem metylacji, jednak hipermetylacja jest zmianą obecną w obrębie promotorów genów supresorowych, przez co są one nieaktywne. Specyficzne mechanizmy odpowiedzialne za inaktywację określonych genów supresorowych nie zostały do tej pory dobrze scharakteryzowane. Naszym celem jest zbadanie roli wybranych czynników transkrypcyjnych należących do rodziny KRAB-ZNF (Krüppel associated box-Zinc Finger Proteins) w modulowaniu epigenetycznego profilu komórek nowotworowych. Jesteśmy przede wszystkim zainteresowani sprawdzeniem tego, czy czynniki KRAB-ZNF wpływają na epigenetyczną represję genów supresorowych. Zakładamy bowiem, że poprzez negatywną regulację genów supresorowych, nowotworowe czynniki KRAB-ZNF wpływają na progresję nowotworzenia.

Białka KRAB-ZNF są silnymi epigenetycznymi represorami. Wiążą się specyficznie do określonych sekwencji DNA i poprzez formowanie kompleksu złozonego z wielu białek inicjują powstawanie heterochromatyny. Heterochromatyna jest „zamkniętym” stanem chromatyny związanym z represją transkrypcji genów znajdujących się w jej otoczeniu. Naszym celem jest identyfikacja konkretnych genów, które są regulowane przez białka KRAB-ZNF w komórkach nowotworowych. Na podstawie analiz statystycznych wybraliśmy kilka genów KRAB-ZNF, których ekspresja znacznie wzrasta w różnych typach nowotworów. Analizy te zostały wykonane na podstawie danych zdeponowanych w projekcie TCGA (The Cancer Genome Atlas), jednym z największych ogólnomiędzybranżowych projektów, mających na celu porównawczą analizę i określenie molekularnego profilu ludzkich nowotworów. W kolejnym etapie wyniki otrzymane za pomocą analiz statystycznych zostaną zweryfikowane w laboratorium. Do tego celu użyte zostaną podstawowe techniki biologii molekularnej tj. RT-qPCR czy Western blot oraz materiał biologiczny pozyskany z tkanek i linii komórkowych reprezentujących dwa najczęstsze typy nowotworów: raka piersi i płuc. W kolejnym etapie ustalone zostaną miejsca wiązania wybranych czynników KRAB-ZNF do konkretnych sekwencji w genomie. Do tego celu wykorzystana zostanie szeroko-przepustowa metoda sekwencjonowania nowej generacji. Sprawdzimy również wpływ ekspresji wybranych czynników KRAB-ZNF na biologię komórek nowotworowych. W tym celu przygotowane zostaną komórki z obniżonym poziomem ekspresji otrzymanym z wykorzystaniem metody interferencji RNA. Analizy mające na celu zbadanie poziomu proliferacji, apoptozy, migracji oraz inwazyjności tak przygotowanych komórek pozwolą nam określić potencjał onkogenny badanych czynników KRAB-ZNF. W ostatnim etapie zweryfikujemy czy efekty epigenetyczne wywoływane przez czynniki KRAB-ZNF *in vitro* mogą mieć związek z charakterem nowotworu *in vivo*. W tym celu skorelujemy ze sobą dane dotyczące poziomu ekspresji wybranych czynników KRAB-ZNF oraz dane kliniczne pacjentów.

Niniejszy projekt stanowi połączenie metodologii wielu dziedzin, takich jak biologia molekularna, inżynieria genetyczna, epigenetyka, bioinformatyka czy biostatystyka. Otrzymane wyniki mają na celu określenie roli wyselekcjonowanych represorów KRAB-ZNF w modulowaniu epigenetycznego profilu komórek nowotworowych. Byłoby to pierwsze badanie, które analizowałoby rolę nowotworowych czynników KRAB-ZNF na tak szeroką skalę. Wskazanie konkretnych czynników KRAB-ZNF, które mogłyby potencjalnie być odpowiedzialne za inaktywację genów supresorowych jest niezwykle istotne. Otrzymane wyniki mogą mieć ogromne znaczenie nie tylko dla poszerzenia wiedzy na temat molekularnych mechanizmów regulujących proces kancerogenezy, ale także dla opracowania epigenetycznych celowanych terapii przeciwnowotworowych w przyszłości.