

Cel bada

W niniejszym projekcie planujemy zbadanie funkcji nowo odkrytego przez nasz zespół centrosomalnego białka CRNDEP. Podejmiemy również próby zidentyfikowania jego białkowych partnerów oraz określenia jego wartości prognostycznej w raku jajnika. Dodatkowo zostanie oszacowany wpływ sztucznej nadekspresji lub wyciszenia genu kodującego CRNDEP na odpowiedź na cytostatyki i estrogeny w liniach MCF-7 i HEK 293.

Metodyka badawcza

Do niedawna gen *CRNDE* (colorectal neoplasia differentially expressed) był klasyfikowany jako długie niekodujące RNA (lncRNAs). Ostatnio nasz zespół badawczy odkrył i jeden z jego transkryptów koduje produkt białkowy CRNDEP. Peptyd ten zbudowany jest z 84 aminokwasów i prawdopodobnie odpowiada za regulację proliferacji jako składnik centrosomów. Stwierdziliśmy również, iż CRNDEP jest silnie nadekspresjonowane w intensywnie proliferujących tkankach, takich jak krypty jelitowe, spermatocyty, endometrium w fazie proliferacji oraz komórki raka jajnika. Inne wyniki naszych badań pokazują, że podniesiona ekspresja *CRNDE* w komórkach raka jajnika jest związana ze złym rokowaniem u pacjentek leczonych w schemacie taksany/cisplatyna. Ponadto ekspresja *CRNDE* jest znacząco podniesiona w guzach z prawidłowym TP53 w porównaniu z tymi z akumulacją TP53.

W ramach projektu planujemy poszukiwanie związków pomiędzy sztucznie zmienioną ekspresją *CRNDE*, a zmianami w poziomie proliferacji i apoptozy, zaburzeniami w cyklu komórkowym oraz potencjalnym obniżeniem żywotności komórek linii MCF-7 i HEK 293. Takie same zależności będą oceniane po traktowaniu tych komórek estrogenami oraz wybranymi cytostatykami, w tym nocodazolem, paklitaksellem, fenformin, gryzeofulwin i kalcytriolem. Ponieważ nie posiadamy jeszcze linii komórkowych ze stabilną nadekspresją lub wyciszeniem *CRNDE*, w początkowej fazie projektu, planujemy przeprowadzenie doświadczenia na liniach MCF-7 i HEK 293, stransfekowanych posiadającymi już konstrukcjami, wywołującymi przejściową nadekspresję *CRNDE* lub jego wyciszenie. Następnie wszystkie stwierdzone zależności będą weryfikowane w nowo wyprowadzonych stabilnych liniach (w oparciu o linię MCF-7 i HEK 293), zawierających kasetę ekspresyjną umożliwiającej regulowanie nadekspresji lub wyciszenia *CRNDE*. Te linie potomne zostaną stworzone w oparciu o technologię CRISPR-Cas9, która umożliwia precyzyjne edytowanie genomu, w połączeniu z wykorzystaniem systemu ekspresyjnego Tet-On. Wpływ zmian ekspresji *CRNDE* na cały transkryptom komórki zostanie oceniony metodą sekwencjonowania RNA na platformie NGS HiSeq 2500. Dodatkowo aktywność transkrypcyjną genów, funkcjonalnie związanych z *CRNDE*, tj. *TP53*, *IRX5* oraz genów kodujących cykliny i receptor estrogenowy zostanie oceniona metodą ilościowego PCR z wykorzystaniem systemu 7500 Fast Real-Time PCR.

Zamierzamy również dokonać oceny wartości prognostycznej białka CRNDEP poprzez określenie, jak zmiany w jego ekspresji w 250 rakach jajnika wpływają na czas całkowitego przeżycia oraz na czas wolny od objawów choroby w grupie pacjentek leczonych taksanami i cisplatiną. Badanie to zostanie przeprowadzone w oparciu o barwienia immunohistochemiczne, z użyciem przeciwciała specyficznego do CRNDEP, na skrawkach parafinowych z guzów utrwalonych formaliną.

Podejmiemy również próby identyfikacji białkowych partnerów peptydu CRNDEP, wykorzystując metodę tandemowej chromatografii powinowactwa z użyciem znaczników Strep-tag i FLAG (SF-TAP). Pozwala ona na oczyszczanie białek w ich natywnej formie, dzięki czemu zachowane są kompleksy białkowe istniejące in vivo, co umożliwia identyfikację natywnych interakcji białko-białko.

Wpływ rezultatów

Rak jajnika jest główną przyczyną zgonów z powodu nowotworów ginekologicznych, podczas gdy rak piersi jest najczęstszym nowotworem u kobiet w Europie. Według danych Polskiego Narodowego Rejestru Nowotworów, na raki jajnika i piersi zmarło w Polsce w 2010 roku odpowiednio 2547 i 5226 pacjentek. Wysoka śmiertelność, spowodowana tymi nowotworami, wynika z niespecyficznymi objawami we wczesnych stadiach choroby oraz z nie zawsze skutecznej diagnostyki przesiewowej. Wskutek tego pacjentki są diagnozowane w późnych stadiach choroby, które charakteryzują się złym rokowaniem. Identyfikacja nowych markerów molekularnych, mających zastosowanie w diagnostyce lub jako cele terapii molekularnej, mogłaby znacząco ułatwić wczesne wykrywanie i skuteczniejsze leczenie tych nowotworów.

Centrosomy wyewoluowały w komórkach zwierząt by pełnić funkcje głównych centrów organizacji mikrotubul (MTOC) oraz regulować progresję cyklu komórkowego. Są zbudowane z dwóch ortogonalnie ustawionych względem siebie centrów i otoczone amorficzną macierzą białkową, określaną jako materiał pericentriolarny (PCM). Jak wcześniej wspomniano, udało się nam niedawno stwierdzić, iż akumulacja białka TP53 w komórkach raka jajnika jest skorelowana z obniżoną ekspresją *CRNDE*. Te obserwacje wydają się być zgodne z faktem, iż TP53 oraz inne białka supresorowe nowotworów, takie jak BRCA1, BRCA2, RAD51 i PARP1, są ważnymi składnikami centrosomów. Odgrywają istotną rolę w regulacji metabolizmu centrosomów, a mutacje i zmieniona ekspresja kodujących je genów prowadzi do zaburzeń strukturalnych i numerycznych w tym organelum. Nieprawidłowości w obrębie centrosomów są dobrze udokumentowanym zjawiskiem w różnych typach nowotworów. Można je podzielić na dwie grupy, zaburzenia strukturalne i numeryczne. Co ciekawe, oba typy mogą występować jednocześnie nie w tym samym guzie. W przeciwieństwie do zdrowych komórek, w komórkach nowotworowych, zawierających wielokrotnie centrosomy, których obecność powinna prowadzić do utworzenia wielobiegunowego wrzeciona podziałowego, zaburzenia w segregacji chromosomów, a także śmierci w wyniku katastrofy mitotycznej. Jednakże wiele komórek nowotworowych uzyskuje zdolność klasteryzacji nadliczbowych centrosomów, dzięki czemu są one w stanie przeprowadzić z sukcesem podział mitotyczny. Niektóre leki, między innymi gryzeofulwina i zredukowana forma 9-bromonoskapiny (RedBr-Nos), mają zdolność do rozpraszania i zgrupowania centrosomów (deklasteryzacji), co może selektywnie prowadzić komórki nowotworowe z nadliczbowymi centrosomami do katastrofy mitotycznej i apoptozy, zarazem nie wpływając na zdrowe komórki.

Mimo iż gen *CRNDE* nie jest jeszcze dobrze zbadany, w istniejącej literaturze jest on opisywany jako czynnik promujący rozwój nowotworów. Jego ekspresja jest silnie podniesiona w raku jelita grubego, w raku jajnika, a także w innych guzach litych i białaczkach. Inne badania, prowadzone na glejakach, zarówno in vitro jak i in vivo, wskazują na jego udział w promowaniu wzrostu komórek i inwazyjności za pośrednictwem szlaku mTOR.

Istnieją doniesienia, iż traktowanie komórek raka jelita grubego insuliną lub insulinopodobnym czynnikiem wzrostu skutkuje obniżeniem poziomu zdrowych transkryptów *CRNDE*. Ten efekt może być powstrzymany przy użyciu inhibitorów szlaków PI3K/Akt/mTOR i Raf/MAPK, co sugeruje, że ekspresja genu *CRNDE* zależy od obu tych kaskad sygnałowych. Ponadto

wyciszenie genu *CRNDE* prowadzi do zahamowania tlenowej glikolizy, nazywanej efektem Warburga, i b d cej charakterystyczn cech nowotworów.

Warte wspomnienia s również wyniki, które pokazuj , e poziomy zewn trzkomórkowych transkryptów *CRNDE*, wolno kr cych w osoczu krwi, s znacz co podniesione u pacjentów z gruczolakami i rakami jelita grubego w porównaniu do grupy kontrolnej. Autorzy tych bada zasugerowali, i takie testy krwi pozwalaj odró nia ludzi chorych od zdrowych z wysok czuło ci i specyficzno ci diagnostyczn .

Uwzgl dniaj c wszystkie te fakty, wydaje si prawdopodobne, e dalsze badania nad funkcj transkryptów genu *CRNDE* i jego białkowym produktem mog zaowocowa w przyszło ci udoskonaleniem procedur diagnostycznych, a nawet rozwojem nowych metod terapii molekularnej nowotworów.