

3-bromopirogronian (3-BP) to aktualnie intensywnie badany związek o aktywności przeciwnowotworowej. Nietypowa aktywność tego leku polega na zahamowaniu biologicznych systemów produkcji energii charakterystycznych dla komórek nowotworowych tzw. efekt Warburga. Efekt ten przejawia się w intensywnym tempie glikolizy zachodzącej również w obecności tlenu. Badania na komórkach zwierzęcych oraz badania przeprowadzone na ludzkich liniach nowotworowych pokazują wysoką skuteczność 3-BP w terapii. Należy podkreślić, że stężenie działające bójkowo na komórki nowotworowe jest ok. 3 – krotnie niż stężenie bójkowe dla komórek zdrowych. Wiąże się to nie tylko z nietypowym metabolizmem reprezentowanym przez komórki nowotworowe, ale również z tym, że 3-BP jest transportowany do komórek przy pomocy transporterów MCT1, których w komórkach nowotworowych jest więcej niż w komórkach zdrowych. W ludzkim organizmie są komórki, które również posiadają liczne transportery MCT1 co skutkowało akumulacją 3-BP również w tego rodzaju komórkach podczas terapii. Dokładny mechanizm działania 3 – BP nie został jeszcze poznany, wiadomo jednak, że jest to związek wysoce reaktywny, przypuszcza się, że może powodować alkilacje enzymów glikolitycznych i mitochondrialnych oraz indukować stres oksydacyjny. Proponowany projekt ma na celu zbadanie po raz pierwszy czy 3-bromopirogronian (3-BP) jest związkiem genotoksycznym u modelowego organizmu jakim są drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Ocena mutagennych aktywności 3-BP będzie zbadana zarówno w stosunku do genomu jądrowego jak i mitochondrialnego. Odpowiedź komórkowa na uszkodzenia DNA, mechanizmy aktywacji punktów kontrolnych cyklu komórkowego oraz mechanizmy naprawy uszkodzonego DNA są niezwykle podobne pomiędzy komórkami drożdży oraz wyszszymi eukariontami. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* są użytecznym modelem w badaniach wielu molekularnych mechanizmów, w tym działania nowych chemioterapeutyków. Zaletą wyboru drożdży jako eukariotycznego modelu do badań jest nie tylko ich znaczne podobieństwo do wyszszych eukariontów ale również fakt, iż są one łatwe i tanie w hodowli. Biologia molekularna dysponuje wieloma metodami, które umożliwiają w krótkim czasie uzyskać oczekiwane wyniki. Dzięki zastosowaniu modelu drożdżowego znacząco pogłębiło wiedzę w zakresie biologii molekularnej komórek eukariotycznych.

W celu sprawdzenia czy 3-BP wykazuje aktywność genotoksyczną planuje przeprowadzić szereg eksperymentów pokazujących czy po zadziałaniu 3-BP dochodzi do generowania uszkodzeń w DNA oraz czy uruchamiana jest odpowiedź komórkowa na uszkodzenia DNA. Wstępne badania pozwoliły zidentyfikować pierwsze mutanty pozbawione białek niezbędnych dla prawidłowej odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA, które to wrażliwe są na 3-BP. Aby sprawdzić czy jednym z mechanizmów cytotoksycznych 3-BP jest generowanie uszkodzeń DNA w pierwszej kolejności zbadana zostanie wrażliwość na 3-BP kolejnych mutantów pozbawionych białek ważnych dla prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego oraz biorzących udział w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. W kolejnym kroku określimy czy w odpowiedzi na obecność 3-BP dochodzi do aktywacji punktów kontrolnych cyklu komórkowego. We wcześniejszej fazie odpowiedzi na dwuniciowe złamania DNA oraz zaburzenia replikacji dochodzi do fosforylacji histonu H2A co związane jest z aktywacją punktów kontrolnych cyklu komórkowego. Następnym krokiem będzie więc zbadanie metodą Western Blot poziomu fosforylacji tego białka w szczepie typu dzikiego po ekspozycji na 3-BP. W odpowiedzi na uszkodzenia DNA fosforylacji ulega również kinaza efektorowa Rad53 co w konsekwencji prowadzi do aktywacji punktów kontrolnych cyklu komórkowego. Dodatkowo zaplanowano również sprawdzenie poziomu fosforylacji kinazy efektorowej Rad53 w czasie ekspozycji na 3-BP. Pojawienie się ufosforylowanej formy białka Rad53 oraz histonu H2A w obecności 3-BP będzie wskazywało na aktywację punktów kontrolnych cyklu komórkowego w odpowiedzi na pojawiające się uszkodzenia DNA. Aby sprawdzić czy w odpowiedzi na 3-BP powstają złamania DNA, które naprawiane są przy pomocy homologicznej rekombinacji zostanie wykorzystany szczep, w którym główny mediator homologicznej rekombinacji, białko Rad52, podlega ekspresji wspólnie z białkiem ołtej fluorescencji YFP. Szczep ten zostanie poddany inkubacji z 3-BP a następnie obserwacji w mikroskopie fluorescencyjnym w celu określenia liczby skupisk białka Rad52, które odpowiadają centrom naprawczym. Wzrost liczby komórek w których obserwuje się skupiska tego białka w odpowiedzi na 3-BP będzie wiadczył o pojawieniu się uszkodzeń DNA, które naprawiane są przy udziale homologicznej rekombinacji. Aby ustalić czy 3-BP powoduje u drożdży powstanie dwuniciowych złamań postanowiono wykorzystać technikę elektroforezy pulsacyjnej chromosomów (PFGE). Pozwala ona na rozdział całych chromosomów w celu ich uwidocznienia w postaci wyraźnych, oddzielonych od siebie pręgów, z których każda przedstawia przynajmniej jeden chromosom drożdżowy. Znikanie pręgów i akumulacja niskocząsteczkowego „szmiru” wskazuje na fragmentację chromosomów. W odpowiedzi na złamania DNA dochodzi do aktywacji punktów kontrolnych cyklu komórkowego czego następstwem jest spowolnienie lub zatrzymanie cyklu komórkowego. Aby sprawdzić czy ekspozycja na 3-BP skutkuje zaburzeniami w kinetyce cyklu komórkowego postanowiono przeprowadzić analizę przebiegu cyklu komórkowego w odpowiedzi na 3-BP przy pomocy cytometrii przepływowej. W celu uzyskania pełnego obrazu aktywności 3-BP na DNA komórek eukariotycznych zbadany zostanie również wpływ 3-BP na genom mitochondrialny. Sprawdzimy również czy 3-BP powoduje niestabilność genomu poprzez określenie minimalnej częstości rekombinacji w regionie wysoce aktywnym transkrypcyjnie rDNA.

Ze względu na wzrost zachorowań na nowotwory, wysokie koszty leczenia a także coraz częściej obserwowany brak skuteczności stosowanych terapii ciągle poszukuje się nowych metod leczenia. W pełni uzasadnione wydają się badania mające na celu pełną charakterystykę nowego leku dzięki któremu możliwe będzie wykorzystanie nowatorskiego podejścia do terapii. Pełna charakterystyka mechanizmu działania 3-BP może przełożyć się na skuteczność stosowanych terapii. Jeżeli 3-BP powoduje uszkodzenia DNA to być może jest to kolejny, nieznany dotychczas mechanizm działania (mutagennego) dzięki któremu niszczone są komórki nowotworowe, w których mechanizmy naprawcze mogą nie być wystarczająco skuteczne. Wyniki uzyskane w ramach realizacji tego projektu mogą być wstępem do projektów w ramach których zbadana zostanie aktywność genotoksyczna na komórkach ludzkich. Realizacja tego projektu dostarczy również nowych i podstawowych informacji na temat komórkowej odpowiedzi na stres.