

POPULARNONAUKOWE STRESZCZENIE PROJEKTU

Wszystkie komórki organizmu człowieka zawierają te same geny, ale nie w każdej z nich wszystkie geny ulegają ekspresji, czyli procesowi polegającemu na odczytaniu informacji zawartej w genie i przepisaniu jej na produkt genu, którym może być białko lub RNA. Wzór ekspresji genów jest utrzymywany dzięki określonym mechanizmom epigenetycznym, które zmieniają ekspresję określonych genów bez zmian w ich sekwencji nukleotydowej.

Jednym z podstawowych sposobów epigenetycznej regulacji ekspresji genów jest metylacja reszt cytozyny w DNA (powstaje 5-metylocytozyna). Określony wzór metylacji DNA zależy nie tylko od przebiegu samego procesu przyłączania grup metylowych do reszt cytozyny, ale jest również wynikiem procesu pasywnej i aktywnej demetylacji DNA. Najnowsze doniesienia sugerują, że bardzo istotną rolę w demetylacji DNA odgrywają białka TET (ten-eleven translocation), których aktywność enzymatyczna polega na hydroksylacji, czyli dodaniu do cząsteczki związku grupy hydroksylowej (-OH), 5-metylocytozyny do 5-hydroksymetylocytozyny. W komórkach człowieka zidentyfikowano trzy białka TET określone jako TET1, TET2 i TET3, kodowane przez trzy różne geny. W przypadku wielu typów nowotworów stwierdza się spadek ekspresji genów *TET1* i *TET2*. Obniżona ilość białek TET jest czynnikiem wpływającym na rozwój i progresję nowotworów. Jednak wyniki przeprowadzonych przez nas badań wstępnych ujawniły, że TET3 w raku endometrium zachowuje się odmiennie od pozostałych członków rodziny TET. Podczas gdy ekspresja *TET1* i *TET2* malała wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania nowotworu, to ekspresja *TET3* wzrastała.

Udział białek TET w regulacji ekspresji genów nie ogranicza się tylko do ich enzymatycznej aktywności. Białka TET mogą bowiem wchodzić w interakcje z białkami uczestniczącymi w modyfikacjach histonów – małych, zasadowych białek wchodzących w skład chromatyny, wpływając tym samym na ich aktywność. Jednym z białek, z którym oddziałują białka TET jest enzym O-GlcNAc transferaza (OGT). Aktywność OGT polega na przyłączaniu pojedynczych reszt cukru (N-acetyloglukozaminy) do białek, a proces ten nosi nazwę O-GlcNAcytacji. Zwiększona ekspresja genu kodującego OGT, jak również nasilony poziom O-GlcNAcytacji są cechami charakterystycznymi wielu typów nowotworów. Białka TET mogą oddziaływać z OGT umożliwiając jej transport do chromatyny, gdzie modyfikuje białka histonowe. W związku z tym kompleks OGT-TET wpływa na regulację ekspresji genów. Mimo, iż wszystkie trzy białka TET wpływają na rekrutację OGT do chromatyny, sugeruje się, że kluczową rolę w tym procesie odgrywa białko TET3, co zdają się potwierdzać wyniki kilku badań.

Biorąc pod uwagę dostępne dane literaturowe oraz wyniki badań własnych postawiliśmy hipotezę, że oddziaływanie między białkami TET3 i OGT mogą mieć istotny wpływ na proces progresji nowotworów. Naszym celem będzie określenie czy wzajemne oddziaływanie między OGT i TET3 mają wpływ na regulację ekspresji genów związanych z zwiększeniem zdolności komórek do inwazji i przerzutowania. Planowane w projekcie badania będą prowadzone z wykorzystaniem linii komórek nowotworowych błony śluzowej trzonu macicy i piersi oraz linii komórek nienowotworowych gruczołu sutkowego, a także z wykorzystaniem materiału klinicznego pochodzącego od pacjentek z rakiem endometrium. W celu określenia w jaki sposób zmiana ekspresji genu *TET3* wpływa na aktywność OGT, planowane eksperymenty na liniach komórkowych będą prowadzone w różnych wariantach ekspresji genów *TET3* i *OGT*. W celu sztucznego obniżenia lub zwiększenia ekspresji tych genów będą zastosowane odpowiednie metody, tj. zastosowanie specjalnych wektorów (plazmidów) ekspresyjnych. Określenie wpływu zmienionej ekspresji *TET3* na ekspresję i lokalizację OGT oraz na zmiany modyfikacji epigenetycznych sprawdzone zostanie przy użyciu metody Western Blot. Określony zostanie również wpływ zmienionej ekspresji *TET3/OGT* na ekspresję wybranych genów, których produkty białkowe zaangażowane są w progresję nowotworów, jak również wpływ tej zmiany na lokalizację OGT w sekwencjach kodujących owe geny. Całościowy poziom 5-metylocytozyny i 5-hydroksymetylocytozyny, jak również analiza zdolności komórek nowotworowych do migracji i inwazyjności będzie przeprowadzona za pomocą komercyjnie dostępnych testów. Ostatnim zadaniem planowanym w projekcie będzie analiza poziomu ekspresji *OGT* i wybranych genów zaangażowanych w progresję nowotworów w preparatach klinicznych raka endometrium. Wśród uzyskanych wyników szukać będziemy korelacji między ekspresją *TET3/OGT* a ekspresją badanych genów. Dodatkowo uzyskane wyniki zostaną przeanalizowane i skorelowane z danymi klinicznymi i patomorfologicznymi.

Poznanie mechanizmów związanych z utrzymaniem prawidłowego wzoru modyfikacji epigenetycznych może mieć ogromne znaczenie dla lepszego zrozumienia procesów transformacji nowotworowej i w konsekwencji przyczynić się do opracowania nowych metod w diagnostyce i terapii nowotworów.