

Choroby nowotworowe to jeda z najczęstszych przyczyn śmierci na świecie. Jedną z głównych cech charakterystycznych nowotworu jest szybki rozwój nieprawidłowych komórek, które mogą objąć swoim zasięgiem inne organy w procesie zwanym metastazą.

Ze względu na fakt, iż obecnie dostępne terapie przeciwnowotworowe obejmujące chemioterapię, radioterapię oraz operacje są niewystarczające przewidywania są szokujące – częstość występowania nowotworów może wzrosnąć do 19.3 miliona do 2050 roku. Wszystkie sposoby leczenia powodują efekty uboczne, gdyż charakteryzują się nieswoistością działania zarówno w stosunku do komórek nowotworowych i prawidłowych. Nowotworzenie to proces wieloetapowy ściśle związany ze zmianami na molekularnym poziomie komórki. Przyczyna tkwi w bodźcach stresowych, do których zalicza się niedobór glukozy, zaburzenia homeostazy redoks oraz poziomu wapnia. Głównym bodźcem stresogennym prowadzącym do rozwoju choroby nowotworowej jest hipoksja wywołująca aktywację komórkowych szlaków odpowiedzi ściśle związanych z zmianami w ekspresji genów.

Przewidujemy, że wykorzystanie niskocząsteczkowych inhibitorów kinazy PERK może przyczynić się do pokonania obecnych problemów związanych z nieefektywnym leczeniem nowotworów. W warunkach hipoksji komórki nowotworowe w porównaniu z komórkami prawidłowymi znacząco ograniczają procesy wymagające nakładu tlenu oraz energii. Przyczyna tych różnic tkwi w procesach adaptacyjnych komórek nowotworowych umożliwiającym im przeżycie w stresowych warunkach hipoksji. Niski poziom tlenu indukuje stres retikulum endoplazmatycznego (ER), który prowadzi do aktywacji jednego z transmembranowych receptorów ER – PERK. W rezultacie dochodzi do aktywacji szlaku Adaptacyjnej Odpowiedzi na Stres (ang. *Unfolded Protein Response* - UPR). Istnieje wiele dowodów, że kaskada sygnałowa UPR posiada podwójną rolę. Z jednej strony zachodzi fosforylacja jednego z czynników inicjacyjnych translacji eIF2 α . Ta znacząca dla komórek nowotworowych modyfikacja warunkuje wyciszenie translacji głównych białek w komórce. Ponadto dochodzi również do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie wzrostu (G1). Z kolei, w warunkach przedłużających się warunków stresowych ekspresja dwóch specyficznych białek ATF4 oraz CHOP zostaje zwiększona. Kluczowy dla naszych badań jest fakt, iż są one ściśle związane z aktywacją dróg apoptotycznych zależnych od ER prowadzących do śmierci komórek nowotworowych. Dotychczas niewiele badań zostało poświęconych temu paradoksowi związanemu z UPR w chorobach nowotworowych. Najnowsze dane wskazują na istnienie możliwość korelacji między dwoma zmiennymi: wysokim poziomem białka CHOP i niskim innego białka cytoplazmatycznego p21, które również może potencjalnie wykazywać podwójną rolę pro-apoptotyczną oraz pro-adaptacyjną.

Zgodnie z naszą hipotezą wykorzystanie niskocząsteczkowych inhibitorów kinazy PERK spowoduje przełączenie sygnału w warunkach stresowych z pro-adaptacyjnego na pro-apoptotyczny. Rozpoczęliśmy wstępne prace związane z proponowanym projektem. Ze względu na to, iż obecnie realizujemy inny projekt we współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Południowej Karolinie byliśmy w stanie wyselekcjonować serię nowych potencjalnych inhibitorów kinazy PERK za pomocą dokowania komputerowego oraz techniki wysoko wydajnych testów przesiewowych. Wytypowano 9 związków najbardziej specyficznych względem kinazy PERK spośród 79552, które zostały przez nas przetestowane. Planujemy przeprowadzić nasze badania na pięciu dostępnych komercyjnie liniach komórek nowotworowych: A549, BxPC3, HT29, SH-SY5Y, IMR32 poddanych działaniu tapsygarginy będącej induktorem stresu ER i odpowiedzi UPR.

Weryfikacja postawionej przez nas hipotezy obejmuje pięć głównych celów:

1. Ocena poziomu aktywności kinazy PERK poprzez ocenę poziomu fosforylacji czynnika eIF2 α przy użyciu specyficznych przeciwciał anti-phospho-eIF2 α (S51) w technice Western Blot. Użyjemy komórek poddanych działaniu tapsygarginy oraz jako próbę kontrolną komórek z delecją genu PERK (PERK^{-/-}).
2. Analiza cytotoksyczności badanych inhibitorów PERK.
3. Analiza aktywacji szlaku sygnałowego PERK/eIF2 α /ATF4 w warunkach normoksji i hipoksji. Zastosujemy metodę QPCR oraz technikę Western Blot w celu oceny ekspresji i poziomu fosforylacji PERK oraz eIF2 α jak również zależnej syntezy białek CHOP i ATF4 w warunkach normoksji i hipoksji.
4. Analiza ewentualnej korelacji pomiędzy szlakami apoptotycznymi PERK/eIF2 α /ATF4 oraz p53/p21 poprzez manipulacje poziomem ekspresji białka p21.
5. Analiza poziomu apoptozy oraz cyklu komórkowego w komórkach za pomocą DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System w stanie normoksji i hipoksji, traktowanych inhibitorami w stosunku do komórek kontrolnych nie taktowanych inhibitorami PERK.

Zgłaszany projekt jest jednym z pierwszych, które może dać odpowiedź na pytanie w jaki sposób pokonać wady obecnych terapii przeciwnowotworowych. Przewidujemy, że wykorzystanie niskocząsteczkowych inhibitorów kinazy PERK jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych może zapewnić efektywną eliminację komórek nowotworowych, a w rezultacie przyczynić się do wynalezienia nowatorskiej, celowanej strategii przeciwnowotworowej oraz uwolnienia wielu ludzi od śmierci.