

Zachorowalność na nowotwory to globalny problem krajów na całym świecie. Według zespołu naukowego Health Merics and Evaluation w 2013 roku wykryto 14,8 mln nowych przypadków nowotworów i oszacowano liczbę zgonów z powodu choroby nowotworowej na 8,2 mln. Wśród mężczyzn najczęściej występującym nowotworem jest rak prostaty (1,4 mln przypadków), natomiast wśród kobiet rak piersi (1,8 mln przypadków). Niepokojącym zjawiskiem jest bardzo duży wzrost zachorowalności na różnego typu nowotwory. W latach 1990-2012 wzrost rozpoznanych przypadków raka prostaty wzrósł o 300%, raka piersi o 200%, raka jelita grubego o 92%, raka wątroby o 70% i raka żołądka o 23%. W dzisiejszych czasach choroby nowotworowe zajmują drugie miejsce wśród przyczyn zgonów na świecie po chorobach sercowo-naczyniowych. Szacuje się, że do 2020 roku liczba wykrywanych przypadków ludzi z chorobą nowotworową osiągnie liczbę 17 mln. W krajach rozwiniętych śmiertelność w przypadku nowotworów maleje, co daje nadzieję, że większy dostęp do nowoczesnych terapii wydłuży życie.

Komórka nowotworowa do rozwoju, podziałów i rozprzestrzeniania się potrzebuje zmiany całego metabolizmu. Najważniejszymi cechami komórki nowotworowej są: niezależne sygnały powodujące wzrost, brak reakcji na sygnały wzrostu pochodzące z organizmu, brak zaprogramowanej śmierci komórki (apoptozy), powstawanie nowych naczyń krwionośnych (angiogeneza), inwazja tkanek (przerzutowanie), nieśmiertelność. Do takich daleko idących zmian w komórce potrzebne są zmiany jakościowe i ilościowe białek. Dane literaturowe pokazują, że zmiany w komórce nowotworowej mają podłoże w zaburzeniu alternatywnego składania genów.

Człowiek posiada około 26 tysięcy genów, a liczba białek w komórce szacowana jest od 250 tyś. do 1 mln. Za tak dużą różnorodność białek w stosunku do liczby genów odpowiadają procesy związane z dojrzewaniem cząsteczki pre-mRNA – głównie alternatywne składanie genów. Ludzki gen składa się z sekwencji kodującej białko i sekwencji niekodującej, w czasie standardowego (konstytutywnego) składania genów zostają wycięte rejony niekodujące i powstaje dojrzała cząsteczka mRNA (matrycowe RNA), która jest wzorem do produkcji białka. Alternatywne składanie genów polega na dodatkowym wycięciu sekwencji kodującej lub na pozostawieniu sekwencji niekodującej. Na podstawie takiego matrycowego RNA powstaje inne białko tzw. izoforma białka. Oprócz dużej różnorodności białek w komórce, dzięki temu procesowi możliwa jest produkcja białek tkankowo-specyficznych o różnych funkcjach. Dodatkowo, alternatywne składanie genów pozwala na różnicowanie się komórek i tkanek. Jedna izoforma białka może powstawać w czasie wczesnego rozwoju, gdzie komórki muszą się intensywnie dzielić, natomiast druga izoforma powstaje w dojrzałych komórkach. Prace naukowe pokazują, że w komórkach nowotworowych zostaje zaburzony wzór alternatywnego składania genów, co powoduje powstanie izoform białkowych takich jak w komórkach niedojrzałych, embrionalnych, gdzie następuje nieograniczony wzrost.

Celem przedstawionego projektu jest optymalizacja budowy dwufunkcyjnych oligonukleotydów antysensowych, do regulacji alternatywnego składania genów w komórkach nowotworowych. Dwufunkcyjne oligonukleotydy antysensowe to cząsteczki RNA o długości około 20-40 nukleotydów, składają się z dwóch części o różnych funkcjach: część regulatorowa odpowiada za oddziaływanie z białkami regulującymi proces alternatywnego składania genów, natomiast część antysensowa wiąże się do odpowiedniego fragmentu cząsteczki pre-mRNA. Dwuczęściowa budowa cząsteczki umożliwia precyzyjne wiązanie się do produktu genu (pre-mRNA), w którym chcemy regulować badany proces, zaś część regulatorowa odpowiada za wiązanie się czynników regulujących alternatywne składanie genów. Głównym celem przedstawionego projektu jest optymalizacja części regulatorowej badanej cząsteczki, która będzie polegała na wybraniu sekwencji, która specyficznie i mocno wiąże się z białkami regulującym proces alternatywnego składania genów, wyborze najodpowiedniejszej liczby powtórzeń tych sekwencji, na analizie dołączenia do sekwencji regulatorowej małych motywów strukturalnych oraz na zastąpieniu nukleotydów RNA modyfikowanymi chemicznie analogami. Dodatkowo będzie analizowana stabilność enzymatyczna badanych cząsteczek. Następnym etapem badań będzie optymalizacja pełnej długości cząsteczki dwufunkcyjnych oligonukleotydów antysensowych przy pomocy modelowej cząsteczki pre-mRNA genu PKM oraz reakcji alternatywnego składania genu *in vitro*. Zastosowanie takiego modelu pozwoli na ocenę wybranych wariantów cząsteczek na wielu płaszczynach. Ostatnim etapem badań będzie opracowanie dwufunkcyjnych oligonukleotydów antysensowych, które pozwolą na efektywną regulację alternatywnego składania w nowotworowych liniach komórkowych. Do tej części badań wybrano: 1) ludzką linię komórkową raka szyjki macicy (HeLa), w której zaburzony jest proces alternatywnego składania genu PKM, 2) ludzką linię komórkową raka okrężnicy (SW480), w której zaburzony jest proces alternatywnego składania genu Ron, 3) ludzką linię komórkową raka piersi (MCF7), w której zaburzony jest proces alternatywnego składania genu SYK.

Kompleksowe eksperymenty zaproponowane w projekcie pozwolą na konstrukcję dwufunkcyjnych oligonukleotydów antysensowych, które będą efektywnie regulować alternatywne składanie każdego genu w każdym typie komórki. Mamy nadzieję, że wyniki przedstawionych badań zainteresują szereg badaczy i będą podstawą do wykorzystania tego typu cząsteczek w nowoczesnej terapii nowotworów.