

## Określenie struktury i funkcji helikazy RECQL4 i BLM oraz wyjaśnienie roli nowoodkrytych zmian w genach kodujących te enzymy w patogenezie glejaków

Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) zastosowane w badaniach całych genomów oraz eksomów stało się w ostatnich latach doskonałym narzędziem do odkrywania znanych i nowych zmian genetycznych, które przyczyniają się do rozwoju nowotworu. Złośliwe glejaki stanowią 70-77% wszystkich guzów mózgu u dorosłych, a u dzieci są drugą po białaczkach najczęstszą przyczyną zgonów. Glejaki powstają z neuronalnych komórek macierzystych lub progenitorów glejowych. Sekwencjonowanie eksomu licznych glejaków pokazało obecność licznych mutacji. Liczba zmian genetycznych wzrasta lawinowo po radio- lub chemioterapii. Trudno wyjaśnić, jak tak duża liczba mutacji nagromadza się w komórce w trakcie życia organizmu. Mimo iż poprzednio zaburzenia genetyczne i epigenetyczne postrzegano jako oddzielne procesy, coraz więcej danych wskazuje, że mutacje w genach kodujących enzymy epigenetyczne lub białka uczestniczące w utrzymywaniu właściwej struktury chromatyny mogą prowadzić do destabilizacji genomu, upośledzenia mechanizmów naprawy DNA i nagromadzenia zaburzeń przyczyniających się do rozwoju nowotworu.

Przeprowadzając sekwencjonowanie NGS wykazaliśmy obecność dwóch nowych mutacji w genie *RECQL4* w 3 GBM oraz małą delecję w genie *BLM* w 4 GBM z 37 dotychczas zbadanych glejaków próbek; wszystkie zbadane glejaki niezłośliwe miały prawidłowy gen. Te nowe warianty występowały w eksonie 8 i 13, które kodują ważne domeny funkcjonalne białka. Helikazy DNA z rodziny RecQ są zależnymi od ATP enzymami, zachowanymi ewolucyjnie od bakterii do wyższych, uczestniczącymi w różnych mechanizmach związanych z metabolizmem DNA: replikacją DNA, rekombinacją, transkrypcją, naprawą DNA, utrzymywaniem telomerów. W komórkach ludzkich jest 5 enzymów z tej rodziny: RECQL1, BLM, WRN, RECQL4, i RECQL5, które oddziałują ze sobą, a ich rola w różnych szlakach metabolizmu DNA może być zastępcza lub komplementarna. RECQL4 uczestniczy w procesach naprawy DNA i utrzymywaniu telomerów. Defekty w genach kodujących 3 helikazy: BLM, WRN i RECQL4 występują w rzadkich chorobach Blooma i Wernera, które charakteryzują się niestabilnością chromosomową, przedwczesnym starzeniem oraz predyspozycją do nowotworów piersi i prostaty.

Proponujemy wykonanie badań, które pozwolą zrozumieć konsekwencje mutacji w genach *RECQL4* i *BLM*, umożliwią lepsze poznanie funkcji helikaz z tej rodziny w utrzymywaniu stabilności genomu, podstawowych procesach komórkowych i nowotworzeniu. W tym celu planujemy sklonowanie prawidłowej i zmutowanych form genu *RECQL4* (warianty P532S i R766Q), oczyszczenie rekombinowanych białek, ich krystalizację i zbadanie struktury przestrzennej. Rozpracowanie struktury przestrzennej ludzkiej helikazy RECQL4, zbadanie interakcji między helikazami oraz PARP1 w różnych modelach komórkowych, pozwoli na lepsze poznanie biologii komórki i procesów rozwojowych. Zamierzamy proponowane badania umożliwić także znalezienie nowych inhibitorów o działaniu przeciwnowotworowym oraz wykorzystanie zjawiska syntetycznej letalności jako potencjalnej terapii przeciwnowotworowej w glejakach złośliwych. Zamierzamy wszechstronnie scharakteryzować wpływ odkrytych mutacji w RECQL4 na procesy komórkowe wykorzystując różne modele badawcze: komórki ludzkiego glejaka w hodowli i zarodków *Xenopus* (we współpracy z **Partnerem 1** Prof. Matthew Guille, kierownikiem European *Xenopus* Resource Center. Wykorzystamy metody edytowania genomu, aby wprowadzić specyficzne mutacje w eksonie 8 i 13 *RECQL4* w komórkach glejaka i niestransformowanych astrocytach, i zbadamy wpływ tych zmian na aktywność helikazy DNA *in vivo*, replikację DNA, replikację mitochondrialnego DNA i bioenergetykę, oraz procesy naprawy DNA. Zbadamy hipotezę, że białka RECQL4 i BLM, które oddziałują między sobą i mogą wiązać białkiem naprawy DNA - PARP1, równoległe z PARP uczestniczą w procesach naprawy DNA, zatem eliminacja PARP1 lub zahamowanie jego aktywności inhibitorem (Olaparinib) może hamować wzrost komórek nowotworowych lub przywracać wrażliwość na chemioterapeutyki na zasadzie syntetycznej letalności.

Przeszukamy biblioteki inhibitorów z komercyjnej biblioteki NCBI oraz przy pomocy **Partnera 2**, Prof. Waldemar Pribe z Department of Experimental Therapeutics, University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, USA, zaprojektujemy i zsyntetyzujemy potencjalne inhibitory zmutowanego RECQL4 i BLM. Prof. Pribe od dawna zajmował się projektowaniem i syntezą inhibitorów różnych enzymów (w tym topoizomeraż) oraz białek przekazywania komórkowego kluczowego dla nowotworzenia. Stworzył w tym celu ogromne biblioteki związków o różnej strukturze, które mogą być punktem wyjścia do syntezy nowych związków o działaniu przeciwnowotworowym. Jest współtwórcą 40 patentów, a 3 opracowane przez niego związki są używane w badaniach klinicznych.

Proponowane badania pozwolą na lepsze poznanie funkcji helikaz RECQL4 i BLM w utrzymywaniu stabilności genomu, podstawowych procesach komórkowych i nowotworzeniu.