

## POPULARNONAUKOWE STRESZCZENIE PROJEKTU

W ostatnich latach dowiedziono, że gen *CRNDE* pełni rolę onkogenu w wielu nowotworach. Nasz zespół zidentyfikował i opublikował w bazie GenBank pierwsze dwa kompletne transkrypty tego genu. Wykazaliśmy też, że ich nadekspresja stanowi negatywny czynnik prognostyczny u pacjentek z rakiem jajnika. Ponadto udało nam się udowodnić, że jeden z ww. transkryptów koduje mikropeptyd CRNDEP, który wydaje się odgrywać istotną rolę w podziałach komórkowych i ulega nadekspresji w komórkach prawidłowych i nowotworowych o wysokim potencjale mitotycznym.

Głównym celem niniejszego projektu będzie przeanalizowanie pełnej sekwencji genu *CRNDE*, a także określenie stopnia metylacji jego promotora w grupie raków jajnika, dla których dostępne są szczegółowe dane kliniczno-patologiczne, jak również informacje dotyczące przeżycia pacjentek i odpowiedzi na leczenie. Ponadto planujemy oszacowanie ekspresji mikropeptydu CRNDEP w tej samej grupie raków w celu zbadania jego znaczenia prognostycznego i predykcyjnego. Chcemy też określić funkcję rzeczonoego peptydu, weryfikując uprzednio uzyskane wyniki wskazujące, iż jego silna nadekspresja w komórkach HeLa prowadzi do powstawania granul stresu, a następnie spróbować wyjaśnić mechanizm tego zjawiska.

W ramach tego projektu będą prowadzone rozległe badania molekularne na poziomie DNA i białka, uzupełnione o analizy bioinformatyczne i statystyczne. Najpierw planujemy wykonać sekwencjonowanie genu *CRNDE* z użyciem sekwenatora następnej generacji Ion S5 (Thermo Fisher Scientific) na grupie 135 mrożonych raków jajnika od pacjentek leczonych cisplatyną i cyklofosfamidem (schemat PC, N=32) lub taksanami i cisplatyną (schemat TP, N=103). W tej samej grupie guzów oznaczyliśmy uprzednio poziom transkryptów genu *CRNDE*, dowodząc, że ich nadekspresja wpływa negatywnie na przeżycie pacjentek leczonych w schemacie TP. W tym badaniu chcemy przeanalizować nie tylko sekwencję kodującą genu *CRNDE*, lecz również jego promotor, introny oraz oba regiony UTR. Warto nadmienić, że *CRNDE* dzieli swój promotor z innym genem (*IRX5*), a ostatnio wykazano, że skorelowana ekspresja obu tych onkogenów stanowi czynnik złego rokowania w raku jelita grubego. Biorąc pod uwagę te doniesienia, w naszym badaniu NGS określimy też pełną sekwencję genu *IRX5*. Oprócz oceny obecności mutacji wykonamy również analizę polimorfizmów w locus *CRNDE/IRX5*, co może dostarczyć informacji na temat zmienności liczby kopii badanych genów, a także umożliwić identyfikację haplotypów złego rokowania.

W tej samej grupie 135 raków jajnika ocenimy zmienność liczby kopii (CNV) genu *CRNDE* oraz stopień metylacji jego promotora. Analiza CNV zostanie przeprowadzona techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), powszechnie stosowaną w cytogenetyce molekularnej. Użycie tej techniki da nam możliwość bezpośredniego policzenia kopii genu *CRNDE* w jądrach interfazowych bez konieczności stosowania genów referencyjnych, które mogą wykazywać niestabilność w komórkach nowotworowych. W badaniu tym posłużymy się jednokolorową sondą FISH specyficzną dla genu *CRNDE* (Empire Genomics). Z kolei stopień metylacji promotora omawianego genu ocenimy stosując zestaw Cells-to-CpG Bisulfite Conversion Kit (Thermo Fisher Scientific), a następnie wykonując PCR na matrycy DNA po konwersji bisulfidowej oraz sekwencjonowanie metodą Sangera.

W niniejszym projekcie oszacujemy też ekspresję mikropeptydu CRNDEP w skrawkach parafinowych z 250 raków jajnika od pacjentek leczonych w schemacie TP, dla których również są dostępne pełne dane kliniczno-patologiczne oraz informacje na temat przeżycia i odpowiedzi na leczenie. Do tego celu wykorzystamy metodę pośredniego testu immunoenzymatyczny (ELISA) oraz królicze przeciwciało anti-CRNDEP (Abgent). Chcemy również podjąć próbę wyjaśnienia mechanizmu molekularnego zjawiska zaobserwowanego przez nas we wcześniejszych badaniach, polegającego na powstawaniu granul stresu w komórkach HeLa, w których wywołano silną, sztuczną nadekspresję peptydu CRNDEP w fuzji ze znacznikami EGFP, DsRed Monomer lub FLAG. Do tego celu wykorzystamy następujące linie komórkowe: HeLa, MCF-7, TOV-1, IGROV1, SKOV-3, A2780, HT-29 i HCT-116. Wybrane linie komórkowe różnią się między sobą pod względem aktywności i statusu akumulacji białka TP53, co umożliwi nam nie tylko zbadanie mechanizmu, za pośrednictwem którego wysoki poziom CRNDEP wywołuje stres oksydacyjny, ale pozwoli też na sprawdzenie, czy omawiana funkcja CRNDEP zależy od statusu białka TP53. W badaniu tym wykorzystamy dwa testy biochemiczne firmy Promega: ROS-Glo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz GSH/GSSG-Glo.

Biorąc pod uwagę liczne doniesienia naukowe na temat istotnej roli genu *CRNDE* w procesie nowotworzenia, można oczekiwać, iż szczegółowa analiza jego sekwencji połączona z poznaniem funkcji oraz klinicznego znaczenia produktów tego genu zaowocuje ich wykorzystaniem jako czułych i specyficznych markerów wczesnej diagnostyki lub markerów ułatwiających dobór najlepszej metody leczenia. Ostatecznie mogą się też one stać celami terapii molekularnej. Wyniki jednej z grup badawczych potwierdzają powyższe hipotezy, dowodząc, że poziom jednego z transkryptów genu *CRNDE* w osoczu krwi może być nowym, obiecującym biomarkerem diagnostycznym i prognostycznym w raku jelita grubego.