

### **Cel prowadzonych badań/hipoteza badawcza**

Białko p53 jest jednym z najważniejszych czynników regulujących podstawowe procesy komórkowe w odpowiedzi głównie na czynniki stresowe, obejmujące uszkodzenia DNA, hipoksję, czy też aktywację onkogeny. Odgrywa ważną podstawową rolę supresorową procesu nowotworowego, reguluje odpowiedź przeciwwirusową oraz stan zapalny komórki. Ludzkie białko p53 skupia wiele uwagi badaczy, ze względu na fakt, iż mutacje TP53 występują w ponad połowie ludzkich nowotworów, a mutacje przekazywane między rodzicami i dziećmi zwiększają ryzyko nowotworu, u kobiet do prawie 100%. Pomimo intensywnych badań, nadal istnieją nie zidentyfikowane mechanizmy zależne od p53.

Zaobserwowaliśmy, że jednoczesne traktowanie linii komórkowej nowotworu płuc (A549) dwoma substancjami: aktynomycyną D oraz nutliną-3a (A+N) wywołuje silną aktywację p53. Synergizm działania wynika z faktu, iż aktynomycyna D wpływa na fosforylację p53 w miejscu przyczyniającym się do jego aktywacji, a nutlina – 3a blokuje negatywny regulator białka p53 co dodatkowo sprzyja fosforylacji. Jednym z genów stymulowany przez podanie zaproponowanej kombinacji substancji jest gen TREM2. Polimorfizmy i mutacje w obrębie TREM2 przyczyniają się do rozwoju choroby Alzheimera i innych chorób neurodegeneracyjnych oraz mogą korelować z inwazyjnością komórki nowotworowej.

Analizując biochemiczne i biologiczne właściwości znanych kinaz, które mogą odpowiadać za indukcję aktywności p53 zaproponowaliśmy hipotezę, dotyczącą wpływu kinazy syntazy glikogenu (GSK-3). Enzym ten, jest niezbędny w metabolizmie i wielu procesach komórkowych oraz występuje w dwóch izoformach GSK-3 $\alpha$  i GSK-3 $\beta$ , kodowanych przez dwa odrębne geny (*GSK-3A* i *GSK-3B*). Stosując swoisty inhibitor GSK-3 (CHIR-98014) zaobserwowaliśmy zmniejszenie fosforylacji p53 oraz zahamowanie aktywacji niektórych genów zależnych od analizowanego białka w tym genu *TREM2*. W podjętym projekcie planujemy sprawdzić, która z izoform GSK-3 aktywuje p53 w wyniku traktowania A+N. Eksperyment będziemy prowadzić z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej prowadzących do wyciszenia aktywności genu. Następnie chcemy sprawdzić, które z genów są wrażliwe na hamujący wpływ CHIR-98014 w stosunku do aktywacji p53. Kolejno planujemy sprawdzić jaki wpływ na procesy komórkowe będzie miało wyciszenie *GSK-3A*, *GSK-3B* oraz *TREM2*. Przepuszczamy, że traktowanie A+N i/ lub CHIR-98014 może uwrażliwiać komórki na działanie receptorów śmierci apoptotycznej.

### **Zastosowana metoda badawcza/metodyka**

Pierwsza część projektu będzie opierała się na analizie ekspresji genów metodą sekwencjonowania transkryptomu (RNA-Seq) w komórkach nowotworu płuca A549 nie poddanych działaniu stresowi (kontrola) oraz eksponowanych przez 30 godzin na A+N, A+N wraz z CHIR-98014 oraz komórkach poddanych działaniu samego inhibitora. Zmiany ekspresji genów zostaną porównane metodami bioinformatycznymi pomiędzy poszczególnymi warunkami eksperymentalnymi (6 porównań). Sekwencjonowanie oraz podstawowa analiza bioinformatyczna zostaną zlecone wyspecjalizowanej firmie zewnętrznej. W ten sposób zidentyfikujemy geny, których aktywacja wywołana A+N jest osłabiana przez inhibitor GSK-3 (CHIR-98014). Wyciszenie genów (knock-down) zostanie przeprowadzone przy pomocy komercyjnie dostępnych lentiwirusów produkujących wyciszające cząsteczki shRNA. Linia A549 z wyciszonym TREM2 jest w naszej dyspozycji. Zmiany ekspresji genów zidentyfikowanych metodą RNA-Seq potwierdzane metodą ilościowej reakcji RT-PCR, natomiast ilość białek kodowanych przez wybrane geny a także stopień fosforylacji p53 będą analizowane poprzez elektroforezę połączoną z immunodetekcją na błonie (ang. *Western blotting*). Inne testy biologiczne takie jak wykrywanie apoptozy, analiza cyklu komórkowego, badanie tempa proliferacji itp. będą wykonywane wg rutynowych procedur z wykorzystaniem, m.in. cytometrii przepływowej. Główne konkluzje zostaną zweryfikowane w oparciu o inne typy linii komórkowych, aby przekonać się, czy uzyskane wnioski mają bardziej uniwersalne zastosowanie.

### **Wpływ spodziewanych rezultatów na rozwój nauki**

Najważniejszym rezultatem projektu będzie lepsze zrozumienie funkcjonalnego związku pomiędzy białkiem p53 a szlakiem zależnym od białka TREM2, które uczestniczy w regulacji stanu zapalnego oraz przeciwdziała śmierci komórek. Nierównowaga tego procesu jest przyczyną śmiertelności związanej z nowotworami, chorobami neurodegeneracyjnymi i niektórymi infekcjami. Zrozumiemy również lepiej działanie kinazy GSK-3 uczestniczącej w regulacji zadziwiająco wielu szlaków sygnalizacyjnych. Mimo, że nasz model badawczy nie dotyczy bezpośrednio choroby Alzheimera, lepsze zrozumienie regulacji ekspresji TREM2 może rzucić nowe światło na genezę tego schorzenia, które staje się coraz większym problemem społecznym wraz ze starzeniem się populacji europejskiej.