

Popularnonaukowy opis badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej pt. „Syntetyczna letalność w komórkach nowotworowych indukowana inhibitorami białek naprawy pęknięć DNA”

Cel prowadzonych badań i uzasadnienie podjęcia tematu

Liczba odnotowywanych co roku zachorowań na nowotwory drastycznie wzrasta. Ich ogromna niejednorodność, nie tylko w obrębie grupy chorobowej, ale także w obrębie komórek samego guza, przekłada się na niską skuteczność leczenia. Rosnącym zainteresowaniem naukowców cieszy się pomysł personalizowania leczenia, czyli dostosowania go do indywidualnych cech i potrzeb chorego. Głównym celem takiego podejścia jest zwiększenie specyficzności i wydajności leczenia oraz pominięcie testowania u chorego leków, które mogą być nieskuteczne i pogarszają jego rekonwalescencję. Jednym z narzędzi spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej jest syntetyczna letalność, która definiowana jest jako równoczesne zaburzenia dwóch (lub więcej) genów, prowadzące do śmierci komórki, podczas gdy zaburzenia w każdym z genów występujące pojedynczo, nie wpływają na przeżywalność komórki. Idea opiera się na utracie funkcji genu, który uczestniczy w szlaku istotnym dla przeżycia komórki (np. naprawa DNA). Efekt ten, kompensowany będzie przez działanie genu uczestniczącego w szlaku alternatywnym. Tutaj naukowcy zauważyli możliwość dla nowatorskiej terapii przeciwnowotworowej. W momencie, gdy z wykorzystaniem inhibitora zablokujemy produkt genu kluczowego dla szlaku „alternatywnego”, komórka nowotworowa zostanie pozbawiona szlaków niezbędnych dla jej przeżycia, co zakończy się jej śmiercią.

Głównym celem projektu jest analiza związku pomiędzy syntetyczną letalnością komórek nowotworowych guzów litych wywołaną przez malocząsteczkowe inhibitory białek naprawy pęknięć DNA, a profilem ekspresji genów kodujących białka biorące udział w naprawie pęknięć DNA. Zrealizowanie go może być zarówno źródłem informacji na temat syntetycznej letalności i biologii molekularnej nowotworów, jak i umożliwi stworzenie bazy korelującej profil ekspresji genów naprawy pęknięć DNA z odpowiednią na zastosowany związek. Podstawy teoretyczne oraz doniesienia literaturowe pozwalają nam domniemywać, że odpowiednie dobranie inhibitorów białek naprawy pęknięć DNA w celu wywołania syntetycznej letalności w komórkach nowotworowych, z obniżonym poziomem istotnych białek szlaków naprawy, pozwoli na ich selektywną eliminację z wykorzystaniem związków wprowadzających uszkodzenia do DNA. Uzyskane wyniki pozwolą na lepsze zrozumienie biologii nowotworów i zależności zachodzących w ich szlakach naprawy. Badania realizowane w ramach pracy doktorskiej obejmują badania podstawowe, które mają jednak potencjał aplikacyjny w bardziej odległej przyszłości.

Metody badawcze

Badania prowadzone są na hodowlach komórek źle prognozujących guzów litych wyprowadzonych od pacjentów. Analizę przeprowadzono już na komórkach czerniaka i glejaka wielopostaciowego. Obecnie praca skupia się na skorelowaniu profilu ekspresji białek naprawy pęknięć DSB (na poziomie genu – metodą RTPCR i białka – metodą Western Blot) i odpowiedzi komórek nowotworu trzustki na zastosowanie inhibitora PARP1 lub inhibitora RAD52 samodzielnie lub w terapii kombinowanej ze związkiem alkilującym. Odpowiedź komórek na zastosowane związki analizowana jest na wielu płaszczyznach:

- Przeżywalność komórek z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Analizowane jest również czy śmierć komórek zachodzi na drodze apoptozy czy też nekrozy,
- Zmiany w rozproszeniu komórek w kolejnych fazach cyklu komórkowego po zastosowaniu związków,
- Neutralny test kometowy i analiza liczby komórek γ H2A.X-pozytywnych - marker pęknięć dwuniciowych i przebiegającej ich naprawy,
- Analiza zdolności komórek do proliferacji po zastosowaniu badanych związków. Wykorzystanie zdolności komórek nowotworowych do wzrostu w miękkim agarze (clonogenic assay),
- Współpraca z ośrodkiem zagranicznym pozwoli mi na potwierdzenie założeń projektu poprzez wyciszenie ekspresji RAD52 i PARP1 w badanych komórkach wykorzystując siRNA oraz otrzymanie komórek z nokautem tych genów po zastosowaniu metody CRISPR/Cas9.

Otrzymane wyniki odniesione zostaną do komórek prawidłowych stanowiących kontrolę dla wybranych nowotworów.