

Cel projektu i hipotezy. Przeciwnowotworowe białko p53 jest znane z regulacji cyklu komórkowego i aktywacji apoptozy. Jego wpływ na odporność wrodzoną jest bardzo słabo zbadany. Nasz projekt opiera się na hipotezie zgodnie z którą równoczesne traktowanie komórek aktywnym D i nutliną-3a (A+N, eksperymentalna kombinacja leków) silnie aktywuje pokaźny odsetek genów regulowanych przez białko p53, które to geny są słabo aktywowane w innych, powszechnie używanych, warunkach eksperymentów. Stwarza to niepowtarzalną okazję do identyfikacji nieznanych wcześniej genów podlegających regulacji ze strony białka p53. Dokładna wiedza na temat mechanizmów destrukcji komórek złośliwych przez układ odpornościowy ma kluczowe znaczenie w rozwoju immunoterapii nowotworów. W badaniach wstępnych zaobserwowaliśmy co najmniej 10-krotny wzrost aktywności bardzo wielu genów w komórkach A549 (rak płuca) poddanych działaniu A+N lub działaniu kamptotecyny (CPT), która jest lekiem przeciwnowotworowym oraz innym silnym aktywatorem p53. Duży odsetek tych genów koduje białka odporności wrodzonej - pierwszej linii obrony przeciw infekcjom i nowotworom. Działanie systemu polega na rozpoznaniu markera na komórkach poddanych stresowi przez wyspecjalizowane receptory, których pobudzenie wywołuje reakcję obronną organizmu. Kluczowym elementem odporności wrodzonej są limfocyty zwane naturalnymi zabójcami lub komórkami NK (ang. *natural killers*). Posiadają one zdolność niszczenia komórek nowotworowych lub zainfekowanych wirusem. Na powierzchni komórek NK występują aktywujące receptory mające zdolność rozpoznawania aktywujących markerów występujących na komórkach przeznaczonych do zniszczenia ze względu na toczący się w nich proces chorobowy. Po rozpoznaniu aktywujących markerów na komórce docelowej, komórki NK niszczą ją. Nasze badania wykazały, że CPT oraz A+N spowodowały w kilku liniach komórkowych pochodzenia nowotworowego gwałtowny (nawet 100-krotny) wzrost aktywności genu *SLAMF7* kodującego marker na powierzchni komórek nowotworowych aktywujący cytotoksyczne działanie komórek NK. Ogólnym celem projektu jest identyfikacja nieznanych wcześniej genów regulowanych przez p53 i wstępna biologiczna charakterystyka tych spośród nich, które są bardzo słabo zbadane (np. *KLRG2* - wg naszej hipotezy to kolejny ligand aktywujący komórki NK). Badania rozpoczniemy od przetestowania dwóch szczegółowych hipotez. Według pierwszej z nich, cytotoksyczna aktywność leków przeciwnowotworowych odbywa się częściowo poprzez wzmacnianie ekspresji sygnałów typu "zabij mnie" (np. białka *SLAMF7*) obecnych na powierzchni komórek nowotworowych, co sprawia, że stają się one łatwym celem dla komórek NK. Według drugiej hipotezy, białko *SLAMF7* i inne ligandy typu "zabij mnie" podlegają pozytywnej regulacji ze strony aktywnego białka p53, w konsekwencji, w komórkach nowotworowych ze zmutowanym genem p53 wspomniane białka sygnałowe nie ulegają akumulacji na skutek działania leków przeciwnowotworowych i tak zmutowane komórki są mniej wrażliwe na destrukcyjne działanie limfocytów NK.

Metodologia. Planujemy sprawdzić czy geny *SLAMF7* i *KLRG2* są aktywowane przez białko p53 (zestaw analizowanych genów może ulec rozszerzeniu). W tym celu wyodrębnimy odcinki regulatorowe genów zawierające potencjalne miejsca wiązania p53 i sprawdzimy, metodą testów reporterowych, czy podlegają one aktywacji ze strony p53 wytworzonego przez plazmid ekspresyjny. Ponadto sprawdzimy, czy w komórkach z usuniętym genem p53 (metodą CRISPR/Cas9) zachodzi ekspresja badanych genów na skutek działania A+N lub kamptotecyny. W kolejnym układzie doświadczalnym, w panelu 11 nowotworowych linii komórkowych i w komórkach prawidłowych, sprawdzimy stopień aktywacji p53 i ekspresji *SLAMF7* oraz *KLRG2* w warunkach wzrostu kontrolnego oraz pod wpływem działania leków przeciwnowotworowych. Następnie, przy pomocy pomiaru aktywności enzymu uwalnianego przez umierające komórki, sprawdzimy czy linie komórek nowotworowych różnią się wrażliwością na toksyczne działanie modelowych komórek NK (linia NK-92), czy działanie chemioterapeutyków uwrażliwia wybrane linie komórek nowotworowych na działanie komórek NK-92 oraz czy usunięcie genów *SLAMF7*, *KLRG2* lub p53 w wybranych liniach komórek nowotworowych zmniejsza ich podatność na cytotoksyczne działanie limfocytów NK.

Wpływ na rozwój dziedziny. Rezultaty wpłyną na dynamicznie rozwijającą się dziedzinę badań jaką jest immunoterapia nowotworów. Konkretnie, wyniki pomogą lepiej zrozumieć słabo zbadany mechanizm pośredniego niszczenia komórek nowotworowych przez p53 za pomocą zwiększenia produkcji białek piętnujących komórki nowotworowe do rozkładu przez komórki NK. Komórki nowotworowe unikają rozpoznania przez układ odpornościowy między innymi poprzez wygaszanie genów produkujących markery destrukcji. Wznowienie ich produkcji, między innymi za pomocą substancji stosowanych w chemioterapii, lub nowych czynników terapeutycznych, jest strategicznym celem eksperymentalnych metod leczniczych wykorzystujących komórki NK. Ponadto, nasz projekt pomoże lepiej zrozumieć działanie przeciwnowotworowego białka p53, które ciągle ukrywa przed nami wiele tajemnic.