

Wiedza na temat biologii nowotworów jest wciąż na niezadowalającym poziomie, co przekłada się na niesprecyzowane i nieskuteczne terapie zwalczające tego typu schorzenia. Spersonalizowana terapia przeciwnowotworowa może pozwolić na zwiększenie efektywności terapii oraz na zmniejszenie jej efektów ubocznych do minimum. Jednym z perspektywicznych podejść jest spersonalizowana terapia przeciwnowotworowa oparta na mechanizmie syntetycznej letalności (SL). SL jest definiowana jako genetyczna kombinacja mutacji w dwu, bądź więcej genach prowadząca do śmierci komórki, podczas gdy mutacja w każdym z genów z osobna nie powoduje tego efektu. W tym schemacie w komórce utrata genu uczestniczącego w ważnym dla tej komórki procesie metabolicznym, pozwalającym na jej przeżycie jest kompensowana przez działanie innego genu uczestniczącego w szlaku alternatywnym dla tego procesu. W komórce nowotworowej, gdzie utrata jednego z tych genów jest wielce prawdopodobna ze względu na ogrom różnego rodzaju rearanżacji w genomie tych komórek powoduje, że jej przeżycie zależy od tego alternatywnego genu. Ten drugi gen jest celem dla inhibitorów. Wyłączenie tego alternatywnego genu przez zastosowanie inhibitora jest celem dla nowatorskich terapii przeciwnowotworowych. Nowotwory posiadają często defekty w naprawie DNA, co sugeruje że zahamowanie ich alternatywnych szlaków naprawy DNA może doprowadzić do ich uśmiercenia z wykorzystaniem zjawiska SL. Jest wiele szlaków naprawy DNA, w których jeden zastępuje drugi np. naprawa przez homologiczną rekombinację (HRR) może być kompensowana przez niehomologiczne łączenie końców (NHEJ). Oba te typy naprawy są mechanizmami składającymi się na naprawę pęknięć dwuniciowych DNA (DSB). W komórkach proliferujących DSB są najbardziej śmiertelnymi uszkodzeniami DNA, zwykle naprawianymi przez dwa główne mechanizmy naprawy oparte o szlak HRR zależny od białek BRCA1/BRCA2-RAD51 (BRCA) oraz (D-NHEJ) oparty o białko DNA PK-CS, natomiast zależny od białka PARP1- szlak NHEJ (B-NHEJ) służy jako alternatywny mechanizm naprawy. HRR zwykle jest zależny od szlaku poprzez białka BRCA, zaś szlak poprzez białka RAD52-RAD51 jest alternatywą dla komórek nowotworowych. Celowanie w białko RAD52 w komórkach nowotworowych defektywnych w głównym szlaku, powinno wyeliminować te komórki na drodze SL. Również PARP1 wywiera istotny wpływ na tempo naprawy DSB, ponieważ jest to białko, które wiąże się zarówno jedno- i dwuniciowe pęknięciami DNA, a później modyfikuje białka biorące udział w ich naprawie. Ze względu na SL, inhibitory PARP1 jak Olaparib, mogą być bardzo skutecznymi lekami dla pacjentów, u których guzy mają zarodkowe lub somatyczne defekty w genach uszkodzeń i naprawy DNA. Ostatnie badania wykazały, że POLQ staje się niezbędny w komórkach z niedoborem czynników ułatwiających kanoniczny mechanizm naprawy DSB (BRCA1, BRCA2, Ku70), co wskazuje na funkcję tworzenia kopii zapasowych procesów naprawy DNA zależnych od POLQ. Odkrycie to doprowadziło do wzrostu zainteresowania produktem genu POLQ, białkiem polimerazą DNA θ (Pol θ) jako nowym celem terapeutycznym. Teraz nowe geny zaangażowane w naprawę uszkodzeń DNA, utrzymanie struktury chromatyny i metabolizm DNA są identyfikowane jako partnerzy syntetycznej śmiertelności Pol θ . W naszym projekcie planujemy wykorzystać syntetyczną letalność (SL) i podwójną syntetyczną letalność (DSL), aby wyeliminować pierwotne komórki rakowe z niedoborem naprawy DSB. Według bazy danych TCGA glejak, czerniak i komórki raka trzustki wyrażają zwiększone poziomy mRNA POLQ w porównaniu do normalnych odpowiedników. W naszym projekcie planujemy ustalić, czy przeżycie danej pierwotnej linii komórek nowotworowych niosących określony niedobór naprawy DSB zależy od MMEJ (łączenie końców z wykorzystaniem mikrohomologii), w którym pośredniczy Pol θ . Oczekuje się, że farmakologiczne hamowanie Pol θ będzie selektywnie zabijać komórki nowotworowe, które zależą od MMEJ, w którym pośredniczy Pol θ . Ponadto ostatnie badania sugerują, że mutacje wtórne przywracające funkcję BRCA1 / 2 są powodowane przez aktywność MMEJ, w której pośredniczy Pol θ , a hamowanie Pol θ może zapobiegać rozwojowi oporności PARPi. Badania będą prowadzone w 4 etapach. W pierwszym etapie planujemy ustanowienie pierwotnych linii komórek nowotworowych wyprowadzonych z próbek guzów pacjentów ze zdiagnozowanym czerniakiem, glejakiem i rakiem trzustki. W etapie 2 ustanowione linie komórkowe i próbki guzów zostaną poddane profilowaniu składników naprawy DSB. Przeanalizujemy ekspresję genów i białek czynników uczestniczących w mechanizmach naprawy DSB, co pozwoli nam zidentyfikować komórki z niedoborem naprawy i komórki wydajną naprawą DSB. W etapie 3 planujemy traktować komórki prawidłowe, jak i pierwotne linie komórek nowotworowych za pomocą specjalnie wybranego inhibitora naprawy DSB do stosowania samodzielnie lub w połączeniu ze standardowym lekiem cytotoksycznym stosowanym w leczeniu danego rodzaju nowotworu. Proponujemy, aby wybierając konkretny koktajl / związek cytotoksyczny, będziemy mogli wywołać syntetyczną letalność i podwójną syntetyczną letalność w komórkach nowotworowych bez eliminacji komórek prawidłowych. Na tym etapie przetestujemy również naszą hipotezę za pomocą narzędzi genetycznych (w tym wyciszenia shRNA Pol θ). Etap III koncentruje się na także na identyfikacji szlaków, których braki są syntetycznie letalne dla komórek z niedoborem Pol θ . Planujemy użyć CRISPR / Cas9 i plazmidów niosących dominujący negatywny mutant, aby wygenerować linie komórek nowotworowych Pol θ Low z niedoborem różnych mechanizmów naprawy DSB. Planujemy przeanalizować różne aspekty odpowiedzi komórkowej po traktowaniu związkami cytotoksycznymi. W etapie 4 planujemy wszczepienie linii komórek nowotworowych z niedoborem oraz z wydajną naprawą DSB pochodzących od pacjenta (2 każdego typu nowotworu) do mysiego modelu NSG.

Oczekuje się, że badania te zwiększą wiedzę o biologii nowotworów, w oparciu o mechanizmy naprawy DNA. Korelowanie profilu genów naprawy DSB, w różnych typach nowotworów, z odpowiedzią komórek na działanie różnego typu inhibitorów białek naprawy DNA, powodującą śmierć komórek nowotworowych poprzez SL, może pozwolić na lepsze zrozumienie mechanizmów tego procesu. Dodatkowo stworzenie swoistej biblioteki profili składników naprawy DNA, skojarzonych z hamującym działaniem związków chemicznych na wzrost i rozwój komórek nowotworowych różnych typów guzów złośliwych, może w przyszłości pozwolić na wykorzystanie tego modelu w spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej, co jest celem perspektywicznym tych badań.