

Mimo ciągłego udoskonalania metod diagnostyki i leczenia choroby nowotworowe nadal stanowią według danych WHO jedną z głównych przyczyn zgonów w krajach rozwiniętych, w tym w Polsce. Do najczęstszych należą nowotwory płuca, jelita i trzustki. Istnieje zatem potrzeba dalszych badań dążących do poznania mechanizmów powstawania nowotworów i projektowania nowych metod terapii. **Celem projektu jest zbadanie mechanizmu regulacji alternatywnego splicingu mRNA przez zmutowane p53 w nowotworach płuca, jelita, trzustki oraz głowy i szyi, a następnie wykorzystanie tej wiedzy do zaprojektowania i przetestowania nowych kombinacji leków.**

Gen *TP53*, kodujący białko p53, jest jednym z kluczowych genów w procesie nowotworzenia. Jego podstawową funkcją jest zapobieganie nowotworom. Mutacje zmiany sensu, które występują u ok. 30% pacjentów, powodują takie zmiany w białku p53, że nie tylko traci ono funkcje supresorowe, ale też uzyskuje nowe właściwości przyspieszające rozwój nowotworów. Takie zmutowane formy białka p53 określane są mianem „gain-of-function” (ang. nabycie funkcji) i zaangażowane są we wszystkie procesy związane z onkogenezą m.in. tworzenie przerzutów, oporność na chemioterapię, przyspieszona proliferacja komórek. Najnowsze badania wykorzystujące wysokoprzepustowe metody sekwencjonowania RNA (RNA-Seq) i mikromacierze wskazują, że zmutowane formy p53 są zaangażowane w alternatywny splicing mRNA – proces umożliwiający powstawanie różnych izoform białka z tego samego genu. Izofomy te mogą różnić się właściwościami – jedne mogą być pro-nowotworowe, podczas gdy inne anty-nowotworowe. Lider projektu opublikował wyniki wykazujące po raz pierwszy, że zmutowane p53 wpływa na alternatywny splicing w raku piersi. Odkrycie to zostało poparte pracami innego zespołu, pokazującymi rolę zmutowanego p53 w regulacji splicingu w raku trzustki. Jednak badania te zostały przeprowadzone z wykorzystaniem różnej metodologii, a każde z nich koncentruje się na jednym typie raka. Istnieje zatem potrzeba pogłębionych studiów, które w sposób systematyczny z użyciem wystandaryzowanych metod wyjaśniłyby rolę mutantów p53 w regulacji splicingu mRNA w różnych nowotworach.

Wstępne wyniki, które uzyskaliśmy w liniach komórkowych raka płuca i raka piersi posiadających mutację w genie *TP53*, potwierdziły hipotezę, że zmutowane białko p53 wpływa na profil alternatywnego splicingu w badanych nowotworach. Stosując narzędzia bioinformatyczne ustaliliśmy, że geny podlegające alternatywnemu splicingowi pod wpływem mutantów p53 są zaangażowane w wiele szlaków molekularnych np. ekspresja genów, metabolizm RNA, które mogą mieć znaczenie w rozwoju nowotworów. Porównanie poziomu ekspresji genów, których splicing uległ zmianie pod wpływem wyciszenia zmutowanego *TP53*, do próbek kontrolnych, pokazało, że na ogół mutanty p53 nie powodują obniżenia ekspresji badanych genów. Sugeruje to, że powstające izofomy białek mogą pełnić ważną rolę w procesie nowotworzenia. Potwierdzeniem tego jest gen *KLF6*, którego zmieniony splicing wykryliśmy w obu badanych liniach komórkowych. Wiadomo z literatury, że izofomy białka *KLF6* dominujące w nowotworach pobudzają proliferację i przerzutowanie komórek rakowych. Zestawienie danych uzyskanych w liniach komórkowych raka piersi i płuca, pokazało, że zmiany w splicingu pewnej grupy genów były wspólne dla obu nowotworów. Takie geny są szczególnie interesujące, gdyż wskazują na wspólny dla obu nowotworów mechanizm, który może być podstawą do projektowania nowych terapii.

W proponowanym projekcie dane RNA-Seq uzyskane w liniach komórkowych raka płuca i jelita w toku trwających w laboratorium badań, zostaną zestawione z nowymi danymi, które zostaną otrzymane dla linii komórkowych raka trzustki oraz głowy i szyi posiadających mutację w *TP53*, po wyciszeniu tego genu metodą CRISPR-Cas9. Dane te zostaną poszerzone o wyniki RNA-Seq uzyskane z linii komórkowych wytworzonych metodą CRISPR-Cas9 na bazie fibroblastów z wprowadzonymi mutacjami w *TP53*, takimi samymi jak te obecne w komórkach nowotworowych. Za pomocą narzędzi bioinformatycznych wszystkie dane zostaną nałożone tak, aby wskazać geny, których mRNA podlegają alternatywnemu splicingowi we wszystkich bądź w kilku typach nowotworów. Uzyskane wyniki zostaną potwierdzone z wykorzystaniem linii komórkowych oraz tkanek pobranych od pacjentów, poprzez porównanie poziomu ekspresji alternatywnych mRNA w tkance normalnej i nowotworowej. Następnie zostanie przeprowadzona analiza tych genów pod kątem szlaków molekularnych i procesów biologicznych, w które będą zaangażowane. Wybrane geny zaangażowane w procesy ważne w onkogenezie i wspólne dla wszystkich badanych nowotworów zostaną zbadane pod kątem funkcji pełnionych przez poszczególne izofomy kodowanych przez nie białek. Zbadany zostanie również mechanizm wykorzystywany przez mutanty p53 do kontrolowania splicingu mRNA. Wyniki tych badań zostaną wykorzystane do zaprojektowania i przetestowania *in vitro* na liniach komórkowych i organoidach nowych metod terapii. Organoidy hodujemy w laboratorium z tkanek nowotworowych i normalnych pobranych od pacjentów. Pozwalają one na testowanie leków w hodowli 3D, która lepiej odzwierciedla wzrost komórek w żywym organizmie. Badania te są wstępem do planowanych w kolejnych projektach badań *in vivo*.