

Identyfikacja nowych genów regulowanych przez przeciwnowotworowe białko p53

Słowa kluczowe: białko p53, komórka nowotworowa, szlaki sygnalizacyjne

TP53 jest najczęściej zmutowanym genem w ludzkich nowotworach, a kodowane przez niego białko p53 jest regulatorem transkrypcji aktywowanym różnymi czynnikami stresu. Zauważono, że dwie substancje, aktynomycyna D i nutlina-3a, stymulujące p53 w odmienny sposób, w momencie jednoczesnego działania (A+N) powodują synergistyczną aktywację p53, a w konsekwencji silny wzrost ekspresji wielu genów regulowanych przez to białko. Synergizm działania tych związków wynika prawdopodobnie z faktu, że aktynomycyna D pobudza kinazy fosforylujące p53, a nutlina-3a, blokując negatywny regulator p53 – MDM2, umożliwia aktywnym kinazom łatwy dostęp do badanego białka. Na podstawie wyników sekwencjonowania transkryptomu (RNA-seq) komórek A549 eksponowanych na A+N, zidentyfikowano bardzo silny wzrost ekspresji setek genów, z których tylko część to znane cele p53. Prawdopodobnie istnieje jeszcze wiele niezbadanych, ale istotnych funkcji biologicznych białka p53. Stosowany sposób aktywacji p53 poprzez kombinację A+N, pozwala opisywanemu czynnikowi transkrypcyjnemu aktywować geny, na których ekspresję nie ma wpływu w innych warunkach stresu.

Pierwszym celem pracy doktorskiej była identyfikacja nowych powiązań *TP53* z innymi, wybranymi genami. Opierając się na uzyskanych obserwacjach oraz na podstawie dostępnych baz danych dotyczących miejsca wiązania p53 w obrębie chromatyny (dane ChIP-Seq), wytypowano 12 genów (*TMEM52*, *CTSH*, *DRAXIN*, *FRMD8*, *RETSAT*, *CDH3*, *FAM13C*, *FBXO2*, *KANK3*, *BLNK*, *MR1*, czy też *FRZB*) do szczegółowej analizy zależności od p53. Przy wyborze kierowano się następującymi kryteriami: znaczącym wzrostem ekspresji stymulowanej przez A+N, w co najmniej dwóch typach komórek, obecnością potencjalnego miejsca wiązania p53 w pobliżu miejsca startu transkrypcji, brakiem lub znikomą ilością danych literaturowych wiążących gen z regulacją ze strony *TP53*. Wybrane geny znane są jako regulatory m.in. metabolizmu, cytoszkieletu i szlaku Wnt, mechanizmów układu odpornościowego, czy też procesów związanych z funkcjonowaniem układu nerwowego. Ponadto wytypowano 6 genów (*DDIT3*, *TYSND1*, *IL-7*, *IFIT2*, *APOE* oraz *IRF1*) do wstępnej oceny pod kątem zależności od *TP53*. Promotory genów z potencjalnymi miejscami wiązania p53 wybrane do szczegółowej analizy były klonowane przy użyciu rutynowych metod biologii molekularnej. Regulacja ze strony p53 była oceniana za pomocą testów lucyferazowych oraz sterowanej mutagenyzy potencjalnych miejsc wiązania badanego białka dla dwóch najsilniej aktywowanych promotorów genów tj. *BLNK* i *FAM13C*. Zmiany ekspresji genów były zidentyfikowane metodą sekwencjonowania transkryptomu (RNA-Seq), a następnie potwierdzone za pomocą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR) w tym samym układzie eksperymentalnym, a także z wykorzystaniem posiadanych komórek z obniżoną ekspresją *TP53* otrzymanych za pomocą systemu lentiwirusowego (shRNA) oraz komórek uzyskanych z wykorzystaniem metody CRISPR/Cas9 w ramach niniejszego projektu. Badania zostały uzupełnione

weryfikacją otrzymanych wyników poprzez zastosowanie innej linii komórek nowotworowych NCI-H460. Analiza na poziomie proteomu została przeprowadzona za pomocą spektrometrii mas (LC-MS/MS) oraz metody Western blot (jeśli było dostępne przeciwciało) używając dwóch linii komórek nowotworowych, komórek z deficytem p53 oraz prawidłowych ludzkich fibroblastów.

Zaproponowany mechanizm aktywacji białka p53 z wykorzystaniem A+N jest słabo poznany. Drugim zadaniem pracy doktorskiej było podjęcie próby zidentyfikowania enzymu, zaangażowanego w fosforylację p53 w warunkach traktowania A+N. Analizując biochemiczne i biologiczne właściwości znanych kinaz, które mogą być odpowiedzialne za aktywację białka p53, zaproponowano hipotezę, że tym enzymem jest jedna z izoform kinazy GSK3 (GSK3A lub GSK3B). W celu przetestowania tej koncepcji zastosowano swoisty inhibitor GSK3 o nazwie CHIR-98014 (CHIR). By zbadać wpływ na aktywację genów wywołaną A+N przeprowadzono RNA-seq komórek kontrolnych, eksponowanych na A+N, na A+N w obecności CHIR oraz na CHIR bez dodatkowych czynników. CHIR powodował spadek fosforylacji p53 wywołanej działaniem A+N, co wskazywało, że inhibitor ma potencjał do osłabiania aktywacji tego białka. Analiza wyników sekwencjonowania transkryptomu wykazała istnienie trzech klas genów aktywowanych przez A+N. Jedna z grup obejmowała geny, na które CHIR nie wywierał wpływu. Kolejny zbiór zawierał geny, których aktywacja jest blokowana częściowo. Trzecią, stosunkowo mało liczną grupę stanowiły geny, których pozytywna regulacja ekspresji przez A+N była niemal całkowicie zablokowana przez CHIR. Paradoksalnie, hamując proapoptotyczne białko p53, zastosowany inhibitor w kombinacji z A+N indukował apoptozę w większości komórek nowotworowych wykorzystanych w badaniach. Specyficzność działania wybranego inhibitora hamującego aktywność GSK3, została zweryfikowana poprzez uzyskanie linii komórkowych z obniżoną ekspresją GSK3A, GSK3B lub obu genów równocześnie. Wyciszenie ekspresji obu kinaz nie odzwierciedlało działania CHIR dotyczącego wpływu na poziom ekspresji wybranych genów oraz indukcji procesu apoptozy. Wyciągnięto na tej podstawie wniosek, że obserwowane działanie inhibitora na ekspresję genów i apoptozę odbywa się niezależnie od hamowania GSK3. Testując inne inhibitory wykryto, że efekt podobny do wpływu CHIR powodowały związki, które potencjalnie hamują cyklino- zależną kinazę 7 (CDK7), jednak bez badań wykorzystujących komórki z wyciszoną ekspresją genu nie można jednoznacznie wnioskować o udziale tej kinazy w regulacji p53 w warunkach ekspozycji na A+N.

Kluczowym rezultatem projektu doktorskiego jest poznanie nowych mechanizmów oraz lepsze zrozumienie znanych już ścieżek sygnalizacyjnych kontrolowanych przez białko p53 w komórce nowotworowej. Uzyskane wyniki podkreślają znaczenie TP53, nie tylko w powiązaniu z cyklem oraz śmiercią komórkową, ale także ze szlakiem Wnt, odpornością wrodzoną komórki, metabolizmem, czy cytoszkieletem. Prowadzone badania dostarczają również informacji na temat potencjalnego mechanizmu aktywacji p53 przez A+N oraz działania inhibitora GSK3 o nazwie CHIR- 98014, który dodatkowo w kombinacji z powszechnie wykorzystywanymi w klinice aktywatorami p53 przyczynia się do uwrażliwienia komórek nowotworowych na apoptozę.

