

Identyfikacja nowych genów regulowanych przez p53 w komórkach eksponowanych na aktynomycynę D i nutlinę-3a

Streszczenie

Białko p53 wykazuje silne działanie przeciwnowotworowe, a jego gen - *TP53* jest jednym z najczęściej zmutowanych w komórkach nowotworowych. Pomimo 40 lat badań pełne spektrum jego funkcji nie jest w pełni poznane. Ostatnie doniesienia wskazują, że może wpływać na działanie układu odpornościowego poprzez regulację aktywności genów i białek zaangażowanych w jego aktywność, choć jest to bardzo słabo poznany obszar funkcjonowania białka p53.

Celem niniejszego projektu doktorskiego było zidentyfikowanie genów, kodujących białka układu odpornościowego, kontrolowanych przez p53. W innowacyjny sposób aktywowano p53 za pomocą jednoczesnego traktowania aktynomycyną D i nutliną-3a (AN). Zidentyfikowano 17 genów, których białka są mediatorami funkcji komórek immunologicznych tj. limfocytów cytotoksycznych, komórek NK (*natural killers*), makrofagów czy neutrofilów. Inne białka kodowane przez geny aktywowane pod wpływem białka p53 biorą udział w regulacji stanu zapalnego, czy są zaangażowane w szlaki interferonowe. Spośród tych 17 genów wybrano trzy (*SLAMF7*, *KLRG2* oraz *NCR3LG1*) do bardziej szczegółowych testów. Testy lucyferazowe potwierdziły silny wpływ p53 na aktywność transkrypcyjną sekwencji DNA pochodzących z genów *SLAMF7* i *KLRG2*. Skupiono się na białku *SLAMF7*, kluczowym dla aktywacji funkcji cytotoksycznych komórek NK i zbadano jego aktywację w różnych typach linii komórkowych po ekspozycji na chemioterapeutyki. Potwierdzono, że p53 wpływa na akumulację *SLAMF7* w komórkach eksponowanych na mieszaninę AN lub kamptotecynę. Odkryto także sekrecyjną formę *SLAMF7* (~50 kDa) w medium kondycjonowanym komórek traktowanych mieszaniną AN - wykrywaną dotychczas we krwi pacjentów ze szpiczakiem mnogim. Niespodziewanie, białko *SLAMF7* ulega silnej aktywacji niezależnie od białka p53 pod wpływem paklitakselu. Co więcej, mechanizm tej aktywacji sprawdzono także na liniach komórkowych o różnorodnym statusie genu *TP53*.

W początkowych etapach badań zauważono, że białko p53 aktywowane przez mieszaninę AN, może regulować odpowiedź komórek na cytotoksyczne limfocyty (w tym komórki NK) poprzez geny *TRANK1*, *TNFRSF14*, *NCR3LG1*, *SLAMF7*, *EOMES*, *ICOSLG*. Dlatego postanowiono sprawdzić, czy mieszanina AN i białko p53 mogą zwiększać wrażliwość komórek nowotworowych na niszczenie przez komórki NK. Wyniki wskazują, że komórki niedrobnokomórkowego raka płuca traktowane mieszaniną AN stają się bardziej wrażliwe na cytotoksyczne działanie komórek NK-92. Efekt ten jest wyraźniejszy w komórkach wykazujących prawidłową formę białka p53, co zaobserwowano w liniach niedrobnokomórkowego raka płuca A549 oraz NCI-H460.

Białko p53 aktywowane pod wpływem mieszaniny AN, poprzez aktywację genów *APOL3*, *SLAMF7*, *OTUD1*, *EOMES*, *ICOSLG* może mieć wpływ na działanie szlaków interferonowych. Potwierdzono, że białko p53 może aktywować gen *SOCS1*, który jest inhibitorem szlaku JAK/STAT, co sugeruje jego wpływ na ekspresję genów stymulowanych interferonem- α (IFN- α) oraz interferonem- γ (IFN- γ).

p53 wpływa negatywnie na ekspresję niektórych genów stymulowanych IFN- α . W przeciwieństwie do tego, wykazano, że białko p53 współdziała z IFN- γ (synergistycznie lub addytywnie) w stymulacji ekspresji niektórych genów kodujących białka odporności wrodzonej tj. *CASP1*, *IFIT1*, *IFIT3*.

Podsumowując, przeciwnowotworowe białko p53 wykazuje funkcje regulacyjne wrodzonej odpowiedzi immunologicznej poprzez aktywację dziesiątek genów, kodujących białka tego systemu. W ramach niniejszego projektu doktorskiego bardziej szczegółowo zbadano wpływ p53 na uwrażliwianie komórek nowotworowych na cytotoksyczne działanie komórek NK-92 oraz jego rolę w odpowiedzi na IFN- α i IFN- γ . Odkryto mechanizm aktywacji genu *SLAMF7* pod wpływem paklitakselu niezależnie od p53, jednak jest to nowo zdobyta wiedza, którą należy zgłębić. Opisane mechanizmy mogą mieć znaczenie praktyczne ze względu na istnienie terapii wykorzystującej zwiększoną ekspresję *SLAMF7* jako celu przeciwciała (Elotuzumab) zwiększającego wrażliwość komórek nowotworowych na niszczące działanie układu odpornościowego.