

Każda komórka ludzkiego ciała zawiera ten sam materiał genetyczny, jednak w komórkach różnych tkanek ulega on zupełnie odmiennej ekspresji, przekładając się na unikalny fenotyp. Dokładna i dynamiczna regulacja ekspresji poszczególnych genów stanowi podstawę plastyczności ludzkiego genomu i umożliwia szybkie reagowanie na zmieniające się warunki w środowiska. Szczególną rolę w regulacji ekspresji genów odgrywają procesy epigenetyczne, do których należy metylacja DNA i niedawno odkryta, aktywna demetylacja DNA, katalizowana przez białka z rodziny TET (ang. Ten-Eleven-Translocation). Ta nowo poznana grupa enzymów, do których zalicza się białka TET1, TET2 i TET3, odpowiedzialna jest za enzymatyczne utlenianie 5-metylocytozyny, (zasady powstającej w procesie metylacji DNA) do 5-hydroksymetylocytozyny, a także 5-hydroksymetylocytozyny do 5-formylocytozyny i 5-karboksycytozyny, które są następnie usuwane z DNA i zastępowane niezmodyfikowaną cytozyną. Co więcej niedawno odkryto, że białka te mogą również produkować 5-hydroksymetylouracyl z tyminy – jedną z najbardziej enigmatycznych modyfikacji DNA, której pochodzenie wciąż nie zostało do końca wyjaśnione. Warto nadmienić, iż mutacje w genach kodujących białka TET są bardzo często obecne w różnego typu nowotworach, w szczególności w nowotworach hematologicznych, a same zaburzenia w aktywnej demetylacji DNA stanowią jeden z kluczowych elementów procesu kancerogenezy.

Pomimo dużego zainteresowania świata naukowego, wciąż bardzo mało wiadomo na temat aktywności enzymatycznej poszczególnych członków rodziny białek TET i ich udziału w formowaniu epigenetycznych pochodnych 5-metylocytozyny. Dlatego też celami naszego projektu są:

- Oszacowanie udziału aktywności enzymatycznej poszczególnych członków rodziny białek TET w tworzeniu 5-hydroksymetylocytozyny, 5-formylocytozyny, 5-karboksycytozyny i 5-hydroksymetylouracylu;
- Określenie proporcji 5-hydroksymetylouracylu powstałego w wyniku utlenienia tyminy i deaminacji 5-hmCyt;
- Określenie, czy istnieją jakiegokolwiek różnice w podatności poszczególnych członków rodziny TET na działanie stymulujące askorbinianu (witaminy C).

W tym celu posłużymy się najnowszymi zdobyczami inżynierii genetycznej (m.in. nowatorską techniką CrispR/Cas9), które pozwalają selektywnie wyciszyć ekspresję poszczególnych białek TET w ustalonych liniach komórkowych komórek prawidłowych, jak i nowotworowych. Badane komórki zostaną także poddane działaniu drobnocząsteczkowych inhibitorów i aktywatorów aktywności enzymatycznej białek TET. W celu oznaczenia wyżej wymienionych modyfikacji w DNA posłużymy się wysoce zaawansowaną techniką badawczą: dwuwymiarową ultrasprawną chromatografią cieczową z tandemową spektrometrią mas (2D-UPLC/MS/MS), jak również oznaczymy ekspresję poszczególnych genów TET za pomocą techniki RT-qPCR przy użyciu LightCycler 480 oraz cytometrii przepływową.

Zaproponowane przez nas badania pozwolą na lepsze zrozumienie procesów epigenetycznych, w szczególności procesu aktywnej demetylacji DNA. Dostarczą również unikalnych, wysoce dokładnych i powtarzalnych danych na temat aktywności enzymatycznej poszczególnych białek TET i ich udziału w formowaniu wzorów epigenetycznych modyfikacji DNA. Jest to szczególnie ważne w kontekście patogenezy wielu nowotworów i ich leczenia, gdyż zaburzenia w epigenetycznej regulacji aktywności genów warunkujących proliferację i różnicowanie komórek leżą u podstaw rozwoju tych jednostek chorobowych.

Pozyskane dane mogą w przyszłości przyczynić się do opracowania szybkich i tanich testów diagnostycznych. Ich zastosowanie w rutynowej praktyce klinicznej pozwoliłoby na wczesne wykrycie zaburzeń w funkcjonowaniu białek TET u pacjentów z nowotworami złośliwymi, bez konieczności analizy profilu mutacji (np. przy pomocy sekwencjonowania DNA). Warto także nadmienić, iż dane na temat zaburzeń funkcjonowania białek TET, mające swe odbicie w profilu poszczególnych pochodnych epigenetycznych mogą w znacznym stopniu ułatwić ocenę przeżycia pacjenta, pomóc w wyborze optymalnej strategii terapeutycznej, a także umożliwić monitorowanie postępów leczenia choroby nowotworowej i oszacowanie ryzyka jej nawrotu. Co więcej, niniejsze badania mogą stanowić przyczynek do wprowadzenia ściśle spersonalizowanych strategii terapeutycznych, opartych na wyborze najskuteczniejszych w leczeniu danego pacjenta chemioterapeutyków.