

Badanie nowych ról białka ADAR1 w nowotworach; udział w tworzeniu neoantygenów, powiązanie z białkiem p53 oraz wpływ terapii przeciwnowotworowych na aktywność białka ADAR1

Powody dla których podjęto ten temat:

Najbardziej rozpowszechnionym i najlepiej zbadanym typem modyfikacji RNA, ze 170 znanych, jest edycja RNA z udziałem białka ADAR1. Proces ten może powodować powstawanie różnych form danego białka, a zwiększony poziom edycji RNA obserwowany jest w nowotworach. Enzym ADAR1 odpowiada za zmianę adenozyliny w cząsteczce dwuniciowego RNA (dsRNA) w inozynę. Ten mechanizm odgrywa znaczącą rolę w rozpoznawaniu przez komórkę własnych i obcych (np. wirusowych) cząsteczek RNA. Inozyna w cząsteczkach dsRNA jest rozpoznawana przez mechanizmy nieswoistej odpowiedzi odpornościowej i taka cząsteczka dsRNA jest traktowana jako „własna”. Dlatego w przypadku braku białka ADAR1, obecne w komórce cząsteczki dsRNA bez inozyn (nieedytowane) są rozpoznawane jako wirusowy materiał genetyczny, co uruchamia nieswoistą odpowiedź immunologiczną i prowadzi do śmierci komórki. Brak ADAR1 może również prowadzić do zmian w procesie wycinania intronów z transkryptów (splicing). Natomiast, wysoki poziom białka ADAR1 (także obserwowany w wielu nowotworach) powoduje zbyt wysoki poziom edycji RNA, co może prowadzić do zmian w sekwencji aminokwasowej białek w komórkach nowotworowych. Zarówno nieprawidłowy splicing jak i zbyt wysoki poziom edycji RNA może prowadzić do prezentacji peptydów nowotworowych (o zmienionej sekwencji aminokwasowej) przez cząsteczki MHC klasy I na powierzchni takich komórek. Tym samym, zarówno brak jak i zbyt duży poziom białka ADAR1 może skutkować powstaniem antygenów nowotworowych, które potencjalnie mogłyby zostać wykorzystane jako marker diagnostyczny w nowotworach. Obecnie nie są znane wszystkie przyczyny powstawania antygenów nowotworowych (mogą pochodzić z egzonów, intronów, obróbki w proteasomie, czy modyfikacji potranslacyjnych). Dlatego w naszym projekcie chcemy zbadać efekty edycji RNA na powstawanie antygenów nowotworowych, by stworzyć ogólny model powstawania antygenów nowotworowych, ze szczególnym uwzględnieniem edycji RNA.

Cel projektu:

Planowane badania mają na celu zidentyfikowanie w ujęciu globalnym miejsc edycji RNA z udziałem ADAR1. Uzyskane dane zostaną wykorzystane do identyfikacji peptydów pochodzących z edycji RNA i prezentowanych na powierzchni komórek nowotworowych. Wyniki te pozwolą odpowiedzieć na pytanie czy peptydy powstałe na skutek zwiększonej edycji RNA lub jej braku są prezentowane na powierzchni komórek nowotworowych. Ponadto nasze badania wykażą które z miejsc edytowanych w RNA zależą od białka p53 (główny supresor nowotworowy). Ostatnim celem naszego projektu jest wykrycie miejsc edycji RNA zależnej od ADAR1 pojawiających się w następstwie odpowiedzi na zastosowanie czynników uszkodzających DNA stosowanych powszechnie w leczeniu nowotworów. Odpowiedź na te pytania jest niezwykle istotna, jako że zmiany w edycji RNA po zastosowaniu przeciwnowotworowych czynników uszkodzających DNA lub niestabilność chromosomowa będąca następstwem utraty białka p53 w rozwoju nowotworu mogą mieć wpływ na rodzaj prezentowanych neoantygenów, a w konsekwencji na wykrywanie komórek nowotworowych przez komórki układu odpornościowego.

Opis badań:

W pierwszym roku projektu planujemy stworzyć 8 linii komórkowych z podwyższoną lub obniżoną ekspresją białka ADAR1. Ich materiał genetyczny zostanie zsekwencjonowany (RNA-seq), a peptydy powstałe w wyniku edycji RNA, prezentowane przez MHC klasy I zostaną zidentyfikowane z użyciem spektrometrii mas. W ciągu drugiego roku stworzymy linie komórkowe z wyciszoną ekspresją genu p53, których materiał genetyczny zostanie zsekwencjonowany (RNAseq). W trzecim roku planujemy poddać wyjściowe (niepoddane modyfikacjom) linie komórkowe działaniu wybranych leków/terapii przeciwnowotworowych (cisplatyna i radioterapia), a następnie określimy zmiany w poziomie edycji RNA (dane z RNAseq).

Najważniejsze spodziewane efekty:

Zweryfikujemy teorię, że zmiany edycji RNA zależnej od ADAR1 prowadzą do zmiany prezentowanych antygenów nowotworowych. Pozyskamy również wiedzę na temat zmian w edycji RNA pojawiających się w następstwie ekspozycji komórek nowotworowych na działanie leków przeciwnowotworowych uszkodzających DNA. Zbadamy też czy brak/obniżona ekspresja genu p53 wpływa na edycję RNA.