

Ocena potencjału terapeutycznego metylotransferazy DNMT2/TRDMT1 w odpowiedzi na liposomalne kompleksy zewnątrzkomórkowego RNA w modelach komórkowych kostniakomięsa *in vitro*

Streszczenie

Wolne kwasy nukleinowe, uwalniane z komórek w wyniku różnych procesów tj. śmierć, starzenie czy w odpowiedzi na stres, są określane jako wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (DAMP, ang. *Damage-associated molecular patterns*). Częsteczki te pośredniczą w komunikacji międzykomórkowej, przez co regulują wiele szlaków w komórkach. Przypuszcza się, że wolne kwasy nukleinowe mogą indukować stan zapalny, który pełni podwójną rolę w biologii nowotworów. Z jednej strony, poprzez aktywację układu immunologicznego indukuje usuwanie komórek nowotworowych. Z drugiej natomiast, przewlekły stan zapalny może prowadzić do uszkodzenia tkanek oraz tworzyć środowisko promujące rozwój nowotworu.

Opierając się na wcześniejszych badaniach prowadzonych przez naszą grupę sformułowano hipotezę dotyczącą udziału metylotransferazy DNMT2/TRDMT1 w odpowiedzi na wolne kwasy nukleinowe uwalniane w postaci DAMP. Białko to poprzez metylację RNA pośredniczy w szlakach, tj. naprawa DNA, starzenie czy odpowiedź na stres. Ponadto, metylotransferaza DNMT2/TRDMT1 może regulować odpowiedź immunologiczną, konsekwentnie prowadząc do zmiany fenotypu sekrecyjnego komórek.

Uwzględniając plejotropową rolę metylotransferazy DNMT2/TRDMT1 w regulacji różnych szlaków komórkowych postanowiono określić rolę tego białka podczas odpowiedzi na zewnątrzkomórkowe RNA. Jako model badawczy wykorzystano komórki kostniakomięsa: U-2 OS, SaOS-2 oraz MG-63, które poddano działaniu różnych stężeń etopozydu. Zewnątrzkomórkowe RNA izolowano z medium hodowlanego komórek umierających lub z zaindukowanym etopozydem starzeniem. Uzyskane zewnątrzkomórkowe RNA zostało następnie wykorzystane do lipofekcji komórek. Scharakteryzowano wpływ zewnątrzkomórkowego RNA zamkniętego w liposomach na regulację procesów, tj. proliferacja, śmierć komórkowa, utrzymywanie równowagi redoks czy odpowiedź immunologiczna komórek. Określono również znaczenie braku funkcjonalnego białka DNMT2/TRDMT1 w komórkach z zaindukowanym chemioterapeutykiem starzeniem podczas odpowiedzi na lipofekcję zewnątrzkomórkowym RNA. W ostatnim etapie dysertacji natomiast starano się określić, czy egzogenne RNA może

modyfikować odpowiedź komórek poddanych działaniu chemioterapeutyków oraz jaką rolę w tym procesie pełni metylotransferaza DNMT2/TRDMT1.

Wykazano, że zewnątrzkomórkowe RNA zamknięte w liposomach promuje w komórkach kostniakomięsaka zaburzenia homeostazy redoks oraz moduluje odpowiedź prozapalną, prowadząc do indukcji śmierci komórkowej, a metylotransferaza DNMT2/TRDMT1 pośredniczy w wielu etapach tej regulacji. Zaobserwowano również, że metylotransferaza DNMT2/TRDMT1 jest ważnym czynnikiem kontrolującym wrodzoną odpowiedź immunologiczną komórek nowotworowych z zaindukowanym etopozydem starzeniem komórkowym. Ponadto, na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że egzogenne RNA stymuluje naprawę uszkodzeń DNA w komórkach poddanych działaniu etopozydu. Z uwagi na fakt, że utrata DNMT2/TRDMT1 była związana z defektami naprawy DNA pomimo obecności egzogenego RNA, metylotransferaza DNMT2/TRDMT1 stanowi istotny cel terapii nowotworów. W związku z tym, przedstawione wyniki stanowią istotne uzupełnienie wiedzy dotyczącej udziału DNMT2/TRDMT1 w regulacji patogenezy nowotworów oraz wskazują niescharakteryzowany dotąd mechanizm, w którym metylotransferaza DNMT2/TRDMT1 może regulować odpowiedź komórek nowotworowych na zewnątrzkomórkowe czy egzogenne RNA.