

STRESZCZENIE

Rak błony śluzowej trzonu macicy jest szóstym najczęściej występującym nowotworem wśród kobiet oraz ósmą najczęstszą przyczyną zgonów, z powodu nowotworów, na kontynencie europejskim. Z tego powodu duża część badań naukowych, prowadzonych nad rakiem, jest skupiona na identyfikacji biomarkerów odpowiedzialnych za oporność na działanie leków indukujących międzyniciowe wiązania poprzeczne w DNA.

W przedstawionej pracy główną uwagę skierowano na paralogi rekombinazy RAD51, kluczowego białka w mechanizmie HR, który wchodzi w skład maszynarii naprawy międzyniciowych wiązań poprzecznych. Wybór paralogów do badań był związany z brakiem aktualnej wiedzy o ich roli w naprawie międzyniciowych wiązań poprzecznych, w komórkach raka błony śluzowej trzonu macicy po działaniu związku sieciującego DNA.

Nadrzędnym celem badań, przeprowadzonych w niniejszej pracy, była ocena wpływu paralogów RAD51 oraz miRNA, wyciszających transkrypty genów *RAD51C* i *SWSAP1*, na efektywność naprawy międzyniciowych wiązań poprzecznych w komórkach raka błony śluzowej trzonu macicy, w odpowiedzi na chemioterapię.

Materiał badawczy stanowiły dwie linie komórkowe raka błony śluzowej trzonu macicy wykazujące różną wrażliwość na działanie związku wywołującego wiązania poprzeczne – cisplatyny. Zaplanowane w ramach pracy doktorskiej badania skupiły się na zastosowaniu wyciszenia ekspresji paralogów RAD51 i skojarzenia inhibitorów kinazy DNA-PK z inhibicją miRNA, które wyciszają transkrypty paralogów RAD51.

Cytotoksyczność związków badano za pomocą testu AlamarBlue. Badanie poziomu i naprawy międzyniciowych wiązań poprzecznych wykonano przy użyciu testu kometowego w wersji alkalicznej. Lokalizację jądrową białek badano przy pomocy mikroskopii konfokalnej. Proces apoptozy oraz poziom stężenia białek w komórce analizowano za pomocą cytometrii przepływowej. Ekspresję genów i miRNA badano przy użyciu metody real-time-PCR.

Uzyskane w toku badań wyniki wskazują, że:

1. Paralogi RAD51 uczestniczą w początkowych etapach nacinania usieciowanego DNA w naprawie międzyniciowych wiązań poprzecznych.
2. Wyciszenie genu kodującego białko SWSAP1 i inhibicja miR-125a-5p, który reguluje ekspresję SWSAP1, stały się właściwym podejściem badawczym, prowadzącym do

uwrażliwienia komórek opornych na działanie cisplatyny poprzez zaburzenie efektywności działania mechanizmów naprawy międzyciowych wiązań poprzecznych przed lub na etapie nacinania

Magdalena Szotkowska

ABSTRACT

Endometrial cancer is the sixth most common cancer among women and the eighth most common cause of cancer deaths on the European continent. For this reason, much of the cancer research focused on identifying the biomarkers responsible for drug resistance that induce interstrand DNA cross-links.

In the presented work, the main attention focused on paralogs of RAD51 recombinase, a key factor of the HR mechanism, which is part of the interstrand cross-links repair machinery. The choice of paralogs for research was related to the lack of current knowledge about their role in the interstrand cross-links repair in endometrial cancer cells after the action of the DNA cross-linking agent.

The main goal of the research was to assess the effect of RAD51 paralogs and miRNA, silencing *RAD51C* and *SWSAP1* gene transcripts, on the effectiveness of interstrand cross-links repair in endometrial cancer cells in response to chemotherapy.

The research material consisted of two endometrial cancer cell lines showing different sensitivity to the effect of the interstrand cross-links inducing agent – cisplatin. The research planned as a part of the doctoral thesis focused on silencing the expression of RAD51 paralogs and using the combination of DNA-PK kinase inhibitor with inhibition of miRNAs silencing RAD51 paralog transcripts.

The cytotoxicity of the agents was tested with the AlamarBlue assay. The study of the level and repair of interstrand cross-links was performed using the alkaline comet assay. The nuclear localization of proteins was studied by confocal microscopy. The process of apoptosis and the level of protein concentration in the cells were analyzed by flow cytometry. Gene and miRNA expressions were tested using real-time PCR methods.

The achieved results allowed for the following conclusions:

1. RAD51 paralogs are involved in the initial steps of cutting cross-linked DNA in interstrand cross-links repair.
2. Silencing the gene encoding the SWSAP1 protein and inhibiting miR-125a-5p, which regulates SWSAP1 expression, has become the appropriate research approach to sensitizing cisplatin-resistant cells by disrupting the effectiveness of interstrand cross-link repair mechanisms before or during incision step.

Magdalena Szatkowska