

mgr Agata Borkowska

**Rola autofagii i starzenia w chemooporności raka nerki:
analiza *in vitro* i *in vivo***

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. Claudine Kieda

Promotor pomocniczy: dr Halina Waś

Laboratorium Onkologii Molekularnej i Terapii Innowacyjnych
Wojskowy Instytut Medyczny Państwowy Instytut Badawczy



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023r.

3. Streszczenie

Raki nerkowokomórkowe (ang. Renal Cell Carcinoma, RCC) stanowią około 90% wszystkich przypadków raków nerek. W 90% przypadków RCC obserwuje się brak funkcjonalności białka pVHL, negatywnego regulatora czynników indukowanych hipoksją (ang. Hypoxia Inducible Factors, HIF). Jego brak prowadzi do rozwoju permanentnego stanu odpowiedzi na hipoksję w komórce. Ponieważ RCC wykazują słabą odpowiedź na większość standardowych terapii systemowych, istnieje duże zapotrzebowanie na opracowanie nowych strategii terapeutycznych. Podejrzewa się, że komórki nowotworowe, które rozwinęły fenotyp starzeniowy w odpowiedzi na terapię (ang. Therapy Induced Senescence, TIS), mogą być odpowiedzialne za rozwój chemooporności. Komórki TIS są nieodwracalnie zahamowane w cyklu komórkowym i wykazują charakterystyczne zmiany morfologiczne, biochemiczne i molekularne. Mimo nieodwracalnej blokady cyklu komórkowego, komórki te zdolne są do generacji komórek potomnych. Podejrzewa się, że autofagia może odgrywać istotną rolę w przeżyciu komórek starych, a także w aktywizacji ich podziałów. Jej modulacja wydaje się być obiecującą strategią w terapiach senolitycznych. Dlatego celem niniejszej pracy było określenie czy inhibicja autofagii uwrażliwi stare komórki raka nerki na indukcję śmierci komórkowej i/lub wpłynie na wznowienie ich potencjału proliferacyjnego i produkcję komórek potomnych, w warunkach normoksji i hipoksji.

W pierwszej części eksperymentów komórki raka ludzkiego raka nerki, o zmutowanym pVHL oraz komórki mysie o normalnym pVHL, poddano działaniu chemioterapii w warunkach normoksji (~19% O₂) oraz hipoksji (1% O₂). Do indukcji starzenia wykorzystano lek blokujący podział mitotyczny – winblastynę (ang. vinblastine, VIN), oraz leki o działaniu genotoksycznym – gemcytabinę (ang. gemcitabine, GEM) i 5-fluorouracyl (ang. 5-fluorouracil, 5-FU). Po zakończeniu eksperymentów przeprowadzono analizy ekspresji markerów starzenia.

Wykazano, że VIN ma najsilniejsze dawko-zależne działanie prostarzeniowe w komórkach raka nerki, a jej działanie jest niezależne od niedotlenienia, w sytuacji, kiedy komórki mają zmutowany pVHL. Pod wpływem leczenia większość komórek w hodowli charakteryzowała się wysoką aktywnością SA-β-Galaktozydazy i sekrecją czynników SASP. W hodowlach zaobserwowano też nagromadzenie komórek powiększonych, granularnych i poliploidalnych. Komórki były zablokowane w cyklu komórkowym, co potwierdziła istotnie wyższa ekspresja inhibitorów tego procesu, p21 i p53. Analizy NGS potwierdziły, że w wyniku indukcji starzenia dochodzi do blokady

replikacji DNA oraz cytokinezy. Indukcji starzenia towarzyszyła, też aktywacja autofagii. Analizy NGS wykazały, że w komórkach starych dochodzi także do aktywacji szlaków związanych z przewodzeniem aksonów i neuroaktywną interakcją ligand-receptor, które nigdy wcześniej nie były wiązane z procesem indukcji starzenia.

W drugim etapie badań przeprowadzono eksperymenty oceniające wpływ zahamowania wczesnej i późnej autofagii w komórkach ulegających starzeniu indukowanemu chemoterapeutykami. Wczesną autofagię zahamowano w komórkach przed traktowaniem ich VIN i 5-FU. W tym celu w ludzkich komórkach raka nerki wyciszono pojedyncze geny kodujące białka ATG5, ATG7, Becn1 oraz ULK1 metodą siRNA. Analizy wykazały, że inhibicja wczesnej autofagii nie wpływa w sposób istotny na indukcję starzenia. Z kolei farmakologiczne zahamowanie późnej autofagii z użyciem HCQ wiązało się z indukcją śmierci komórkowej oraz blokadą cyklu komórkowego. Zmiany te zaobserwowano w komórkach nietraktowanych oraz traktowanych VIN. Wskazuje to, że HCQ nie jest związkiem senolitycznym. Ponadto, zaobserwowano, że pod wpływem inhibicji autofagii dochodzi do ucieczki od starzenia, a hipoksja przyspieszyła generację komórek potomnych. Generacja komórek była najprawdopodobniej wynikiem podziałów amitotycznych. Zmianom tym towarzyszyło zahamowanie przepływu autofagicznego, wzmożona aktywność lizosomalna oraz zwiększona sekrecja SASP. Ponadto, analizy NGS pozwoliły na wytypowanie 67 genów, których ekspresja różniła się między normoksją, a hipoksją w komórkach uciekających od starzenia. Geny te mogą odgrywać kluczową rolę w regulacji procesu generacji komórek potomnych.

Eksperymenty na mysim modelu syngenicznym wykazały, że przy użyciu chemioterapii można skutecznie indukować starzenie *in vivo*. Analizy molekularne wykazały, że zahamowanie autofagii przy użyciu HCQ, w perspektywie krótkotrwałej terapii nie wpływa na wzrost guza oraz ekspresję markerów tranzykcji epithelialno-mezenchymalnej, macierzystości, odpowiedzi immunologicznej oraz hipoksji. Zastosowanie HCQ promowało jednak produkcję IL-8 i osteopontyny w guzach, co korelowało z obniżeniem ekspresji inhibitora cyklu komórkowego, p16 oraz wyższą ekspresją białka odpowiedzi antyoksydacyjnej, GpX1. Zmiany te sugerują, że inhibicja autofagii mogła przyczynić się do ucieczki od starzenia *in vivo*. Wyniki te wymagają jednak potwierdzenia w eksperymentach na większych grupach badawczych.

Podsumowując komórki raka nerki ulegają starzeniu komórkowemu pod wpływem działania leków cytotoksycznych, niezależnie od warunków tlenowych.

Zahamowanie późnej autofagii prowadzi do ucieczki od starzenia, a hipoksja przyspiesza generację komórek potomnych. Wyniki te wskazują, że inhibicja autofagii może mieć negatywny skutek w terapiach długoterminowych, wymaga to jednak potwierdzenia w dalszych badaniach.