

mgr inż. Aleksandra Majewska

**Rola PTEN w hipoksyjnym mikrośrodowisku
raka nerki i czerniaka**

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

Promotor: prof. dr hab. Claudine Kieda

Promotor pomocniczy: dr Klaudia Brodaczewska

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



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa, 2023

STRESZCZENIE

Zrozumienie mechanizmów molekularnych, związanych z progresją nowotworów i kompleksowe podejście do całości mikrośrodowiska guza (TME, ang. *tumor microenvironment*), ma kluczowe znaczenie w poszukiwaniu skutecznych terapii przeciwnowotworowych. Jedną z krytycznych cech TME guzów litych jest niedotlenienie – niski, niefizjologiczny poziom tlenu (hipoksja). Hipoksja jest głównym czynnikiem powodującym patologiczne unaczynienie w guzach, a nieprawidłowości naczyń mają istotny wpływ na progresję choroby i determinują skuteczność leczenia. Normalizacja naczyń, za pośrednictwem allosterycznego efektora hemoglobiny – ITPP (ang. *myo-inositol trispyrophosphate*), wydaje się obiecującym podejściem terapeutycznym, co wykazano m.in. w modelu czerniaka. Oprócz kompensacji niedotlenienia ITPP może również aktywować supresor nowotworu PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog*). PTEN pełni istotne funkcje w wielu procesach biologicznych m.in. proliferacji czy metabolizmie komórek. Mutacje *PTEN* lub utrata jego funkcji są obserwowane w wielu typach nowotworów. Celem niniejszej pracy było sprawdzenie skuteczności działania ITPP w mysim modelu raka nerki i określenie roli PTEN w hipoksyjnym mikrośrodowisku guzów.

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem mysich modeli nowotworów: raka nerki (Renca) i czerniaka (B16 F10). *In vivo* zbadano skuteczność stosowania ITPP w raku nerki – jednak nie wykazano pozytywnych efektów terapii, obserwowanych wcześniej w modelu czerniaka. Wykonano zatem szereg doświadczeń mających na celu określenie roli PTEN w obu modelach cechujących się odmienną odpowiedzią na leczenie ITPP. Eksperymenty miały na celu zbadanie aktywności i funkcji PTEN w komórkach nowotworowych w warunkach niedotlenienia z uwzględnieniem jego wpływu na proces angiogenezy (*in vitro*). Dodatkowo z zastosowaniem edycji genomu metodą CRISPR/Cas9 uzyskano mysie linie komórkowe czerniaka i raka nerki z nokautem *Pten*, co pozwoliło bezpośrednio określić rolę PTEN zarówno w progresji guzów (*in vivo*, *in vitro*), jak i w odpowiedzi na standardowe leki przeciwnowotworowe (*in vitro*). Ponadto w modelu raka nerki, z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji (NGS, ang. *next generation sequencing*), określono wpływ hipoksji i mutacji *Pten* na zmiany ekspresji miRNA (*in vivo*, *in vitro*).

Zarówno w czerniaku jak i raku nerki wykazano zależny od hipoksji spadek poziomu PTEN i dominację fosforylowanej formy (pPTEN). Tylko w komórkach Renca w niedotlenieniu obserwowano równocześnie zmiany aktywności ścieżki p53/MDM2 przy braku akumulacji pAKT. Z kolei w modelu czerniaka spadek poziomu PTEN skutkowało klasyczną aktywacją PI3K/AKT. Jednocześnie, hipoksja silnie stymulowała wydzielanie czynników pro-angiogennych w modelu raka nerki, co skutkowało zmianami aktywności i funkcji komórek śródbłonna. Badania prowadzone z wykorzystaniem ustalonych linii komórkowych z nokautem *Pten* nie wykazały istotnego wpływu dysfunkcji PTEN na wzrost guzów (*in vivo*) i proliferację komórek (*in vitro*). Badane modele różniły się jednak opornością na cisplatynę. Komórki Renca z nokautem *Pten* (*Pten/KO*) cechowała większa oporność na leczenie niż komórki *Pten/WT*. Z kolei w modelu czerniaka komórki B16 F10 *Pten/KO* były bardziej wrażliwe na leczenie cisplatyną niż komórki *Pten/WT*. Obserwowane różnice mogą wynikać z odmiennych efektów nokaut *Pten* m. in. na ekspresję p53 i wydzielanie PAI-1 (ang. *plasminogen activator inhibitor 1*) w obu testowanych modelach. Co więcej, w komórkach Renca nokaut *Pten* powodował zmiany poziomu markerów charakterystycznych dla przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT, ang. *epithelial to mesenchymal transition*). W modelu raka nerki obserwowano również istotny wpływ hipoksji i nokautu *Pten* na zmiany ekspresji miRNA. Głównym miRNA ulegającym zwiększonej ekspresji w hipoksji był miR-210, natomiast wzrost ekspresji miR-221 może być związany ze spadkiem poziomu PTEN w hipoksji. Wśród miRNA ulegających destabilizacji w modelach mutacji *Pten* wyróżnia się onkomir miR-155 oraz miR-100.

Podsumowując niedotlenienie jest istotnym czynnikiem regulującym aktywność PTEN w czerniaku i raku nerki, jednak funkcja PTEN istotnie różni w obu badanych modelach. Różnice te mogą odgrywać kluczową rolę w odpowiedzi komórek na standardowe terapie przeciwnowotworowe, a wraz z różnicami potencjału proangiogennego mogą determinować odpowiedź związaną z normalizacją naczyń za pośrednictwem ITPP. Deregulacja PTEN może również istotnie modyfikować mikrośrodowisko guza poprzez zmiany ekspresji miRNA.