

Lek. Wojciech Solarek

**Wpływ insuliny i insulino-podobnych czynników
wzrostu na komórki raka nerki**

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

Promotor: prof. dr hab. Cezary Szczylik

Promotor pomocniczy: dr hab. Anna M. Czarnecka

Klinika/ Zakład: Laboratorium Onkologii Molekularnej, Wojskowy Instytut
Medyczny



**Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego**

Warszawa 2020

Streszczenie:

Wstęp

Rak nerki (RCC) stanowi od 2 do 3 % wszystkich nowotworów złośliwych u osób dorosłych. Jest on uważany za siódmy najczęstszy nowotwór u mężczyzn i dziewiąty wśród kobiet. Zachorowalność i śmiertelność z powodu raka nerki wzrastają stale od wielu lat i aktualnie szacowane są na ok. 65 tys. nowych przypadków i 15 tys. zgonów w Stanach Zjednoczonych, w Polsce natomiast w 2015 roku wynosiły odpowiednio - 5077 nowych przypadków i 2679 zgonów. Zarówno otyłość jak i cukrzyca, które są znanymi czynnikami ryzyka wystąpienia raka nerki, mogą mieć wpływ na zaburzenia w ścieżce przekazywania sygnału inuliny i insulino-podobnych czynników wzrostu (IGF). Insulina jest regulatorem metabolizmu węglowodanów i tłuszczu na poziomie całego organizmu. W wysokich stężeniach może ona również wpływać na takie procesy komórkowe jak autofagocytoza, aktywność proteasomów czy apoptoza. IGF są głównie produkowane w wątrobie i odpowiadają za regulację procesów związanych ze wzrostem i proliferacją komórek. Stymulacja receptora IGF-1R przez IGF prowadzi do aktywacji dwóch kluczowych wewnątrzkomórkowych ścieżek przekazywania sygnału: PI3K-Akt-mTOR i Ras-MAPK, które to mogą odpowiadać za rozwój i progresję nowotworu. Badania dotyczące roli insuliny i insulino-podobnych czynników wzrostu nie dają jednoznacznej odpowiedzi na pytanie o ich wpływ na progresję raka nerki. Zarówno poziom insuliny związany z kontrolą cukrzycy i insulinoopornością, jak i insulino-podobne czynniki wzrostu najprawdopodobniej mają wpływ na rozwój raka nerki, a tym samym też jego progresję.

Cel badania

Celem pracy było zweryfikowanie hipotezy mówiącej, że insulina i insulino-podobne czynniki wzrostu wpływają stymulująco na komórki raka nerki. Analiza linii komórkowych pochodzących z guzów pierwotnych i przerzutowych miała dać odpowiedź na pytanie o rolę insuliny i insulino-podobnych czynników wzrostu w proliferacji, wzroście i migracji komórek nowotworu nerki.

Materiały i metody

W badaniu wykorzystane zostały linie komórkowe pochodzące z pierwotnego guza raka nerki (786-O, 769-P, Caki-2), przerzutów raka nerki (Caki-1, ACHN), a jako linii kontrolnych użyto: linię pochodzącą z nerki zdrowej (PCS-400-010) i linię nerki embrionalnej

(HEK293). Hodowla każdej z linii komórkowych odbywała się w medium dedykowanym w warunkach standardowych (37°C, 5% CO₂). Następnie wykonywano pasaż komórek do naczynia badawczego – szalek 6/24/96-dółkowych lub do butelek T25. Po 24 godzinach dwukrotnie płukano komórki PBS, a następnie dodawano medium RPMI z 0,1% BSA (warunki pozbawienia surowicy). Po kolejnych 24 godzinach dodawano medium RPMI z 0,1% BSA wraz z badanymi cząsteczkami (insuliną, IGF-1, IGF-2, HNMPA-(AM)₃, PPP). Ocenę proliferacji i żywotności komórek przeprowadzano poprzez wykonanie krzywej wzrostu i testu Alamar Blue. Zdolności migracyjne komórek mierzono przy użyciu testu gojenia rany (ang. *Wound Healing Assay*). Pomiar obecności receptorów IR i IGF-1R, a także ich formy ufosforylowanej odbywał się przy użyciu metody analizy białek w Technologii Luminex. Dodatkowa ocena obecności podjednostki β receptora IR została przeprowadzona przy użyciu testu ELISA. Ocenę stężeń insuliny, IGF-1 i IGF-2 w supernatancie medium hodowlanego wykonywano również z zastosowaniem Technologii Luminex i ELISA. Ocenę cytometryczną obecności receptorów IR i IGF-1R przeprowadzono z zastosowaniem mysich przeciwciał CD221 i CD220 na urządzeniu FACSCalibur zgodnie ze standardowym protokołem (488 nm). Analiza ekspresji genów związanych ze szlakiem sygnałowym insuliny została wykonana przy pomocy 384-dółkowych płytek The Human Insulin Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array (ocena ekspresji 84 genów związanych ze szlakiem sygnałowym insuliny) i urządzenia LightCycler480.

Wyniki

Linie komórkowe pochodzące z guzów przerzutowych raka nerki i linie kontrolne reagowały na stymulację insuliną zwiększeniem żywotności. Wszystkie linie komórkowe raka nerki i linia kontrolna nerki embrionalnej odpowiadały szybszym zarastaniem rany na stymulację insuliną, w przeciwieństwie do linii pierwotnej wywodzącej się ze zdrowej nerki. Inhibicja receptora IGF-1R przy zastosowaniu PPP prowadziła do zaniku efektów stymulacji insuliną. Zastosowanie IGF-1 prowadziło do znacznego wzrostu żywotności, proliferacji i zdolności migracyjnych badanych linii komórkowych. Po zastosowaniu inhibitorów IGF-1R i IR: PPP i HNMPA-(AM)₃ obserwowano spadek żywotności badanych komórek. Jedynie linia komórkowa HEK293, posiadająca zarówno receptor IGF-1R jak i IR, była niewrażliwa na inhibicję IGF-1R. Również stymulacja z użyciem IGF-2 wywoływała wzrost żywotności, proliferacji, a także potencjału migracyjnego wszystkich badanych linii komórkowych z wyjątkiem pierwotnej linii komórkowej pochodzącej ze zdrowej nerki. Zastosowanie inhibitorów PPP i HNMPA-(AM)₃ niespecyficznie ograniczało żywotność linii

komórkowych. Zastosowanie IGF-2 i równoczesnej inhibicji IGF-1R w mniejszym stopniu wpływało na zahamowanie proliferacji niż w przypadku stymulacji IGF-1 z równoczesnym zastosowaniem inhibitora.

Występowanie receptora IGF-1R zostało stwierdzone metodą cytometrii przepływowej na powierzchni komórek, a także przy użyciu metody analizy białek Technologii Luminex w lisatach wszystkich badanych linii komórkowych. Brak obecności receptora IR został wykazany dla wszystkich linii nowotworowych, a także dla linii zdrowej nerki. Obecność receptora IR została stwierdzona jedynie w przypadku komórek linii HEK293. Zarówno receptor IGF-1R, jak i IR ulegały fosforylacji po stymulacji IGF-1, IGF-2 i insuliną. Największy poziom ufosforylowanego receptora IGF-1R obserwowano po zastosowaniu cząsteczki IGF-1. Najwyższy poziom ufosforylowanego receptora IR był obserwowany po kondycjonowaniu insuliną, jednakże do fosforylacji tego receptora dochodziło również po stymulacji zarówno IGF-1 jak i IGF-2. Efekt ten był obserwowany jedynie w linii HEK293 posiadającej receptory IGF-1R i IR. Przy użyciu testu ELISA i Technologii Luminex stwierdzono brak wydzielania insuliny, IGF-1 i IGF-2 przez badane linie komórkowe niezależnie od zastosowanych warunków.

W liniach komórkowych 786-O, Caki-1 i HEK293, po stymulacji badanymi cząsteczkami, nie obserwowano istotnych zmian w ekspresji badanych genów. Wśród genów, których ekspresja uległa zmianie, najczęściej dochodziło do jej obniżenia. Insulina powodowała znaczący spadek ekspresji genów ścieżki sygnałowej kinazy MAP takich jak *FOS* i *MAP2K1* w linii komórkowej 786-O, czy genu *RRAS2* w linii komórkowej HEK293. W linii komórkowej HEK293 stwierdzono obniżenie poziomu ekspresji genów dla białek związanych z receptorami IR i IGF-1R takich jak *FRS3*, *IGF-1R* i *IGF-2*. Zastosowanie IGF-1 do stymulacji komórek raka nerki linii Caki-1 prowadziło do obniżenia ekspresji czynnika transkrypcyjnego *AEBP1* i *AKT*. W przypadku linii HEK293 po tego typu stymulacji dochodziło do wzrostu ekspresji genu dla białka *DOK3*, związanego z receptorem dla insuliny. W przypadku linii komórkowej raka nerki Caki-1 jak i kontrolnej linii komórkowej HEK293, po stymulacji IGF-1 obserwowano wzrost poziomu ekspresji genu *PRL*. Po kondycjonowaniu w linii komórkowej 786-O z IGF-2 wykryto obniżenie poziomu ekspresji genów *IRS2*, *CBL*, *AEBP1*, *AKT3*, *ACOX1*. Przy analizie ekspresji genów po stymulacji IGF-2 w linii komórkowej Caki-1 stwierdzono obniżenie ekspresji genów *AEBP1* i *AKT3*. W kontrolnej linii komórkowej HEK293 kondycjonowanie IGF-2 prowadziło do wzrostu ekspresji genu *HRAS*, a także do spadku ekspresji genów *FRS3*, *IGF-1R*, *JUN*, *FBP1*.

Wnioski

Insulina, IGF-1 i IGF-2 są czynnikami stymulującymi żywotność, proliferację i potencjał migracyjny komórek raka nerki. Komórki raka nerki posiadają receptor IGF-1R i odpowiadają na stymulację przy użyciu zarówno IGF jak i insuliny fosforylacją tego receptora. Receptor IR nie jest obecny w liniach komórkowych raka nerki, a wpływ insuliny na te komórki jest warunkowany oddziaływaniem jej poprzez receptor IGF-1R. Zarówno receptor IGF-1R, jak i IR ulegają fosforylacji po stymulacji IGF-1, IGF-2 i insuliną. W hodowli linii komórkowych raka nerki nie stwierdza się sekrecji insuliny, IGF-1 i IGF-2 tym samym nie funkcjonuje pętla wzajemnego pobudzenia komórek na drodze para- i autokrynnej. Insulina, IGF-1 i IGF-2 wpływają na zmiany w ekspresji genów powiązanych ze ścieżką przekazywania sygnałów insuliny i insulino-podobnych czynników wzrostu. Wyrażone jest to przez obniżenie ekspresji genów związanych z receptorami insuliny i insulino-podobnych czynników wzrostu takich jak *DOK1*, *DOK3*, *INS*, *FRS3*, *IRS1-2*, *IGF-1R*. Zastosowanie badanych cząsteczek prowadzi do zmian w ekspresji genów związanych ze szlakami przekazywania sygnałów PI3K-Akt-mTOR i Ras-MAPK. Stymulacja przy użyciu insuliny wpływa na zmiany ekspresji genów nie tylko w linii komórkowej HEK293, posiadającej receptor dla insuliny, ale również w liniach komórkowych nie posiadających receptora dla insuliny, co wskazuje na jej oddziaływanie poprzez receptor IGF-1R.

Podpis promotora:

Prof. dr hab. n. med. CEZARY SZCZYLIK
Specjalista chorób wewnętrznych
ONKOLOGIA
tel. 22 610 30 98

Podpis promotora pomocniczego:

dr hab. n. med. Anna M. Czarnicka
specjalista onkologii klinicznej
2456562

Podpis autora:

Wojciech Solarek