

## Streszczenie

Nowotwory nerki dotyczą co roku prawie 300 tysięcy osób, a 120 tysięcy umiera z powodu tej choroby. Najczęściej spotykanym typem jest jasnokomórkowy rak nerki który stanowi ok. 80% wszystkich przypadków. Ze względu na brak typowych objawów w pierwszych stadiach, w chwili wykrycia choroby przerzuty stwierdza się już u jednej trzeciej pacjentów, a szanse na przeżycie dramatycznie maleją. Obecnie najczęściej stosowanym leczeniem jest wycięcie guza z fragmentem bądź całą nerką, a następnie chemio- lub radioterapia, które wiążą się z licznymi skutkami ubocznymi. Ze względu na wysoki stopień unaczynienia guzów, w stadium zaawansowanym, terapia opiera się na nowych lekach antyangiogennych blokujących receptory niektórych kinaz tyrozynowych. Niestety, taka forma terapii nie jest w pełni satysfakcjonująca ponieważ wydłuża czas przeżycia chorych jedynie o kilka miesięcy co więcej, nowotwór bardzo szybko wykształca oporność na stosowane leki.

ccRCC tworzy guzy silnie unaczynione, ze względu na częste mutacje genu supresorowego von Hippel-Lindau i nadmierne wydzielanie czynników proangiogennych. Nabywanie przez komórki umiejętności do opuszczania pierwotnego ogniska, aktywnej migracji i osiedlania się w odległych narządach, warunkowana jest wieloma czynnikami m. in. stopniem unaczynienia, obecnością komórek układu immunologicznego, a także nabieraniem przez komórki epitelialne właściwości i fenotypu komórek mezenchymalnych. Istotną rolę, zarówno w procesie angiogenezy jak i przejścia epitelialno-mezenchymalnego pełni receptor c-Met, ponieważ stymuluje proliferację i hamuje apoptozę oraz reguluje szereg czynników odpowiedzialnych za przerzutowanie.

Procesy zapalne odgrywają bardzo ważną rolę w procesie wzrostu i rozwoju nowotworu. Jednym z modulatorów odpowiedzi zapalnej jest białko MCP1, kodowane przez gen *ZC3H12A*. Białko to zaangażowane jest w negatywną regulację stanu zapalnego dzięki aktywności RNazy, która pozwala na degradację transkryptów cytokin prozapalnych. Rosnąca liczba publikacji naukowych sugeruje, że białko MCP1 może istotnie wpływać na rozwój nowotworu, poprzez pośrednią lub bezpośrednią regulację czynników zaangażowanych w procesy wzrostu, proliferacji czy śmierci komórkowej. Co więcej, wykazano że poziom MCP1 w tkance nowotworowej jest znacząco niższy w porównaniu z otaczającą zdrową, a także może regulować poziom czynników proangiogennych takich jak VEGF czy HIF.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie roli białka MCP1 w procesach wzrostu, unaczynienia i progresji jasnokomórkowego raka nerki, a także jego wpływ na nabieranie przez komórki nowotworowe oporności na leki celowane sunitinib i sorafenib.

W pierwszym etapie badań wykorzystano linie komórkowe Caki-1 oraz Caki-2 z obniżonym poziomem białka MCP1, a także ze stabilną nadekspresją dzikiej lub zmutowanej

Pauline Marone

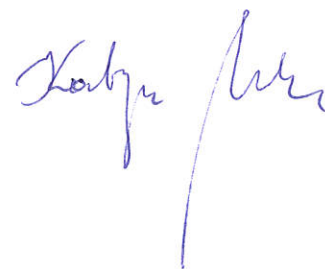
Kelvin Paul

formy MCPIP1. Wykazano, że niski poziom białka MCPIP1 lub zahamowanie jego aktywności RNazy prowadzi do zwiększenia potencjału proliferacyjnego komórek nowotworowych oraz przyspieszenia wzrostu guzów *in vivo*. Dodatkowo, brak białka MCPIP1 wpływa na wzrost ilości funkcjonalnych naczyń krwionośnych w porównaniu z kontrolą. Nadekspresja dzięki formie MCPIP1 spowalnia wzrost guzów i zmniejsza unaczynienie *in vivo*. W toku doświadczeń wykazano również, że od poziomu białka MCPIP1 w komórkach nowotworowych zależy aktywacja komórek endotelialnych. Zarówno komórki ccRCC z wyciszeniem jak i mutacją w domenie RNazowej MCPIP1 wydzielają zdecydowanie więcej czynników proangiogennych w porównaniu z komórkami kontrolnymi czy z nadekspresją dzięki formie MCPIP1, co w konsekwencji wpływa na rozluźnianie połączeń komórkowych przez internalizację VE-kadheryny i aktywuje komórki endotelialne do migracji. Równocześnie, po obniżeniu aktywności MCPIP1, dochodzi do zwiększenia ekspresji genów CXCR4, SDF-1 czy c-Met, odpowiedzialnych za podziały komórkowe i przerzutowanie. Co istotne, nadekspresja MCPIP1 zmniejsza ilość powstających przerzutów oraz hamuje proces EMT.

Analizując próbki kliniczne pacjentów w różnym stadium zaawansowania ccRCC wykazano, że razem z obniżającym się poziomem białka MCPIP1 w kolejnych stadiach choroby, rośnie poziom receptora c-Met oraz innych białek zaangażowanych w progresję nowotworową.

W ostatnim etapie badań zaobserwowano, że mechanizm oporności na leki sunitinib i sorafenib może polegać na podwyższeniu aktywności receptora c-Met z jednoczesnym obniżeniem poziomu białka MCPIP1, co zwiększa agresywność komórek nowotworowych, ilość przerzutów oraz zmienia ich fenotyp.

Podsumowując, białko MCPIP1 może być markerem zaawansowania choroby nowotworowej oraz pełnić kluczową rolę w rozwoju ccRCC, poprzez kontrolę procesu proliferacji, progresji oraz wydzielania czynników proangiogennych. Uzyskane wyniki wskazały także na zależną regulację białka MCPIP1 i receptora c-Met oraz ich wpływ na lekooporność komórek ccRCC. Biorąc pod uwagę wyniki przedstawione w niniejszej pracy i opublikowane przez inne zespoły badawcze, można zasugerować, że MCPIP1 może być uniwersalnym białkiem supresorowym.



Pauline Slowane



## Summary

Every year, kidney cancers affect nearly 300 000 people, and 120 000 die of this disease. The most common type is clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) which comprises 80% of all cases. Due to the lack of typical symptoms in the first stages, at the time of diagnosis, metastases are found in one-third of patients, and the chances of survival are dramatically reduced. Currently, the most commonly used treatment is tumor excision with partial or total nephrectomy, followed by chemo- or radiotherapy, which are associated with numerous side effects. Due to high level of tumor vasculature, therapy of more advanced stages of ccRCC is based on new antiangiogenic drugs, which inhibit multiple tyrosine kinase receptors such as VEGFR or PDGFR. Treatment with small molecules showed in approximately 38% of patients significant tumor control. However, despite of the efficacy of therapy, ccRCC often develops drug resistance, and the majority of patients who receive such treatment exhibit progressive disease after one year.

Formation of new blood vessels is a critical step during tumorigenesis and metastatic spread. ccRCC develops highly vascularized tumors due to common mutation in von Hippel-Lindau gene and overexpression of proangiogenic factors. The ccRCC ability to leave primary site, active migration and settle in distant organs, is orchestrated by many factors such as angiogenesis, presence of immune cells and acquisition of the properties of more aggressive, mesenchymal phenotype. C-Met receptor plays an important role in both angiogenesis and epithelial to mesenchymal transition. It stimulates proliferation, inhibits apoptosis and regulates a number of factors responsible for metastasis.

Inflammatory processes play a significant role in ccRCC growth and development. One of the negative modulators of the inflammatory response is the MCP1 protein, encoded by the *ZC3H12A* gene. MCP1 acts as an endonuclease due to RNase activity, which allows degradation of mRNA coding proinflammatory cytokines. Recent reports suggests that the MCP1 protein may significantly affect tumor development through direct or indirect regulation of factors involved in the processes of growth, proliferation or cell death. Moreover, it has been shown that MCP1 affects expression of proangiogenic factors such as VEGF or HIFs, and its level in tumor is lower than in adjacent healthy tissue.

The main aim of doctoral dissertation research was to determine the role of MCP1 protein in the processes of growth, vascularization and progression of clear cell renal cell carcinoma, as well as its effect on acquiring resistance to targeted drugs sunitinib and sorafenib.

In the first stage of the study, Caki-1 and Caki-2 cell lines with downregulation of MCP1 protein, as well as with stable overexpression of the wild type MCP1 and mutation in PIN

Paulina Lewone

Kele

domain which completely abolishes endonuclease activity were used. The following work demonstrates that low level of MCPIP1 or inhibition of its RNase activity lead to an increase in the proliferative potential of tumor cells and tumor growth *in vivo*. In addition, lack of MCPIP1 protein increases the number of functional blood vessels compared to control. In contrast, overexpression of the MCPIP1 slows tumor growth and reduces vascularization *in vivo*. Conducted experiments showed that activation of endothelial cells depends on the level of MCPIP1 protein in cancer cells. Both, inhibition and mutation of MCPIP1 in ccRCC increased secretion of proangiogenic factors such as IL-6, IL-8 and VEGF compared to control or MCPIP1 overexpressed cells. In consequence, this leads to internalization of VE-cadherin, relaxation of cell-cell junctions and activation of endothelial cells migratory potential. Concominantly, MCPIP1 level affects the expression of CXCR4, SDF-1 and c-Met genes, which are responsible for cell division and metastasis. Importantly, MCPIP1 overexpression reduces the number of lung micrometastases and inhibits the EMT process.

Further analysis of clinical samples of patients at various stages of ccRCC, has shown that MCPIP1 protein level decreases with cancer progression. Furthermore, the level of c-Met receptor and other factors involved in cancer progression increase with successive stages of the disease.

In the last part of the study, it was observed that therapy with small molecules such as sunitinib and sorafenib increases the aggressiveness of cancer cells and amount of lung metastases. Moreover, elevated phosphorylation of c-Met receptor with simultaneous decrease in the level of MCPIP1 may be a potential mechanism of resistance to sunitinib and sorafenib treatment.

In summary, the MCPIP1 protein can be one of the factors modulating tumor development and marker of ccRCC progression. MCPIP1 controls cell proliferation, migration and secretion of proangiogenic factors. Furthermore, dependent regulation of MCPIP1 protein and c-Met receptor and their effect on drug resistance has been proven during research. Considering the results presented in this dissertation and published by other researchers, it is plausible that MCPIP1 may act as universal tumor suppressor.

Pauline Moore

Kejia Liu