

Streszczenie

Rak nerkowokomórkowy (RCC) jest jednym z najczęstszych nowotworów urologicznych na świecie, przy czym najczęstszym jego podtypem jest jasnokomórkowy rak nerki, który stanowi około 75% przypadków RCC. Przeżycie 5-letnie obserwuje się nawet u 90% chorych z wczesną, zlokalizowaną chorobą, które spada do 12% u chorych z odległymi przerzutami. Najczęstszymi miejscami przerzutów są płuca, węzły chłonne, kości, wątroba oraz nadnercza. Zmienny wzorzec rozprzestrzeniania się choroby nowotworowej z przerzutowym jasnokomórkowym rakiem nerki powoduje tylko częściową skuteczność obecnie stosowanych terapii. Przerzutowanie i oporność na leczenie wynikają ze zmiany fenotypu komórek nowotworowych w procesie przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT). W tym procesie komórki epitelialne nabierają cech komórek mezenchymalnych, wówczas komórka traci połączenia międzykomórkowe, zmienia polaryzację na rzecz migracji i inwazyjności zyskując cechy komórki mezenchymalnej. Zaczyna także aktywować specyficzne czynniki transkrypcyjne i zmienia profil ekspresji genów kodujących białka macierzy zewnątrzkomórkowej oraz białek cytoszkieletu w komórce, co może skutkować wzrostem oporności na leczenie oraz nabywaniem właściwości migracyjnych i inwazyjnych, prowadzących do przerzutowania.

Ważnym induktorem procesu EMT jest stan zapalny. Negatywnym regulatorem stanu zapalnego jest białko MCPIP1, które regulując odpowiedź immunologiczną może przyczynić się do zahamowania progresji nowotworu. Szczególną funkcją MCPIP1, która cieszy się dużym zainteresowaniem naukowców, jest aktywność RNazowa, dzięki której białko to może regulować poziom ekspresji mRNA i miRNA. MCPIP1 specyficznie trawi szereg pre-miRNA pośrednio regulując ekspresję genów. Obecnie prowadzonych jest wiele badań nad identyfikacją miRNA oraz ich wpływu na proces nowotworzenia. Istotne zmiany pewnych miRNA w krwiobiegu oraz mikrośrodowisku guza są charakterystyczne dla poszczególnych typów nowotworów. MCPIP1 degradując pre-miRNA działa antagonistycznie względem kompleksu enzymatycznego DICER odpowiedzialnego za powstawanie dojrzałego miRNA.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie wpływu białka MCPIP1 na proces aktywności migracyjnej komórek nowotworowych, poziom genów supresorowych jasnokomórkowego raka nerki oraz aktywność szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina i poziom

niektórych miRNA w procesie przejścia epitelialno-mezenchymalnego.

W pierwszej części doświadczeń zbadaliśmy, w jaki sposób białko MCPIP1 wpływa na proces EMT w liniach komórkowych jasnokomórkowego raka nerki oraz tkankach nowotworowych pacjenta. Podczas progresji jasnokomórkowego raka nerki poziom genów związanych z progresją nowotworową oraz fenotypem mezenchymalnym znacząco wzrasta. Ponadto, nadekspresja MCPIP1 w komórkach jasnokomórkowego raka nerki zmniejsza poziom wimentyny, N-kadheryny i β -kateniny oraz podwyższa poziom E-kadheryny, co wskazuje, że MCPIP1 może kontrolować nabywanie cech mezenchymalnych. Natomiast, brak aktywności RNazowej MCPIP1 powoduje wzrost markerów mezenchymalnych i spadek E-kadheryny. W modelu in vivo, po ksenotransplantacji komórek Caki-1 pozbawionych aktywności RNazowej białka MCPIP1 do myszy szczepu NOD-SCID, zaobserwowaliśmy tożsame zmiany z tymi, które występują w liniach komórkowych w poziomie E-kadheryny i N-kadheryny oraz wzrost fibronektyny. Co więcej, utrata aktywności RNazowej MCPIP1 powoduje wzrost zdolności do przerzutowania komórek nowotworowych w modelu in vivo oraz indukuje wzrost poziomu aktywnych form β -kateniny oraz wpływa na jej lokalizację jądrową. Wyniki sekwencjonowania miRNA umożliwiły zidentyfikowanie kilku miRNA zależnych od aktywności RNazowej MCPIP1. Dzięki wykorzystaniu bazy danych Diana microT-CDS odkryliśmy, że miRNA-519a-3p, miRNA-519b-3p i miRNA-520c-3p hamują produkcję mRNA lub proces translacji genów SFRP4, ZNRF3, KREMEN1, CXXC4 i CSNK1A1, które działają jako negatywne regulatory sygnalizacji Wnt i obniżają poziom aktywnej β -kateniny.

Analiza próbek pacjentów pochodzących z guzów jasnokomórkowego raka nerki wykazała wzrost β -kateniny wraz z progresją choroby nowotworowej z jednoczesnym spadkiem E-kadheryny. Dodatkowo, zaobserwowaliśmy spadek inhibitorów szlaku Wnt oraz wzrost aktywnej formy β -kateniny i docelowych genów LEF1 i TCF3 wraz ze wzrostem zaawansowania nowotworu. Wykazaliśmy także niski poziom genów supresorowych PTEN, RECK oraz TIMP3 i wysoki poziom kilku metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej oraz genów skorelowanych z migracją wraz z progresją nowotworu. Wyniki te odzwierciedlały rezultaty uzyskane w modelu komórkowym oraz w badaniach in vivo. Nadekspresja MCPIP1 indukuje ekspresję PTEN, RECK i TIMP3 oraz hamuje apoptozę i aktywację prometastatycznych szlaków sygnałowych. Ostatnie nasze wyniki dowiodły, że MCPIP1 zapobiega transformacji

Streszczenie rozprawy doktorskiej mgr Judyty Górka pt. „Rola wpływu białka MCPIP1 na kluczowe elementy osi sygnalizacyjnej procesu przejścia epitelialno-mezenchymalnego”

morfolologicznej i drastycznie ogranicza migrację komórek jasnokomórkowego raka nerki. MCPIP1 obniża poziomy białek Rho i zmniejsza fosforylację kinaz FAK oraz Src, prowadząc do zahamowania aktywności migracyjnej.

Podsumowując, wyniki otrzymane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wskazały na rolę MCPIP1 jako możliwego regulatora procesu EMT, który zapobiega nabywaniu przez komórki fenotypu mezenchymalnego. MCPIP1 bierze udział w regulacji poziomu supresorów nowotworowych oraz potencjału migracyjnego, a w konsekwencji w rozwoju i progresji jasnokomórkowego raka nerki.

Judyta Górka

Kelcy Ma

Summary

Renal cell carcinoma (RCC) is one of the most common urological neoplasms in the world, with clear cell renal cell carcinoma being the most common subtype, accounting for approximately 75% of RCC cases. 5-year survival is observed in up to 90% of patients with early, localized disease, but it drops to 12% in patients with distant metastases. The most common sites for metastasis are the lungs, lymph nodes, bones, liver, and adrenal glands. The changing pattern of the spread of neoplastic disease with metastatic clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) causes only partial effectiveness of the currently used therapies. Metastasis and treatment resistance result from changes in the phenotype of cancer cells during the epithelial-mesenchymal transition (EMT). In this process, epithelial cells acquire the features of mesenchymal cells, then the cell loses intercellular connections, changes its polarity in favor of migration and invasiveness, gaining the features of a mesenchymal cell. It also starts to activate specific transcription factors and changes the expression profile of extracellular matrix proteins and cytoskeleton proteins in the cell, which may result in an increase in treatment resistance and the acquisition of migratory and invasive properties leading to metastasis.

An important inducer of EMT is inflammation. The negative regulator of inflammation is the MCP1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1 Induced Protein 1), which by regulating the immune response may contribute to the inhibition of tumor progression. A special function of MCP1, which is of great interest to scientists, is its RNase activity, thanks to which it can regulate the level of mRNA and miRNA expression. MCP1 specifically cleaves a number of pre-miRNAs indirectly regulating gene expression. Currently, there is a lot of research on the identification of miRNAs and their impact on the neoplastic process. Significant changes in certain miRNAs in the bloodstream and tumor microenvironment are specific to each type of tumor. MCP1 by degrading pre-miRNA acts antagonistically to the DICER enzyme complex responsible for the formation of the mature miRNA.

The aim of this doctoral dissertation was to determine the influence of the MCP1 protein in the process of epithelial-mesenchymal transition, on the migration activity of neoplastic cells, on the level of suppressor genes of clear cell renal cell carcinoma, the activity of the Wnt/ β -catenin signaling pathway and the level of some miRNAs.

In the first part of the experiment, we examined how the MCPIP1 protein influences the EMT process in clear cell renal cell carcinoma cell lines and the patient's cancerous tissues. During the progression of ccRCC, the level of genes associated with neoplastic progression and the mesenchymal phenotype increases significantly. Moreover, overexpression of MCPIP1 in ccRCC cells reduces the levels of vimentin, n-cadherin and β -catenin and increases the level of e-cadherin, indicating that MCPIP1 can control the acquisition of mesenchymal features. On the other hand, the lack of RNase activity of MCPIP1 causes an increase of mesenchymal markers and a decrease in e-cadherin. In the NOD-SCID mouse model after xenotransplantation of Caki-1 cells lacking the RNase activity of the MCPIP1 protein, we observed the same changes as those that occur in the cell lines in the level of e-cadherin and n-cadherin and an increase of fibronectin. Moreover, the loss of the RNase activity of MCPIP1 increases the metastatic capacity of the tumor in an in vivo model and induces the growth of active forms of β -catenin and its nuclear localization. The results of miRNA sequencing allowed the identification of several miRNAs dependent on the RNase activity of MCPIP1. Using the Diana microT-CDS database, we found that miRNA-519a-3p, miRNA-519b-3p and miRNA-520c-3p inhibit mRNA production or the translation process of the genes: SFRP4, ZNRF3, KREMEN1, CXXC4 and CSNK1A1, which act as negative regulators Wnt signaling and lower the level of active β -catenin.

Analysis of ccRCC samples from patients' tumors showed an increase in β -catenin with the progression of the neoplastic disease with a concomitant decrease in e-cadherin. Additionally, a decrease in inhibitors of the Wnt pathway and an increase the active form of β -catenin and the target genes LEF1 and TCF3 were observed with increasing tumor advancement. Low levels of suppressor genes PTEN, RECK and TIMP3 and high levels of several matrix metalloproteinases and genes correlated with migration with tumor progression have been demonstrated. These results reflected the results obtained in in vitro and in vivo. Overexpression of MCPIP1 induces the expression of PTEN, RECK and TIMP3 and inhibits apoptosis and activation of prometastatic signaling pathways. Recent results have shown that MCPIP1 prevents morphological transformation and drastically reduces migration of ccRCC cells. MCPIP1 lowers Rho GTPase levels and reduces the phosphorylation of FAK and Src kinases, leading to inhibition of migratory activity.

Streszczenie rozprawy doktorskiej mgr Judyty Górka pt. „Rola wpływu białka MCPIP1 na kluczowe elementy osi sygnalizacyjnej procesu przejścia epithelialno-mezenchymalnego”

In summary, the results obtained in this doctoral dissertation indicated the role of MCPIP1 as a possible regulator of the EMT process, which prevents cells from acquiring the mesenchymal phenotype MCPIP1 is involved in the regulation of tumor suppressor levels and the migration potential, and consequently in the development and progression of ccRCC.

Judyta Górka

Krzysztof Pule