

Streszczenie

Tkanka tłuszczowa będąc źródłem swoistych hormonów – adipokin, nie tylko aktywnie uczestniczy w przemianach metabolicznych organizmu, ale wykazuje również ważną funkcję endokrynną. Adipokiny działając zarówno lokalnie jak i ogólnoustrojowo kontrolują takie procesy jak regulacja odżywiania, różnicowanie adipocytów czy funkcjonowanie układu odpornościowego. W aspekcie biologii rozrodu wykazano, że adipokiny biorą udział w prawidłowym funkcjonowaniu żeńskiego układu rozrodczego oraz aktywnie uczestniczą w kontroli osi podwzgórze-przysadka-gonady. Badania prowadzone na przestrzeni ostatnich lat pokazały, że zmiany w poziomie ekspresji adipokin towarzyszą różnym procesom patologicznym w tym nowotworzeniu. Co więcej, mogą regulować liczne procesy zachodzące w komórkach nowotworowych, takie jak proliferacja czy migracja.

Apelina i chemeryna to adipokiny, których ekspresję opisano w komórkach jajnika jednak ich rola w nowotworach tej tkanki wciąż jest słabo scharakteryzowana. Apelina wiążąc się ze swoim receptorem (APLNR) aktywuje ścieżki sygnałowe, pozwalające kontrolować m.in. funkcje metaboliczne, proliferację czy przeżycie komórek. Sugeruje się, że poprzez te szlaki może być zaangażowana w progresję nowotworów. Badania wskazują również na zwiększoną ekspresję apeliny w niektórych nowotworach. Dane dotyczące stężenia chemeryny w guzach i korelacji z rokowaniem nie są jednoznaczne, ponieważ zaobserwowano zarówno wysoki jak i niski profil jej ekspresji w zależności od miejsca wystąpienia nowotworu.

Poza nadrzędną kontrolą ekspresji adipokin przez tkankę tłuszczową, wpływ na ich poziom mogą posiadać lokalnie występujące hormony oraz czynniki wzrostu. Działanie to wykazują poprzez receptory estrogenowe α/β (ER α/β) oraz receptor aktywowany proliferatorami peroksysomów gamma (PPAR γ). Wskazuje to, że związki zaburzające funkcje endokryne obecne w surowicy krwi ludzi takie jak bisfenol A (BPA) oraz jego mniej znane pochodne tetrabromobisfenol A (TBBPA) i tetrachlorobisfenol A (TCBPA) mogą potencjalnie wpływać na ich ekspresję poprzez zdolność do aktywacji wyżej wymienionych receptorów.

Rak jajnika dzięki swoim niespecyficznym objawom, najczęściej diagnozowany jest w zaawansowanym stadium, stając się drugim co do częstości występowania nowotworem narządów płciowych u kobiet w Polsce. Zgodnie ze strukturą anatomiczną nowotwory jajnika możemy podzielić na trzy główne kategorie: nowotwory nabłonkowe stanowiące 90% guzów złośliwych jajnika, nowotwory zrębu liczące 5–6% oraz nowotwory pochodzenia zarodkowego odpowiedzialne za 2–3% przypadków. Złożoność każdego z typów i brak skutecznego leczenia powoduje, że pilnie potrzebne są nowe strategie zapobiegawcze w celu zmniejszenia śmiertelności.

Na podstawie zebranych informacji i przytoczonych argumentów, pierwszym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie czy ludzkie linie nowotworowe jajnika wykazują ekspresję apeliny i chemeryny oraz jak wpływają na ich proliferację samodzielnie jak i w łącznym podaniu z endogennymi związkami: 17 β -estradiolem (E2) oraz insulinopodobnym czynnikiem wzrostu 1 (IGF-1). W drugiej części rozprawy sprawdzono czy egzogenne związki hormonalnie czynne (BPA, TBBPA oraz TCBPA) mogą modulować poziom ekspresji badanych adipokin oraz zmieniać ich wpływ na proliferację komórek. Jako

model badawczy wybrano linie komórek nowotworowych jajnika pochodzenia nabłonkowego oraz linie ziarniszcza jajnika, należące do typu nowotworów zrębu.

Przeprowadzone badania wykazały, że ekspresja genu i białka dla apeliny była na tym samym poziomie w linii prawidłowej oraz w liniach nowotworowych nabłonka jajnika. Natomiast, w porównaniu do linii nabłonkowych jajnika, ekspresja apeliny w ziarniszczakach jajnika była dwukrotnie wyższa. Odwrotną zależność zaobserwowano w poziomie ekspresji APLNR, który wykazał istotnie wyższy poziom w liniach nabłonkowych niż w ziarniszczakach jajnika. Poziom ekspresji receptora okazał się istotny w odpowiedzi komórek na apelinę, ponieważ stymulowała ona proliferację jedynie w komórkach nowotworowych nabłonka jajnika, natomiast nie wpływała na żadną z linii ziarniszcza jajnika. Co ciekawe, w linii nabłonkowej OVCAR-3 nowotworu jajnika, apelina zniosła stymulujący proliferację wpływ E2. Próba wyjaśnienia antagonistycznego współdziałania apeliny i E2 w linii OVCAR-3 wykazała, że nie zachodzi ona poprzez aktywację wspólnych ścieżek sygnałowych ERK1/2 oraz PI3K. Natomiast, inkubacja komórek OVCAR-3 z inhibitorami receptora apeliny i ER α zniosła stymulujące działanie apeliny jak i E2 na proliferację komórek. Efektu takiego nie zaobserwowano w obecności inhibitorów receptora ER β oraz błonowego receptora estrogenów związanego z białkami G (GPR30). Otrzymane wyniki sugerują, że antagonistyczne działanie apeliny na E2 stymulowaną proliferację w linii komórek nowotworowych nabłonka jajnika, zachodzi na skutek interakcji APLNR z ER α . W linii COV434 pomimo, że apelina nie wpływała na proliferację komórek tego typu nowotworu zaobserwowano, że zniosła stymulujący proliferację efekt IGF-1. Podobnie, nie zaobserwowano, aby antagonistyczne współdziałanie apeliny i IGF-1 w linii COV434 było mediowane za pośrednictwem ścieżek sygnałowych ERK1/2 i PI3K. Natomiast, zastosowanie inhibitora receptora apeliny, zniosło proliferacyjny efekt IGF-1 w linii COV434, co sugeruje interakcję między APLNR i receptorem insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF1R).

Następnie wykazano, że ekspresja chemeryny i jej receptora była na tym samym poziomie w linii prawidłowej oraz liniach nowotworowych nabłonka jajnika. W porównaniu do nich odnotowano niższą ekspresję chemeryny oraz wyższą jej receptora w ziarniszczakach jajnika. Chemeryna nie wpływała na proliferację komórek w żadnej z badanych linii komórkowych. Dodatkowo, chemeryna w żadnej z zastosowanych dawek nie zmieniała proliferacyjnego efektu E2 w komórkach OVCAR-3 oraz IGF-1 w obu typach nowotworu jajnika (linii OVCAR-3 oraz COV434).

W drugiej części niniejszej rozprawy doktorskiej wykazano, że BPA, TBBPA oraz TCBPA zwiększały ekspresję apeliny oraz nie wpływały na jej receptor w komórkach OVCAR-3. Wiedząc, że badane egzogenne związki hormonalnie czynne mogą wykorzystywać receptory jądrowe do kontroli ekspresji adipokin, w celu sprawdzenia ścieżki działania zastosowano ich farmakologiczne inhibitory. Wykazano, że BPA zwiększała ekspresję apeliny w komórkach nowotworowych nabłonka jajnika poprzez PPAR γ , bez udziału receptorów estrogenowych. Odmienne związki te regulowały ekspresję chemeryny, obniżając jej poziom w linii COV434, natomiast nie wpływały na jej receptor. Zastosowanie inhibitorów wykazało, że badane związki zmniejszają ekspresję chemeryny, zarówno przez receptor ER α/β jak i PPAR γ . Ponadto zaobserwowano, że zablokowanie jednego z receptorów spowodowało dysfunkcję drugiego, co wskazuje, że

kontrola ta zachodzi na skutek współdziałania między tymi receptorami. Szczególnie interesujący wydał się fakt hamowania przez tę adipokinę proliferacyjnego efektu BPA i TBBPA na komórki nowotworowe jajnika.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej wykazały, że apelina oraz chemeryna są produkowane i wydzielane przez linie komórek nowotworowych jajnika. Ponadto, nowotwory te charakteryzują się ekspresją receptorów dla tych adipokin, co wskazuje na możliwość ich autokrynnego działania na te komórki. Otrzymane wyniki obrazują dwojakie działanie apeliny. W nowotworze nabłonkowym apelina działa mitogenne na komórki, natomiast interakcja z endogennymi związkami ukazuje jej antagonistyczne działanie w obu typach nowotworów. Ponadto, zwrócono uwagę jak ważne jest badanie interakcji hormonów endogennych z egzogennymi związkami hormonalnie czynnymi. BPA, TBBPA oraz TCBPA podnosi ekspresję apeliny w linii nowotworowej nabłonka jajnika, która działa mitogenne w tych komórkach. Natomiast, BPA i jego pochodne obniżają ekspresję chemeryny, która w łącznym podaniu z badanymi związkami hamuje ich zdolność do stymulacji proliferacji.

Podsumowując wykazano, że aktywność apeliny i chemeryny produkowanych przez komórki nowotworowe jajnika jest różna i zależy od jego typu. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły zakwalifikować apelinę do adipokin o charakterze pronowotworowym, natomiast chemerynę do adipokin działających antynowotworowo. Ponadto, po raz pierwszy ukazano różnice w działaniu endogennych związków i egzogennych związków hormonalnie czynnych na aktywność badanych adipokin w komórkach nowotworowych jajnika.



Małgorzata Hoffman - Młodkiewicz

Streszczenie w języku angielskim

Adipose tissue as a source of specific hormones – adipokines, not only actively participate in the metabolism of the human body, but also play an important endocrine function. Acting both locally and systemically, it controls processes such as nutrition, adipocyte differentiation and the immune system functions. In reproductive biology it has been shown that adipokines participate in the proper functioning of the female reproductive system and actively participate in the control of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. Research conducted in recent years has shown that adipokines play a role not only in physiological conditions, but their disturbed expression leads to various pathologies. Adipokines regulate some processes within cancer cells, such as proliferation and migration.

Apelin and chemerin are adipokines which expression has been described in ovarian cells, but their role in ovarian cancer is still poorly characterized. Apelin, by binding to its receptor (APLNR), activates signaling pathways which control metabolic functions, cell proliferation and survival. It was suggested that activation of these signaling pathways may be involved in cancer progression. In addition, some research indicates increased apelin expression in cancers. Data focused on the chemerin concentration in tumors are not consistent, as both high and low expression profile was observed depending on the tumor location.

Beyond primary control of adipokines expression by adipose tissue, their level can be controlled locally by other hormones and growth factors. Their activity is mediated by nuclear receptors such as estrogen receptors α/β (ER α/β) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). This indicates that exogenous compounds that possess hormonal activity such as bisphenol A (BPA) and its less known halogenated derivatives tetrabromobisphenol A (TBBPA) and tetrachlorobisphenol A (TCBPA) may potentially affect adipokines expression through their ability to activate nuclear receptors.

Ovarian cancer, due to its non-specific symptoms, most often is diagnosed at advanced stage, becoming the second most common gynecological cancer in women in Poland. According to the anatomical structure, ovarian tumors are divided into three main categories: epithelial ovarian cancer accounts for 90% of malignant ovarian tumors, while 5–6% of such tumors are sex cord-stromal tumors and 2–3% are germ cell tumors. The complexity of each type and the lack of effective treatment indicates that new prevention strategies are urgently needed to reduce mortality.

Based on gathered information, the first aim of presented doctoral dissertation was to determine whether apelin and chemerin are expressed in human ovarian cancer cell lines, and how they affect these cells alone and in combination with endogenous 17 β -estradiol (E2) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1). In the second part of the dissertation, it was examined whether exogenous hormonally active compounds (BPA, TBBPA and TCBPA) could affect apelin and chemerin expression and alter their effect on cell proliferation. Epithelial ovarian cancer cell lines and ovarian granulosa tumour cell lines which belong to the sex cord-stromal tumors were used as the research model.

The basal apelin gene expression was similar in non-cancer cell line and epithelial ovarian cancer cell line. In comparison to epithelial cell lines, in granulosa tumour cell lines apelin expression was 2-fold higher. In epithelial ovarian cancer cell lines, the basal APLNR mRNA level was higher than in granulosa tumour cell

lines. Apelin receptor expression level was important in cell response to apelin. Apelin stimulated cell proliferation in epithelial ovarian cancer cells and did not affect granulosa tumor cell proliferation. Interestingly, effect of co-treatment with apelin and E2 has shown that apelin abrogated the E2-induced increase in epithelial cancer cell line OVCAR-3 proliferation. The attempt to explain the antagonistic effect of apelin and E2 on OVCAR-3 cell proliferation showed that the ERK1/2 and PI3K pathways are not involved in this effect. However, pharmacological inhibition of APLNR and ER α abrogated the effects of E2 and apelin on proliferation of OVCAR-3 cells, while pharmacological inhibition of ER β and GPR30 did not. These results suggest that crosstalk occurs between APLNR and ER α in epithelial ovarian cancer cells. Apelin did not affect proliferation of granulosa tumour cell line COV434. However, proliferation of COV434 cells was decreased to the control level upon co-treatment with apelin and IGF-1. Similarly, blockade of the ERK1/2 and PI3K indicate that this signaling pathways are not involved in the antagonistic effect of apelin on IGF-1-induced proliferation of COV434 cells. However, pretreatment with the APLNR inhibitor abrogated the stimulatory effect of IGF-1 on proliferation of COV434 cells. These data suggest that negative crosstalk occurs between APLNR and insulin like growth factor 1 receptor (IGF1R) in COV434 cell line.

The basal expression levels of chemerin and its receptor were similar among non-cancer cell line and epithelial cancer cell line. The basal mRNA level of chemerin was lower in a granulosa tumor cell lines than in epithelial cancer cells, whereas chemerin receptor expression was higher. Chemerin does not affect cell proliferation in any of the tested cell lines. Moreover, chemerin did not influence the stimulatory effect of E2 on proliferation of OVCAR-3 cells and IGF-1 on proliferation of either cell line (OVCAR-3 and COV434 cell lines).

In the second part of the doctoral dissertation it was shown that BPA, TBBPA and TCBPA increased apelin and had no effect on APLNR expression in OVCAR-3 cells. To investigate the mechanism by which BPA regulates adipokines expression pharmacological inhibitors of nuclear receptors were used. It was found that BPA up-regulates apelin expression in epithelial ovarian cancer cells through PPAR γ and estrogen receptor pathway is not involved in this effect. Next, it was shown that BPA and its derivatives decreased chemerin expression only in granulosa cell tumor COV434, without affecting chemerin receptor. In COV434 cells BPA, TBBPA and TCBPA down-regulate chemerin expression both by PPAR γ and ER α/β . Moreover, it was observed that abrogate of one receptor results in disfunction of the other, indicating that crosstalk between PPAR γ and ER α/β plays an important role in the regulation of chemerin expression in granulosa cell tumors. Furthermore, it was found that proliferative effect of BPA and TBBPA was abrogate in co-treatment with chemerin.

Presented data has shown that apelin and chemerin are produced and secreted by ovarian cancer cell lines. Moreover, expression of their receptors on ovarian cancer cells indicate the possibility of these adipokines to act in autocrine manner. Obtained results indicate that apelin works in two different manners. Apelin acts as a mitogenic factor in epithelial cancer cells, while in co-treatment with endogenous compound, it downregulates their proliferative effect in both types of ovarian cancer. Moreover, it was shown how important is study the interaction of hormones with exogenous hormonally active compounds. BPA, TBBPA and TCBPA upregulate expression of apelin which has mitogenic effect on epithelial ovarian cancer cells.

Further, it was shown that tested compounds downregulate chemerin, which abrogate their proliferative effect on granulosa cell tumour.

In conclusion, it has been shown that activity of apelin and chemerin produced by ovarian cancer cell vary between and is depend on type. Obtained results allowed classified apelin as a pro-carcinogenic adipokine, whereas chemerin as an anti-carcinogenic. Moreover, for the first time differences in the action of endogenous and exogenous compounds with adipokines in ovarian cancer cell lines were demonstrated.



Marta Hoffmann-Mitodianska