

Praca doktorska: “Przełamywanie oporności raka jasnokomórkowego nerki na ewerolimus w ujęciu medycyny systemowej”.

Autor: Anna Kornakiewicz

Praca wykonana pod kierunkiem promotora: Profesora Cezarego Szczylika (Warszawski Uniwersytet Medyczny).

Ko - promotor: Profesor Witold Dzwinel (Akademia Górniczo -Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie).

Streszczenie

Rak jasnokomórkowy nerki jest najczęstszym typem raka nerki – stanowi 70-80% przypadków tego nowotworu. Terapie celowane zmieniły paradygmat leczenia zaawansowanego raka jasnokomórkowego nerki, ale mimo przełomu w leczeniu, oporność na terapie celowane jest powszechna. Jest to nowotwór wysoce lekooporny i stanowi potencjalny model do poznawania mechanizmów lekooporności.

Ewerolimus to doustny inhibitor mTOR zatwierdzony do leczenia pacjentów z zaawansowanym rakiem nerki, którzy wykazali progresję podczas leczenia inhibitorami kinaz tyrozynowych – sunitinibem i sorafenibem. MTOR jest kinazą proteinową zaangażowaną w ścieżkę sygnalizacyjną PI3K/AKT z centralną rolą w kontroli wzrostu i przeżycia komórek oraz angiogenezy. Sieć mTOR jest bardzo złożona i modulowana przez liczne ścieżki przekazujące sygnał od wielu receptorów. Wielokrotne i częste dysregulacje ścieżki mTOR w ludzkich nowotworach, w tym w raku nerki, czynią z niej częsty cel w projektowaniu nowych terapii przeciwnowotworowych.

Obiecującym podejściem do przełamywania lekooporności na ewerolimus jest połączenie w terapii kilku leków, które blokują różne etapy przekazywania sygnału w tej samej lub w różnych ścieżkach molekularnych sieci mTOR. Zrozumienie leżących podstaw mechanizmów lekooporności w ścieżkach mTOR może pozwolić przewidzieć skuteczność lub niepowodzenia danego skojarzenia leków. Wybór kandydatów związków do połączenia w terapii z inhibitorem mTOR powinien być zatem oparty na genetyce i biologii raka nerki, a w szczególności na znajomości złożonych interakcji w ścieżkach sygnalizacyjnych. Dlatego też w pracy skupiono się na wyłonieniu profilu ekspresji genetycznej komórek raka nerki oraz analizowano interakcje w sieci mTOR. Głównym celem pracy było rozwinięcie modelowego podejścia dla racjonalnego wyboru tragetów do badań przedklinicznych

z nadzieją na znalezienie nowych związków do przełamania oporności na inhibitory mTOR.

Analiza aktualnej wiedzy na temat sieci mTOR na tle założeń koncepcji modulacji terapeutycznej pozwala wstępnie wyselekcjonować receptory do poszukiwania kandydatów nowych leków. Koncepcja wykorzystania modulacji terapeutycznej ścieżki mTOR do projektowania terapii skojarzonej raka nerki opiera się na kilku prostych założeniach. Po pierwsze, pod wpływem inhibitorów mTOR może się zwiększać ekspresja wybranych receptorów powierzchniowych i/lub elementów ścieżek sygnalizacyjnych prowadzących od tych receptorów w komórkach raka nerki. Elementy ulegające zwiększonej ekspresji na lub w komórkach raka nerki mogą zatem stanowić cel terapeutyczny – molekularny punkt uchwytu do terapii skojarzonej z ewerolimusem. W celu rozwinięcia strategii poszukiwania nowych kandydatów leków do terapii skojarzonej z inhibitorami mTOR zarysowano podstawy najbardziej obiecujących hipotez modulacji terapeutycznej, w tym modulacji hormonalnej: estrogenowej, insulinowej, androgenowej, melatoninowej i prolaktynowej.

Badania ukierunkowano na komórki macierzyste raka nerki. Jedną z teorii wyjaśniających proces nowotworzenia zakłada, że nowotworowe komórki macierzyste odgrywają kluczową rolę w powstawaniu raka. Podejrzewa się, że są przyczyną występowania przerzutów i nawrotów choroby nowotworowej. Ostatnie badania pokazały, że ścieżka sygnalizacyjna PI3K-AKT-mTOR odgrywa istotną rolę w macierzystych komórkach nowotworowych, w ich odnowie i oporności, co uważa się za podstawę niepowodzenia leczenia i nawrotów raka jak i tworzenia się przerzutów. Stąd idea, aby badać profil ekspresji genetycznej komórek macierzystych raka nerki i przewidzieć jak kombinacje leków - w tym inhibitorów mTOR – mogą na nie działać.

Przy opracowywaniu metody indukcji oporności na ewerolimus w standardowych warunkach w normoksji zaadaptowano skrócony protokół indukcji lekooporności z wykorzystaniem mniejszej ilości leku łącznie. Przyjęto, że w prowadzonych eksperymentach zmiana w dawce IC₅₀ dla ewerolimusu będzie miarą zmiany potencjału nabywania lekooporności przez badane komórki. W toku eksperymentów prowadzonych z testem Alamar Blue stwierdzono zróżnicowaną wartość dawki IC₅₀ w poszczególnych liniach komórkowych raka nerki, w tym linii z guza pierwotnego, z przerzutów do płuc, linii z guza całkowitego oraz komórek macierzystych. Hamowanie podziałów populacji komórek okazało się zależne od dawki w zakresie stężeń 1-9 μ M. Najbardziej odporne okazały się komórki o fenotypie komórek macierzystych raka jasnokomórkowego nerki – dawka IC₅₀ przekroczyła badany zakres stężeń leków.

Do ustalenia dawki leku do wykonania eksperymentów mikromacierzowych jako punkt odniesienia wybrano 3 dzień hodowli z ewerolimusem. Wybrano dwie linie komórkowe: ccRCC-PCSC

-linię z guza całkowitego, zawierającą komórki macierzyste oraz ccRCC-CSC – komórki macierzyste raka nerki. Do przeprowadzenia eksperymentów z mikromacierzami komórki inkubowano z dawką 4 μ M dla linii ccRCC-PCSC i 5 μ M dla linii ccRCC- CSC.

Ustanowiono kryteria do analizy danych z mikromacierzy - analizowano targety w ścieżkach powiązanych z siecią mTOR, które pogrupowano na ścieżki hormonalne, angiogenne, metaboliczne i immunologiczne. Kolejnym kryterium było dodanie do analizy genów, których regulacja powiązana jest ze ścieżką genu *MYC*. Wiadomo, że sama inaktywacja tego pojedynczego genu w guzach, w których gen ulega nadekspresji może przyczynić się do regresji guza. Wybór targetów regulowanych przez *MYC*, może więc być bardzo istotnym etapem pozwalającym uprościć analizę funkcjonalną ścieżek w sieci mTOR.

Różnice w profilach ekspresji genów zostały zaobserwowane pomiędzy komórkami traktowanymi ewerolimusem i kontrolą bez leku w liniach ccRCC-CSC i ccRCC-PCSC. Leczenie ewerolimusem ujawniło zmiany w ekspresji genetycznej elementów kompleksu mTORC1 (RPTOR, DEPTOR) oraz elementów znajdujących się w sieci mTOR poniżej i powyżej kompleksów (RPS6KB1, EIF4EBP1, PDK1, AKT1, AKT2, TSC2, VHL) w obu liniach komórkowych. Jednakże nie zaobserwowano żadnych zmian ekspresji elementów kompleksu mTORC2 (mSIN1, Rictor, Protor). Dlatego wnioskiem jest, że badane dawki ewerolimusy nie były relatywnie wysokie. W przypadku elementów poniżej kompleksu mTOR – zarówno białko 4EBP1 jak i S6K1, ulegają zmniejszonej ekspresji pod wpływem ewerolimusy w komórkach macierzystych – zatem lek działa skutecznie w komórkach macierzystych raka nerki.

Analiza wyników z mikromacierzy nie wykazała istotnie statystycznych zmian w ekspresji genu *MYC* pod wpływem ewerolimusy. Natomiast analiza zestawów genów powiązanych ze ścieżką *MYC* przeprowadzona przy pomocy oprogramowania GSEA – narzędzia bioinformatycznego do analizy reprezentacji poszczególnych grup genów, dostarczyła listy genów powiązanych z regulacją ścieżki *MYC*. Integrując dane ekspresyjne z danymi dotyczącymi sieci (Human Interactome) przy pomocy oprogramowania Cytoscape, zwizualizowano elementy ścieżek sygnalizacyjnych znajdujące się powyżej genu *MYC*, które mogą ulegać zmianie ekspresji pod wpływem ewerolimusy.

Ważne, aby zauważyć, że ekspresja elementów powiązanych ze ścieżką insulinową (*IGFBP3*, *IGF1R*, *ISR1*, *ISR2*) i androgenową (*ADTRP*, *AIG1*, *PMEPA1*) była zmieniona w obu badanych liniach komórkowych. Nie było zmiany w ekspresji ścieżki melatoninowej, ale można zauważyć zmianę w elementach ścieżki estrogenowej (*ESR1*) i prolaktynowej (*PRLH*, *PRLHR*, *PREB*). Ekspresja genów

powiązana z metabolizmem kości i wapnia (*VDR*, *TRPV5*, *SPARC*, *CNRIP1*) uległa zmianie w obu badanych liniach. Ekspresja genów związanych ze ścieżkami angiogennymi (*HIF1alfa*, *VEGFB*, *VEGFC*) była zmieniona w obu badanych liniach komórkowych.

Układ eksperymentalny porównujący heterogeniczną populację komórek guza zawierających komórki macierzyste z linią komórek macierzystych dostarcza wglądu w biologię komórek macierzystych raka nerki. Ewerolimus hamuje obie linie komórkowe, ale co ważne w komórkach macierzystych raka nerki lek może spowodować zmniejszenie ekspresji większości genów już na wczesnym etapie leczenia umiarkowanymi dawkami. Jednakże trudno stwierdzić jednoznacznie na podstawie przeprowadzonych badań czy profil genetyczny jest charakterystyczny dla komórek macierzystych raka nerki. W czasie selekcji lekiem, komórki mogą się różnicować i mogą nie wykazywać charakterystycznego dla siebie profilu metabolicznego. Pokazano w poprzednich badaniach, że komórki macierzyste wykazują metaboliczne przesunięcie profilu i tracą unikalny fenotyp metaboliczny po procesie różnicowania. Bardzo trudno wyłonić charakterystyczne profile genetyczne komórek w czasie selekcji lekiem, ponieważ mogą one różnicować się niezależnie od leku jak i pod wpływem leku. Dalsza praca nad profilowaniem ekspresji jest potrzebna, aby uzyskać solidny wgląd w mechanikę wpływu ewerolimusu na komórki raka nerki.

W wyniku badania profilu ekspresji genetycznej wskazano potencjalną listę kandydatów do terapii skojarzonej z ewerolimusem celem przełamania lekoorności. W pierwszej kolejności są to następujące targety: *SPARC*, *AIG*, *VDR*. Receptory *MT1-R* i *AR*, *VDR* zostały uznane za najbardziej obiecujące targety na podstawie potencjału do utworzenia skojarzonej terapii antyangiogennej. Okazało się jednak, że elementy ścieżki melatoninowej nie ulegają zmianie pod wpływem ewerolimusu. W przypadku raka nerki koncepcja modulacji ścieżki *mTOR* poprzez elementy ścieżki androgenowej wydaje się interesującą opcją do projektowania terapii skojarzonej, dlatego też w tworzeniu modelu teoretycznego przełamania oporności na ewerolimus skupiono się na ścieżce androgenowej.

Przewidywanie odpowiedzi na lek w modelu komputerowym jest bardzo trudnym wyzwaniem ze względu na złożoność systemów biologicznych, na które działają leki. Tym trudniejsze okazuje się przewidywanie odpowiedzi komórek nowotworowych na terapię kombinatoryczną. Konieczne jest uwzględnianie w modelowaniu wielu skali – w tym zarówno na poziomie komórkowym jak i molekularnym. Sieć *mTOR* stanowi wyzwanie w modelowaniu ze względu na liczne interakcje powyżej kompleksu *mTORu* i połączenia z wieloma ścieżkami, w tym ścieżkami hormonalnymi, które modulują przekazywanie sygnału w ścieżce *mTOR*. Analizując ścieżkę: infiltrujące neutrofile –

receptor androgenowy – c-MYC może wyłonić potencjalną strategię terapeutyczną raka nerki. Zaproponowano pośrednie włączenie wniosków z analizy sieci sygnalizacyjnej mTOR z mikromacierzy w model oporności na ewerolimus, z wykorzystaniem teorii automatów komórkowych, które stanowią narzędzia do modelowania układów dynamicznych.

W badanym układzie eksperymentalnym pokazano, że ewerolimus działa na komórki raka nerki już na wczesnym etapie indukcji oporności zarówno w linii ccRCC-CSC jak i ccRCC-PCSC. Możliwe jest, że istnieją charakterystyczne profile ekspresji ewerolimusu, w tym dotyczące sieci mTOR. Jednakże potwierdzenie hipotezy i poznanie mechanistycznych podstaw działania ewerolimusu w komórkach macierzystych raka nerki wymaga przetestowania zmiany ekspresji genetycznej w czasie. Budowa modelu predykcyjnego przy pomocy oprogramowania GeneNetWeaver – wygenerowanie sztucznych danych syntetycznych mikromacierzy przy stosowaniu różnych dawek leku w czasie może pomóc stworzyć narzędzie komputerowe do badania działania leku, jak również wyłonienia mechanizmu jego działania na sieć mTOR oraz powiązane ścieżki sygnalizacyjne. Może także umożliwić lepsze poznanie mechanizmów lekooporności i wyłonienie kandydatów nowych leków do terapii skojarzonej na podstawie analizy sztucznie wygenerowanych sieci.