

Rola fosforylasy tymidynowej oraz czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w rozwoju i angiogenezie niedrobnokomórkowego raka płuca

Magdalena Tertil

Nrf2, oksygenaza hemowa-1 oraz fosforylaza tymidynowa są typowane jako potencjalne cele dla kombinowanych terapii przeciwnowotworowych. Celem pracy było zbadanie relacji tych białek w regulacji potencjału komórek niedrobnokomórkowego raka płuc ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w modulacji angiogenezy.

Nrf2 jest czynnikiem transkrypcyjnym kierującym odpowiedzią komórki na stres oksydacyjny. W nowotworach Nrf2 może bezpośrednio wpływać na wzrost guzów oraz oporność na standardowe metody leczenia. Nasze poprzednie badania wykazały, że oksygenaza hemowa-1, gen targetowy Nrf2, również bierze udział w tych procesach. Sprawdziliśmy wpływ stabilnej nadekspresji Nrf2 w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc NCI-H292 (linia NCI-Nrf2) na ekspresję genów i mikroRNA oraz udział HO-1 w tych procesach. Zwiększenie ekspresji Nrf2 doprowadziło do zahamowania proliferacji i migracji komórek *in vitro* oraz obniżenia aktywności markera nowotworowych komórek macierzystych ALDH, co współgrało z podniesieniem ekspresji mikroRNA znanych jako supresory nowotworów oraz obniżeniem poziomu onkogenego miR-378. Komórki wykazywały także obniżoną produkcję IL-1 β oraz metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej. Wyciszenie ekspresji HO-1 w komórkach z nadekspresją Nrf2 częściowo odwróciło efekt na MMP-1, MMP-3 i miR-378.

W komórkach NCI-Nrf2 zaobserwowano podwyższoną ekspresję czynników proangiogenych IL-8 i angiopoetyny-1 przy jednoczesnym zahamowaniu VEGF. Co ciekawe, komórki z podwyższonym poziomem Nrf2 wykazywały również zwiększoną ekspresję proangiennego enzymu fosforylasy tymidynowej (TP). Ekspresja TP była również podniesiona w komórkach o podwyższonym poziomie HO-1 i efekt ten był odwracalny za pomocą siRNA skierowanego przeciwko HO-1 w obu typach komórek. Dodatkowe eksperymenty wykazały, że mechanizmem odpowiedzialnym za modulację TP przez oś Nrf2/HO-1 jest najprawdopodobniej modulacja statusu oksydacyjnego komórki.

W kolejnym etapie zbadano rolę TP w komórkach NCI-H292. *In vitro* nadekspresja TP doprowadziła do obniżenia potencjału nowotworzenia komórek poprzez wpływ na proliferację, migrację i ALDH, ale równocześnie do zwiększenia ich potencjału angiennego, co było widoczne szczególnie w warunkach hipoksji i w obecności substratu TP tymidyny. *In vivo*, guzy z nadekspresją TP wykazywały tendencję do przyspieszonego wzrostu jak również były lepiej utlenowane, z czego można wnioskować o ich lepszym unaczynieniu. Nie wykryto różnic w ekspresji czynników angiennych VEGF, IL-8 i SDF-1, natomiast guzy z nadekspresją TP wykazywały zwiększony poziom cytokin prozapalnych IL-1 β i IL-6. Przerzutowanie komórek do płuc było jednak zahamowane, co mogło być związane z obniżeniem ekspresji MMP-1 i MMP-2 w wyniku nadekspresji TP.

Ponieważ działanie cytokin prozapalnych może indukować TP w komórkach śródbłonna, co potwierdzono na modelu komórek HMEC-1, następnie zbadano efekty nadekspresji TP w komórkach śródbłonna dużych naczyń HUVEC oraz mikronaczyń HMEC-1. W wyniku podniesienia ekspresji TP w komórkach HUVEC za pomocą transdukcji wektorami adenowirusowymi zaobserwowano zwiększenie ich potencjału angiogenego *in vitro*. Nadekspresja TP w komórkach śródbłonna spowodowała również indukcję proangiogennych VEGF i HO-1.

Wykazano po raz pierwszy, że TP może być regulowana przez Nrf2 i HO-1 w komórkach raka płuca oraz może wpływać na wzrost tego nowotworu poprzez modulację angiogenezy i ekspresji czynników prozapalnych. Korelację poziomu TP z ekspresją IL-1 β i IL-6 potwierdzono w próbkach klinicznych od pacjentów z rakiem płuca. Uzyskane wyniki uzasadniają zakwalifikowanie TP jako celu dla terapii przeciwnowotworowych w niedrobnokomórkowym raku płuca.

