

**Streszczenie pracy doktorskiej Maciej Cieśla pt. *Rola oksygenazy hemowej-1 w rozwoju mięsaka prążkowanokomórkowego* przygotowanej pod opieką prof. dr hab. Alicji Józkowicz.**

Mięsak prążkowanokomórkowy (*rhabdomyosarcoma* – RMS) jest najczęstszym nowotworem tkanek miękkich występującym u dzieci i młodzieży, stanowiącym ponad 50% wszystkich zmian złośliwych tego typu. Wyróżnia się trzy główne rodzaje RMS, wyodrębniane ze względu na obraz histologiczny oraz zmiany cytogenetyczne: i) typ zarodkowy (eRMS), ii) pęcherzykowy (aRMS) oraz iii) wielopostaciowy, przy czym ten ostatni występuje rzadko i rozwija się w późniejszym wieku. Najczęstszy podtyp (eRMS) wiąże się z łagodniejszym przebiegiem klinicznym, podczas gdy w aRMS w chwili diagnozy często obserwuje się obecność przerzutów i gorsze rokowanie. Odmienne jest również tło genetyczne eRMS i aRMS. eRMS stanowią niejednorodną cytogenetycznie grupę neoplazji, podczas gdy aRMS w 80% powodowany jest przez powstanie onkogenu fuzyjnego Pax3/7-FoxO1, prowadzącego w konsekwencji do transformacji nowotworowej. Niezależnie od podtypu histologicznego, RMS związany jest z zaburzeniami w procesie różnicowania mięśniowego. Komórki prekursorowe mięśni szkieletowych nie przechodzą końcowych etapów miogenezy, pozostając w stanie wysoce proliferatywnym, charakterystycznym dla komórek nowotworowych. Taki obraz związany jest ze zmianami w aktywności głównych szlaków odpowiadających za miogenezę, między innymi miogennych czynników regulatorowych oraz mięśniowo-specyficznych mikroRNA, w tym miR-206.

Różnicowanie mięśniowe jest regulowane przez wiele czynników, w tym przez oksygenazę hemową-1 (HO-1), cytoprotekcyjne białko promujące wzrost niektórych nowotworów, którego nadekspresja w mioblastach prowadzi do zahamowania końcowych etapów różnicowania. Efekt ten jest zależny od tlenku węgla (CO), jednego z produktów aktywności enzymatycznej HO-1. CO poprzez zahamowanie aktywności białka cEBP $\delta$  hamuje ekspresję MyoD, głównego czynnika transkrypcyjnego promującego różnicowanie mięśniowe. Wcześniejsze badania wykazały, że mioblasty o podwyższonej ekspresji HO-1 tworzą szybko rosnące masy komórkowe *in vivo* o histologii przypominającej utkanie nowotworowe (Kozakowska et al. 2012). Biorąc pod uwagę naturalny obraz rozwoju RMS oraz wpływ HO-1 na różnicowanie mięśniowe, w prezentowanej pracy podjęto próbę wyjaśnienia roli oksygenazy hemowej-1 w rozwoju *rhabdomyosarcoma*.

W pierwszym etapie przeprowadzone zostały doświadczenia *in vitro* na sześciu stabilnych liniach komórkowych ludzkiego RMS co umożliwiło lepsze zrozumienie

mechanizmów prowadzących do progresji tego typu nowotworu. Wyniki te zostały w dalszych badaniach zweryfikowane dzięki analizom z użyciem pierwotnych próbek pochodzącymi od pacjentów. W celu oceny wpływu HO-1 znajdującej się w podścielisku na wzrost RMS przeprowadzono serię doświadczeń z użyciem mezenchymalnych komórek podścieliska (MSC) o normalnej ekspresji HO-1 (HO-1 WT) oraz pozbawionych tego genu (HO-1 KO). W ostatnim etapie, uzyskane uprzednio wyniki zostały poddane weryfikacji *in vivo* w mysim modelu transplantacji ludzkich komórek RMS.

Przeprowadzone badania wskazują na zwiększoną aktywację szlaków molekularnych związanych z progresją nowotworową w bardziej złośliwym aRMS w porównaniu do łagodnego klinicznie eRMS. Równocześnie zahamowaniu ulega przekaz sygnału przez czynniki stymulujące różnicowanie mięśniowe w aRMS. Co więcej, oprócz obniżonego poziomu mięśniowo specyficznych mikroRNA oraz zwiększonej ekspresji genów osi CXCR4/SDF1 i cMET/HGF, odpowiedzialnych za nasiloną migrację i proliferację, linie komórkowe aRMS charakteryzują się wyższym poziomem HO-1 w porównaniu z eRMS. Zależność taka występuje nie tylko w przypadku stabilnych linii komórkowych, ale także w pierwotnych guzach klinicznych. Ponadto wprowadzenie do linii komórkowej eRMS onkogenu Pax3-FoxO1 typowego dla aRMS prowadzi do podwyższenia ekspresji HO-1 oraz zaburzeń w przekazie sygnału związanego z różnicowaniem mięśniowym. Z kolei zahamowanie aktywności HO-1 za pomocą protoporfiryny cyny lub siRNA prowadzi do częściowego zniesienia blokady w różnicowaniu komórek RMS oraz do zwiększenia ekspresji białek promujących miogenezę, takich jak miogenina czy miozyna. Równocześnie, po obniżeniu aktywności enzymatycznej HO-1, dochodzi do zmniejszenia ekspresji genów CXCR4, SDF1, cMET i HGF, odpowiedzialnych za podziały komórkowe i przerzutowanie. Co istotne, inhibicja HO-1 skutkuje zwiększeniem produkcji reaktywnych form tlenu (ROS), translokacją deacetylazy histonowej 4 (HDAC4) z jądra komórkowego do cytoplazmy i w konsekwencji odblokowaniem powstawania miR-206. Uzyskane wyniki wskazują na rzeczywisty związek pomiędzy tymi zmianami a zwiększeniem poziomu zróżnicowania komórek RMS w warunkach obniżonej aktywności HO-1. Wnioski płynące z badań *in vitro* zostały potwierdzone w modelu ksenoprzeszczepu komórek nowotworowych do myszy bezgrasiczych. Ogólnoustrojowe podanie związków hamujących aktywność HO-1 powodowało zahamowanie wzrostu guza nowotworowego *in vivo* oraz zwiększenie jego zróżnicowania przy równoczesnym zmniejszeniu unaczynienia. Zależność między poziomem ekspresji HO-1, miR-206 oraz unaczynieniem guza potwierdzona została także w próbkach klinicznych.

W toku eksperymentów wykazano również, iż HO-1 może wpływać na komórki RMS nie tylko poprzez regulację ich wewnętrznych ścieżek sygnałowych, ale także poprzez modulację ich oddziaływania z komórkami podścieliska. Hodowla komórek eRMS w obecności MSC pozbawionych HO-1 prowadzi do zwiększenia ekspresji markerów różnicowania mięśniowego oraz zmniejszenia wydzielania czynnika HGF.

Podsumowując, HO-1 może być jednym z czynników modulujących wzrost guzów nowotworowych RMS. Białko to ulega zwiększonej ekspresji w bardziej złośliwym typie aRMS, najprawdopodobniej na skutek obecności onkogenu Pax3/7-FoxO1. Poprzez zahamowanie aktywności HO-1 możliwe jest częściowe przywrócenie prawidłowej homeostazy wewnątrzkomórkowej, niezbędnej do zakończenia procesu różnicowania mięśniowego w RMS. Dzieje się tak wskutek regulacji osi molekularnej ROS-HDAC4-miR-206. Istotny wydaje się również wpływ HO-1 na interakcje pomiędzy komórkami nowotworowymi a podścieliskiem.