Małgorzata Durbas

Mechanizmy molekularne odpowiedzialne za śmierć komórkową indukowaną przez przeciwciało monoklonalne 14G2a wiążące gangliozyd GD2 na ludzkich komórkach neuroblastoma

STRESZCZENIE ROZPRAWY W JĘZYKU POLSKIM

Gangliozyd GD2 (GD2) jest markerem komórek neuroblastoma. Mysie przeciwciało monoklonalne 14G2a wiąże się z gangliozydem GD2 i powoduje śmierć komórek linii IMR-32 na drodze dotychczas słabo poznanej. Badania z użyciem mikromacierzy DNA oraz profilu białek w komórkach IMR-32 traktowanych przeciwciałem 14G2a, prowadzone w zespole promotorek rozprawy, pozwoliły wskazać na ważne szlaki komórkowe zaangażowane w odpowiedź na to przeciwciało. W niniejszej pracy skupiono się głównie na zmianach w regulacji kinaz AKT, mTOR, aurora A oraz białka PHLDA1 w badanym modelu.

Pierwsza część przedstawionej rozprawy doktorskiej poświęcona jest szczegółowej charakterystyce zmian aktywności jednej z kluczowych ścieżek stymulacji proliferacji komórek – szlaku sygnałowania z udziałem kinaz AKT i mTOR w komórkach IMR-32 traktowanych przeciwciałem 14G2a. Analiza poziomu białek należących do szlaku sygnałowania PI3K/AKT/mTOR pokazała, że po związaniu się przeciwciała 14G2a z gangliozydem GD2 dochodzi do znaczącego obniżenia poziomu białka mTOR. Zahamowane zostają także fosforylacje kinazy AKT na resztach Ser473 i Thr308, mTOR na Ser2448, p70 S6 na Thr389 i Ser371 oraz 4E-BP1 na Thr37 i Thr46, co może prowadzić do obniżenia proliferacji komórek IMR-32 i zahamowania translacji. Dochodzi również do zahamowania fosforylacji (na określonych resztach aminokwasowych) innych białek zaangażowanych w modulację ścieżki PI3K/AKT/mTOR tj. GSK-3β, c-RAF i PDK1. Natomiast fosfataza PTEN, która jest inhibitorem szlaku PI3K/AKT, po 6 godzinnym traktowaniu komórek przeciwciałem 14G2a ulega wzmożonej aktywującej fosforylacji. We frakcjach jądrowych badanych komórek wykazano akumulację substratu kinazy AKT tj. białka P27, co może prowadzić do negatywnej regulacji progresji cyklu komórkowego. Powyższe badania wskazują na mechanizm działania przeciwciał 14G2a oparty na obniżeniu potencjału proliferacyjnego komórek IMR-32 wiążących te przeciwciała [Durbas i inni, 2015].

Druga część pracy przybliża profil czasowy ekspresji genów regulowanych w odpowiedzi na przeciwciało 14G2a między innymi *MYCN, JUN* czy *CDKN1A* i stanowi próbę powiązania poziomu ich ekspresji ze zmianami obserwowanymi w proteomie i kinomie komórek IMR-32 traktowanych tym przeciwciałem. Co więcej metoda mikromacierzy DNA wskazała, że ekspresja genu *PHLDA1* jest najbardziej indukowana w komórkach IMR-32 po dodaniu przeciwciała 14G2a [Horwacik i inni, 2015].

Przedmiotem ostatniej części pracy było określenie roli białka PHLDA1 w komórkach IMR-32 i w odpowiedzi tych komórek na przeciwciała 14G2a. Zbadano także udział białka aurora A w regulacji PHLDA1 w komórkach IMR-32, gdyż oba białka są znanymi partnerami w komórkach nowotworu piersi linii MDA-MB-231. W linii IMR-32 zaobserwowano bardzo wysoką, konstytutywną ekspresję genu *PHLDA1* na poziomie transkryptu i wysoki poziom białka PHLDA1 w porównaniu z innymi liniami neuroblastoma, odwrotnie skorelowane z ekspresją transkryptu genu *AURKA* i poziomem białka aurora A. W celu zbadania funkcji białka PHLDA1 w komórkach IMR-32 wyprowadzono linie IMR-32 ze stabilnym wyciszeniem genu *PHLDA1* za pomocą shRNA. W klonach komórek IMR-32 ze stabilnie obniżoną ekspresją *PHLDA1* dochodzi do wzrostu ekspresji transkryptu *AURKA*, kodującego białko aurora A, wzrostu poziomu kinazy aurora A oraz aktywujących fosforylacji kinaz aurora A i AKT w porównaniu z komórkami kontrolnymi i wyjściowymi. Wynik ten świadczy o roli PHLDA1 w regulacji aktywności ważnych białek o funkcjach onkogennych w neuroblastoma tj. kinazy aurora A oraz AKT. Obniżenie ekspresji *PHLDA1* wpływa na ekspresję genów kodujących białka zaangażowane w proces różnicowania np. *NTRK1, NTRK2, NGF* czy *BDNF*. Ponadto wykazano, że poziom białka PHLDA1 jest odwrotnie skorelowany z poziomem receptora TRKB, który jest markerem złej prognozy w neuroblastoma. W komórkach z wyciszeniem *PHLDA1* zahamowaniu ulega proces apoptozy co wskazuje na proapoptotyczną funkcję białka PHLDA1. Stwierdzono także podwyższony poziom formy LC3A/B-II, głównego markera autofagii, co świadczy o wzmożonym tworzeniu się autofagosomów. Począwszy od trzeciego dnia hodowli klony komórek IMR-32 z wyciszeniem genu *PHLDA1* wykazują mniejszą wrażliwość na przeciwciała 14G2a w porównaniu z komórkami kontrolnymi i wyjściowymi, co dowodzi że białko PHLDA1 jest bezpośrednio zaangażowane w efekt działania przeciwciał 14G2a na komórki IMR-32. Natomiast badania na komórkach IMR-32 z przejściowym wyciszeniem genu *AURKA* wskazują na rolę kinazy aurora A jako negatywnego regulatora poziomu białka PHLDA1 oraz potwierdzają jej rolę w regulacji poziomu białka MYCN o funkcjach onkogennych w neuroblastoma [Durbas i inni, 2016].