

Magdalena Machowska

Streszczenie pracy doktorskiej

Analiza skuteczności wybranych strategii terapii genowych - wpływ jądrowo ukierunkowanej maspiny na komórki nowotworu piersi oraz przygotowanie nośnika dla leku genetycznego

STRESZCZENIE

Choroby nowotworowe są zaliczane do chorób cywilizacyjnych i pod względem liczby przypadków śmiertelnych zajmują obecnie drugie miejsce, za chorobami układu krążenia. Najczęściej diagnozowane są nowotwory układu oddechowego, piersi oraz okrężnicy i odbytnicy. Ze względu na dużą heterogenność nowotworów, nie są dostępne uniwersalne metody leczenia, a stosowane obecnie terapie w wielu przypadkach są nieskuteczne, szczególnie w zaawansowanych stadiach choroby, gdy dochodzi do powstawania przerzutów. Bardzo istotną kwestią jest poszukiwanie nowych metod leczenia i poznawanie mechanizmów procesu nowotworzenia, co pozwoli na bardziej precyzyjne kierowanie terapii. Powyższe aspekty stanowiły podstawę do przeprowadzenia poniższych badań.

Celem pracy doktorskiej było opracowanie strategii terapii nowotworu piersi opartej na terapii genowej z zastosowaniem odpowiedniego nośnika dla leku genetycznego. Poszczególne etapy pracy miały na celu wybór sekwencji leku genetycznego oraz analizę jego wpływu na komórki nowotworu piersi oraz wybór i przygotowanie nośnika dla leku genetycznego i ocenę efektywności jego dostarczania do komórek. Kolejnym celem było połączenie dwóch wcześniej wybranych elementów terapii - leku genetycznego oraz nośnika, i przygotowanie oraz optymalizacja gotowego wektora do testów *in vitro* oraz *in vivo*. Końcowym etapem była ocena efektywności działania wektora i procedury terapeutycznej w układzie hodowli komórkowych oraz modelu mysim *in vivo*. Zaprojektowana terapia genowa wraz z przygotowanym wektorem miała być elementem terapii skojarzonej nowotworów, która ma na celu osiągnięcie synergii działania poszczególnych komponentów. Drugim elementem terapii miał być niezależnie opracowany nośnik liposomowy z chemioterapeutyką.

W pierwszej części pracy wybrane zostały dwie strategii terapii genowej: wyciszenie onkogenu oraz nadprodukcja białka supresorowego. Jako onkogen wybrano gen kodujący białko HER2, które jest nadprodukowane w około 15-

25% nowotworów piersi wpływając na zwiększenie tempa wzrostu nowotworów. Zaprojektowano cztery sekwencje wyciszające oraz sekwencję kontrolną. Stosując transfekcję przejściową wykazano, że dwie z zaprojektowanych sekwencji zapewniają wyciszenie genu *erbB2* w komórkach nowotworu piersi MCF-7 oraz SKBR-3, dlatego zostały one wybrane do dalszych eksperymentów. Przygotowano odpowiednie wektory lentiwirusowe kodujące sekwencje wyciszające, które również zapewniały efektywne wyciszenie genu *erbB2* w układzie kontrolnym z zastosowaniem komórek HEK 293. Nie obserwowano natomiast efektywnego wyciszenia tego genu oraz wpływu na tempo proliferacji komórek nowotworu piersi, co wskazywało na brak efektu działania wektora w danym układzie.

W ramach strategii związanej z nadprodukcją białka supresorowego, początkowo wykorzystywana była sekwencja kodująca białko p53. Mutacje w tym genie powodujące utratę aktywności tego białka lub zaburzenie jego funkcji są obserwowane w około 17% przypadków nowotworów piersi prowadząc głównie do zaburzenia mechanizmów naprawy DNA oraz zmniejszenia wrażliwości komórek na sygnały prowadzące do apoptozy. Komórki MCF-7 oraz MDA-MB-231 po transfekcji plazmidem kodującym to białko były wprowadzane na drogę apoptozy.

Według danych literaturowych, powyższe leki genetyczne powinny zapewnić wysoką skuteczność hamowania wzrostu nowotworów, jednak nie zapewniają one wystarczającej specyficzności działania. W przypadku ich zastosowania specyficzność mogłaby być osiągnięta poprzez zastosowanie specyficznego promotora lub jednoczesne ukierunkowanie nośników na specyficzne receptory powierzchniowe komórek nowotworu piersi.

Niezależnie od prac prowadzonych nad lekami genetycznymi opartymi na sekwencji wyciszającej gen *erbB2* oraz sekwencji kodującej białko p53, we współpracy z Uniwersytetem Medycznym we Wrocławiu, prowadzone były prace badawcze nad maspiną. Mimo że białko to nie jest dobrze poznane, część badań wskazywała na jego aktywność supresorową, prowadzącą do spowolnienia lub nawet zahamowania rozwoju nowotworów, w tym nowotworów piersi.

Ze względu na brak jednoznacznych danych na temat jego działania, a także na pojawiające się doniesienia na temat wpływu lokalizacji subkomórkowej tego białka na wzrost komórek nowotworowych, podjęto się zweryfikowania hipotezy zakładającej, że jądrowo zlokalizowana maspina wywiera efekt antyproliferacyjny na komórki nowotworu piersi.

Przygotowano konstrukty kodujące odpowiednio maspinę-EGFP (nadprodukowane białko lokalizujące się głównie w cytoplazmie) lub maspinę-NLS-EGFP (lokalizacja w jądrze), które miały zapewnić odpowiednią lokalizację

białka w komórce. Jako kontrola zastosowane zostały plazmidy kodujące EGFP (lokalizacja mieszana) oraz EGFP-NLS (lokalizacja jądrowa). Komórki trzech linii nowotworu piersi (MCF-7, MDA-MB-231, SKBR-3) oraz kontrolna linia pochodząca z gruczołu piersiowego MCF10A, zostały poddane transfekcji wszystkimi konstruktami i zbadano wpływ nadprodukcji kodowanych białek na status proliferacyjny komórek. Wykazano, że jądrowo zlokalizowana maspina, w przeciwieństwie do maspiny o lokalizacji cytoplazmatycznej i białek kontrolnych, wywierała istotny wpływ na zmniejszenie statusu proliferacyjnego komórek nowotworu piersi. Ponadto maspina zarówno o lokalizacji cytoplazmatycznej, jak i jądrowej nie wywierała efektu na proliferację komórek kontrolnych. Ze względu na to, że efekt jądrowo ukierunkowanej maspiny wydawał się być specyficzny w stosunku do komórek nowotworu piersi, zdecydowano się na zmianę pierwotnie zaplanowanej strategii i zastosowanie sekwencji kodującej maspinę-NLS-EGFP jako leku genetycznego do wykorzystania w dalszych etapach pracy nad terapią genową. Dzięki temu zapewnienie specyficzności terapii mogłoby być możliwe już na etapie leku genetycznego, w przeciwieństwie do dwóch wcześniej testowanych leków genetycznych. Jeśli dalsze badania wykazałyby antyproliferacyjny efekt maspiny o lokalizacji jądrowej na komórki prawidłowe pochodzące z innych tkanek, możliwe byłoby zastosowanie wcześniej zaplanowanej strategii ukierunkowania transkrypcyjnego (specyficzny promotor) lub transdukcyjnego (ukierunkowanie nośnika na charakterystyczne receptory).

Kolejnym celem pracy było wybranie nośnika dla leku genetycznego. Prowadzono prace nad trzema nośnikami: liposomowym, lentiwirusowym oraz adenowirusowym. Każdy z nich był przygotowywany samodzielnie w naszym laboratorium. Ostatecznie wybrano nośnik adenowirusowy ze względu na jego charakterystykę, wydajność dostarczania leku genetycznego do komórek oraz efektywność działania na komórki nowotworu piersi w połączeniu z lekiem genetycznym.

W ostatnim etapie pracy przeklonowano sekwencje kodujące maspinę-EGFP oraz maspinę-NLS-EGFP do plazmidów transferowych adenowirusów, przeprowadzono wszystkie etapy produkcji, oczyszczania oraz zagęszczania adenowirusów otrzymując preparaty wektorów adenowirusowych. Przygotowane preparaty zostały poddane testom funkcjonalności i efektywności *in vitro* w układzie hodowli komórkowych oraz *in vivo* w mysim modelu zwierzęcym. Eksperymenty wykazały funkcjonalność wektora z lekiem genetycznym w układzie hodowli komórkowych, a także efektywność hamowania proliferacji komórek nowotworu piersi w przypadku wektora niosącego sekwencję kodującą jądrowo ukierunkowaną maspinę. Wstępne,

pilotażowe testy *in vivo* na modelu mysim wykazały funkcjonalność przygotowanego nośnika zapewniającego dostarczenie transgenu do komórek i utrzymanie się jego ekspresji przez około 30 dni, jednak na ich podstawie nie można było stwierdzić efektywności działania wektora, dlatego niezbędne są kolejne badania.

Podsumowując, dokonano wyboru sekwencji leku genetycznego – maspiny ukierunkowanej jądrowo, która może być stosowana jako element terapii nowotworów w dalszych badaniach. Wykazano, że maspina o lokalizacji jądrowej hamowała proliferację komórek nowotworu piersi, natomiast maspina o lokalizacji cytoplazmatycznej nie wywierała istotnego efektu na ich proliferację. Ponadto nadprodukcja maspiny nie miała wpływu na proliferację kontrolnych komórek gruczołu piersiowego niezależnie od jej lokalizacji. Wdrożono i zoptymalizowano produkcję nośnika adenowirusowego oraz przygotowano wektor adenowirusowy z maspiną-NLS-EGFP jako lekiem genetycznym. Wykazano funkcjonalność i efektywność działania przygotowanego wektora w układzie hodowli komórkowych. W modelu mysim *in vivo* potwierdzono jego funkcjonalność, natomiast wskazana jest dalsza optymalizacja wektora i przeprowadzenie testów efektywności działania w układzie *in vivo*.