mgr Edyta Andrulewicz -Botulińska

STRESZCZENIE

Glejak wielopostaciowy (GBM) jest najbardziej agresywnym nowotworem OUN, charakteryzującym się wysoką heterogennością i inwazyjnością, co utrudnia całkowite chirurgiczne usunięcie guza. Standardowe leczenie obejmuje chemio- i radioterapię, a najczęściej stosowanym chemioterapeutykiem jest TMZ, który z powodu wysokiej aktywności enzymu naprawczego MGMT wykazuje efekt jedynie w około 50% przypadków.

Stwierdzono, że komórki glejaka mogą zmienić otaczający miąższ mózgu i indukować ekspresję nowych cząsteczek, niezbędnych do ich migracji i inwazji. Niektóre z nich ulegają nadekspresji (integryny α2β1, α5β1, MMP-2, MMP-9), inne są syntetyzowane na nowo (kolagen typu I, integryna α9β1). Zrozumienie mechanizmów migracji i inwazji, w których pośredniczą białka i receptory macierzy kluczowe w rozwoju glejaka, może mieć fundamentalne znaczenie w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych w celu zmniejszenia inwazji i nawrotu nowotworu. Najbardziej interesującymi celami terapii ukierunkowanej są selektywnie wyrażane białka w komórkach glejaka i nie występujące w zdrowych komórkach mózgu.

Celem pracy było poznanie współzależności pomiędzy ekspresją kolagenu typu I, MMP (MMP-2 i MMP-9) i integryn (α2β1, α5β1 i α9β1) oraz wpływu zmian ich ekspresji pod wpływem wybranych czynników na migrację komórek GBM trzech linii LN229, LN18 i LBC3 oraz identyfikacja kluczowych czynników regulujących ten proces. Ekspresję badanych składników ECM i receptorów integrynowych oceniono na poziomie mRNA i białka, ponadto w przypadku MMP oznaczono ich aktywność. Dodatkowo, espresję wybranych czynników potwierdzono metodą immunocytochemiczną.

Przeprowadzone badania wykazały istotne różnice w ekspresji kolagenu typu I, MMP-9, oraz integryn w zależności od linii. Poziom ekspresji kolagenu typu I był najniższy w komórkach linii LN229, natomiast najwyższy w komórkach LBC3. W linii LN229 nie wykazano obecności MMP-9, w przeciwieństwie do pozostałych linii. Obecność podjednostki α9 integryny wykazano jedynie w linii LN229, która wykazywała jednocześnie najniższy poziom podjednostek α2 oraz α5. Zależności te zostały potwierdzone w komórkach α9β1-negatywnych transfekowanych podjednostką α9.

Zastosowanie kwasu askorbinowego oraz □,□'-dipirydylu wywoływało zróżnicowany efekt, w zależności od linii, na ekspresję kolagenu typu I. Pomimo znacznej stymulacji MMP-2 i MMP-9, zmiany w ekspresji kolagenu korelowały pozytywnie z migracją komórek. Luteolina, która dzięki obecności grup hydroksylowych ma zdolność hamowania aktywności MMP-2 i MMP-9, niezależnie od zróżnicowanych w zależności od linii zmian w ekspresji kolagenu typu I, integryn oraz aktywności ERK1/2, wywierała istotny hamujący wpływ na migrację komórek. Komórki linii LN229 charakteryzowały się znacznie większą przeżywalnością (w obecności luteoliny) i adhezją (w obecności dezintegryny VLO4) oraz opornością na hamowanie migracji w porównaniu do innych linii. Do wywołania efektu hamującego migrację tych komórek (pod wpływem dezintegryny VLO5, PMA i U0126) konieczne było zahamowanie ekspresji integryny α9β1. Linia LN18 charakteryzowała się z kolei najwyższym poziomem ekspresji integryn α2β1 i α5β1. Blokowanie podjednostki α5 przez dezintegrynę VLO4, z jednoczesnym silnym hamowaniem aktywności MMP-9 i ERK1/2, powodowało hamowanie migracji komórek nie tylko na samej płytce ale także opłaszczonej kolagenem typu I. Kolagen typu I w podłożu zwiększał istotnie adhezję komórek LBC3 i LN18 traktowanych dezintegryną

VLO4 oraz zwiększał migrację komórek traktowanych inhibitorem kinazy p38, co mogło być spowodowane zmianą ekspresji integryn. Zastosowanie inhibitora kinazy ERK1/2 (U0126) jak również hamowanie jej aktywności pod wpływem α,α'-dipirydylu, VLO4 i luteoliny było powiązane z dużo skuteczniejszym hamowaniem migracji komórek (i hamowaniem aktywności MMP-2 i MMP-9) niż w przypadku hamowania aktywności kinazy p38. Indukcji MMP-9 przez ester forbolu PMA towarzyszyło hamowanie aktywności MMP-2 i zwiększenie migracji komórek linii LBC3 oraz zmniejszenie migracji linii LN229.

Uzyskane wyniki dostarczają wielu nowych i cennych informacji na temat złożonych zależności między badanymi składnikami ECM i receptorami integrynowymi, a w celu ich potwierdzenia konieczne są dalsze badania.