

Streszczenie

Nadrzędnym celem prezentowanych badań była analiza mechanizmów molekularnych leżących u podstaw rozwoju oporności na trastuzumab - pierwszej zatwierdzonej terapii celowanej stosowanej do dnia dzisiejszego jako leczenie pierwszego rzutu w nowotworach piersi charakteryzujących się nadekspresją receptora HER2.

W tym celu zostało zaprojektowane badanie naukowe oparte na dwóch głównych dogmatach. Po pierwsze, wdrożone zostało nowatorskie podejście mające na celu zbadanie zmian molekularnych na przestrzeni pełnego zakresu czasu trwania procesu zakładając, że rozwój oporności jest złożonym procesem wieloetapowym, a nie wyłącznie pojedynczym zdarzeniem na poziomie molekularnym. Po drugie, w celu uzyskania informacji o zmienności ekspresji szerokiego spektrum genów oraz cząsteczek mikroRNA wybrana została wysoko przepustowa metoda mikromacierzy. Dane uzyskane w eksperymencie zostały poddane kompleksowej analizie statystycznej. Ponadto wykorzystano szereg narzędzi bioinformatycznych oraz baz danych takich jak Gene Ontology, czy KEGG Pathway w celu wskazania istotnych dla badanego procesu funkcji molekularnych, procesów biologicznych, ścieżek sygnałowych oraz interakcji białkowych.

Analiza statystyczna ujawniła 8 874 genów w przypadku linii komórkowej BT474 oraz 13 892 genów dla linii SKBR3 wykazujących istotną zmienność ekspresji w trakcie procesu nabywania przez komórki oporności na trastuzumab. Wśród tych genów 5 675 było wspólnych dla obu modeli biologicznych wykorzystanych w doświadczeniu. Wykazano, że większość transkryptów przypisanych na podstawie wartości p-value do 25 najbardziej istotnych statystycznie w jednym modelu badawczym była jednocześnie uplasowana w pierwszych 200 najbardziej istotnych transkryptach w drugiej linii komórkowej. Powyższe rezultaty świadczą o wysokim stopniu zgodności wyników dla obu modeli eksperymentalnych i sugerują istnienie wspólnych mechanizmów oporności na badany lek. Co ważne, cztery geny zostały znalezione w grupie 25 najbardziej znaczących genów w obu liniach komórkowych. Są to: BIRC5, E2F1, USP1 oraz TFRC. Udział BIRC5 oraz E2F1 w ścieżce sygnałowej HER2, a także interakcja tych genów z wieloma innymi czynnikami wpływającymi na odpowiedź komórek na Herceptynę była wcześniej raportowana w literaturze naukowej, natomiast geny USP1 oraz TFRC stanowią nowe potencjalne elementy zaangażowane w rozwój oporności na trastuzumab. Ponadto, z 25 najważniejszych dla procesu genów zidentyfikowanych w przynajmniej jednej linii komórkowej wyłoniono kilka dodatkowych czynników molekularnych o potencjalnym zaangażowaniu w tworzenie oporności na Herceptynę. Geny te to: IGF2BP1, GSTM3, RASD1, KLK11, GSTP1, YWHAH, DTL, DOLK, NACC2, DDIT oraz DNAJA3. Ich

potencjalny wkład w badany proces dodatkowo uwiarygodniają dane literaturowe opisujące funkcje molekularne oraz procesy komórkowe, w które są zaangażowane powyższe geny. Ważnym elementem naszej analizy było wyłonienie genów takich jak: BIRC5, E2F1, BRCA1, RB1, ERBB2, EPHA2, IGFBP3, ADAM10, FOXM1, RAC1, MYC, CCND1, PTEN, TP53, MAP2K4 oraz PI3KCA, których udział w rozwoju oporności na Herceptynę został potwierdzony we wcześniej przeprowadzonych i opublikowanych badaniach. Stanowi to potwierdzenie jakości oraz trafności wyników uzyskanych w naszym eksperymencie. Niemniej jednak, duża liczba badanych *loci* dla długich niekodujących RNA, a także białek o nieznanej funkcji lub wysoce ograniczonej ilości dostępnych informacji również została scharakteryzowana w naszym badaniu jako istotna dla procesu rozwoju oporności na trastuzumab.

Wykorzystując analizę interakcji białkowych wykazaliśmy, że znacząca większość spośród 25 najistotniejszych produktów genowych w obu liniach komórkowych jest zaangażowana w sieci powiązań z białkami o potwierdzonej literaturowo roli w tworzeniu oporności na Herceptynę. Wśród nich BIRC5, E2F1 oraz RB1 zlokalizowane są w centrach tych sieci będąc w bezpośredniej interakcji z większością tych białek.

Analiza bioinformatyczna na podstawie bazy danych Gene Ontology miała na celu wyłonienie funkcji molekularnych oraz procesów biologicznych, dla których udział genów uznanych w naszym badaniu za istotne statystycznie jest większy niż wynikałoby to z przypadkowości. Znaleziono 193 funkcje molekularne związane z powstawianiem oporności na badany lek w linii komórkowej SKBR3 oraz 103 w przypadku BT474. Najważniejsze z nich dotyczyły: wiązania receptora, aktywności kinazy białkowej, aktywności związanych z GTPazą, mechanizmów związanych z ATP lub ATPazą, a także aktywności transferazy, powstawania i dojrzewania RNA, replikacji i organizacji DNA oraz wiązania białka p53. Jeśli chodzi natomiast o procesy biologiczne, wykazano 600 oraz 354 procesy istotne odpowiednio dla linii komórkowej SKBR3 oraz BT474. Większość wyłonionych procesów biologicznych związana była z: mechanizmami regulacyjnymi cyklu komórkowego, funkcjonowaniem mitochondriów, apoptozą, aktywnością mikroRNA, reakcją na stres, infekcją wirusową, organizacją mikrotubul oraz naprawą uszkodzeń DNA.

Analiza ścieżek molekularnych w oparciu o bazę danych KEGG pozwoliła na wskazanie 9 istotnych dla rozwoju oporności na Herceptynę szlaków sygnałowych w przypadku linii komórkowej BT474 oraz aż 75 ścieżek sygnałowych dla linii SKBR3. Wśród nich osiem szlaków było wspólnych dla obu niezależnych modeli badawczych, co sugeruje ich duże znaczenie w badanym procesie. Szlakami tymi są: szlak cyklu

komórkowego, szlak sygnałowy białka p53, szlak anemii Fanconiego związany z naprawą DNA, starzenie komórkowe, replikacja DNA, infekcja EBV oraz dwa szlaki sygnałowe związane z nowotworem (pęcherza oraz jelita grubego).

Wykazaliśmy ponadto, że mechanizmy nabytej oporności na trastuzumab mogą obejmować zarówno zależne, jak i niezależne od receptora HER2 sposoby działania. W niniejszych badaniach potwierdziliśmy, że skrócone białko lub endocytoza receptorozaależna może wpływać na tworzenie oporności na terapię, jednakże nadaktywność czynników w ścieżce sygnałowej HER2 również może się przyczynić do rozwoju oporności na Herceptynę. Niemniej jednak, wyniki niniejszych badań naukowych nie potwierdziły mechanizmu opartego na maskowaniu epitopu wiążącego trastuzumab, ani istotnego zaangażowania innych receptorów z rodziny białek ERBB w niwelowanie efektu terapeutycznego Herceptyny.

Porównanie rezultatów uzyskanych dla dwóch niezależnych modeli badawczych ujawniło większą złożoność mechanizmów zaangażowanych w rozwój oporności na trastuzumab w przypadku linii komórkowej SKBR3. Stwierdzono, że iż jest to skorelowane ze znaczącą nierównowagą liczby genów istotnych w procesie w obu liniach komórkowych, a co za tym idzie również przewagą analizowanych funkcji molekularnych, procesów biologicznych, a także ścieżek sygnałowych oraz interakcji białkowych w przypadku linii SKBR3. Przypuszcza się, że taka charakterystyka obu linii może być związana z odmiennym stadium nowotworu, z którego wyprowadzone zostały badane modele komórkowe. Linia BT474 powstała z guza pierwotnego, natomiast linia SKBR3 jest pochodną tkanki pochodzącej z przerzutu.

W analizie zmian ekspresji cząsteczek mikroRNA, wykazaliśmy, że ponad 99% znanych ludzkich mikroRNA ma istotny statystycznie udział w budowaniu oporności na Herceptynę. Wiele z nich zostało wcześniej opisanych w literaturze w kontekście oporności na trastuzumab. Podobnie jak w przypadku genów, wskazano cztery cząsteczki mikroRNA wśród 25 najbardziej istotnych w przypadku obu linii komórkowych. Są nimi: hsa-miR-574-3p, hsa-miR-4530, hsa-miR-8485 oraz hsa-miR-197-3p. Ponadto, zidentyfikowano kilka innych bardzo ważnych mikroRNA specyficznych dla jednego z modeli badawczych. Są to: hsa-miR-6886-3p, hsa-miR-4254, hsa-miR-4701-5p, hsa-miR-3151-3p, hsa-miR-6834-3p, hsa-miR-4281, hsa-miR-4649-3p, hsa-miR-3162-3p, hsa-miR-6826-5p, a także hsa-miR-6869-5p.

Wyniki uzyskane w niniejszych badaniach naukowych wnoszą wiele cennych informacji do wiedzy na temat rozwoju oporności na trastuzumab w zakresie nauk podstawowych. Wskazanie nowych potencjalnych genów, procesów, szlaków sygnałowych, a także interakcji białkowych stanowi solidną podstawę do wyznaczenia kierunku szczegółowych badań funkcjonalnych w dziedzinie genetyki nowotworów oraz medycyny molekularnej. W konsekwencji rozszerzenie badań w kierunku nauk stosowanych może przyczynić się do powstania nowej koncepcji terapii uzupełniającej, która wyciszy, spowolni lub zahamuje rozwój oporności na trastuzumab.