

STRESZCZENIE

Leczenie oraz prewencja chorób nowotworowych stanowi jedno z najpilniejszych wyzwań współczesności. Liczne badania wskazują na ważną rolę niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) w przeciwdziałaniu tym chorobom. Wiadomo, że czynnikiem promującym wzrost i proliferację komórek nowotworowych jest chroniczne zapalenie. Głównym czynnikiem prozapalnym jest cyklooksygenaza typu 2 (COX2), stąd przeciwnowotworowe właściwości NLPZ były tłumaczone zdolnością hamowania aktywności COX2. W sprzeczności z tymi danymi jest jednak fakt, że NLPZ wywołują podobny efekt przeciwnowotworowy w komórkach, które nie posiadają COX2. Wskazuje to na istnienie niezależnych od COX2 mechanizmów przeciwnowotworowego działania NLPZ. Wiadomo, że niektóre NLPZ (jak np. Indometacyna, Diklofenak) są ligandami jądrowych receptorów PPAR γ powodując ich aktywację. Receptory PPAR należą do rodziny hormonalnych receptorów jądrowych i posiadają aktywność czynników transkrypcyjnych. Pełnią ważną rolę w regulacji ekspresji genów związanych z metabolizmem energetycznym, apoptozą oraz zapaleniem. Spośród różnych właściwości receptorów PPAR γ jedna zasługuje na szczególną uwagę. Wykazują one zdolność do indukcji ekspresji dehydrogenazy prolinowej/oksydazy prolinowej (PRODH/POX) - mitochondrialnego enzymu katalizującego konwersję proliny do kwasu pirolidyno-5-karboksylowego (P5C). Podczas tego procesu, wolne elektrony są transportowane do łańcucha oddechowego produkując ATP lub też generują reaktywne formy tlenu (RFT). W pierwszym przypadku, aktywacja PRODH/POX prowadzi do produkcji ATP dostarczając energii i służąc przeżyciu, w drugim przypadku generowanie RFT powoduje stres oksydacyjny, który jest silnym induktorem apoptozy.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była weryfikacja tezy, że NLPZ jako agoniści receptora PPAR γ indukują apoptozę komórek raka piersi MCF7 w wyniku nasilenia ekspresji PRODH/POX. W celu potwierdzenia tej tezy zbadano wpływ wybranych NLPZ (Ibuprofen, Indometacyna, Diklofenak, Sulindak i Celekoksyb) na podstawowe funkcje życiowe komórek raka piersi MCF7. Aby określić molekularne mechanizmy przeciwnowotworowego działania NLPZ dokonano analizy ekspresji niektórych markerów apoptozy i autofagii, a także zbadano wpływ użytych związków na indukcję stresu oksydacyjnego. W celu udokumentowania roli PRODH/POX w procesie apoptozy indukowanej NLPZ stworzono unikalny klon komórek MCF7 ze znokautowanym genem PRODH/POX metodą CRISPR/Cas9.

Wyniki badań przeprowadzone na opisanych modelach komórkowych wykazały, że mechanizm przeciwnowotworowego działania NLPZ jest związany z udziałem PRODH/POX. Badane leki jako agoniści receptorów PPAR γ powodują wzrost ekspresji PRODH/POX i generowania RFT indukujących apoptozę. Efektem indukowanego przez NLPZ stresu oksydacyjnego jest uszkodzenie DNA, o czym świadczy nasilona aktywność PARP oraz ekspresja i translokacja do jądra komórkowego białka p53 w komórkach MCF7. W komórkach ze znokautowanym genem PRODH/POX nie obserwowano tego efektu. Ocena poziomu ekspresji markerów apoptozy w komórkach MCF7 (p53, kaspazy 9, 8 i 7, a także markerów autofagowej śmierci komórki (Beklina 1, ATG 5 i ATG 7) potwierdziły, że przeciwnowotworowe właściwości NLPZ są związane z indukcją apoptozy szlakiem wewnątrzpochodnym (ekspresja aktywnej kaspazy 9). Ponadto, NLPZ powodują zarówno nasilenie ekspresji PRODH/POX, konwertującego prolinę do P5C jak i PYCR1, konwertującego P5C do proliny, co świadczy o pobudzającym wpływie NLPZ na obrót proliny w komórce, tzw. „cykl prolinowy”. W komórkach ze znokautowanym genem PRODH/POX, NLPZ tracą zdolność do pobudzania procesu tworzenia RFT, natomiast nadal wykazują zdolność do indukcji procesu apoptozy, jednak na drodze zewnątrzpochodnej (ekspresja aktywnej kaspazy 8). W komórkach tych dochodzi do zwiększania stężenia proliny, a także kwasu glutaminowego i glutaminy będących substratami do syntezy proliny, która jest substratem PRODH/POX. Analizy ekspresji białek związanych z regulacją procesów energetycznych w badanych komórkach, a także procesów związanych z metabolizmem proliny (biosynteza kolagenu, aktywność prolidazy) sugeruje, że PRODH/POX może stanowić potencjalny punkt uchwytu eksperymentalnej farmakoterapii raka piersi.