

Streszczenie

Rak przełyku, plasujący się na ósmym miejscu co do częstości występowania na świecie, jest jednym z najbardziej agresywnych nowotworów złośliwych. Cechuje się niską przeżywalnością i szybkim przerzutowaniem. Wyróżnia się jego dwa główne typy histologiczne: rak płaskonabłonkowy (ESCC) i gruczolakorak (EAC). Rak płaskonabłonkowy, będący najczęściej diagnozowanym typem ogółem na świecie, dominuje w krajach rozwijających się, podczas gdy rak gruczolowy jest dominującym typem w krajach rozwiniętych, zwłaszcza w Ameryce i w Europie, w tym w Polsce.

W patogenezie raka przełyku bierze udział wiele czynników, włączając stan zapalny, obecnie uznawany za jeden z dziesięciu znaków szczególnych nowotworów.

Wśród mediatorów stanu zapalnego, uwalnianych do mikrośrodowiska guza i uważanych za kluczowe dla rozwoju nowotworów są cytokiny, wśród których jedną z najlepiej poznanych jest czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α).

TNF- α , jak większość cytokin, charakteryzuje się działaniem plejotropowym. Z jednej strony ma zdolność indukcji apoptozy (zaprogramowanej śmierci komórki) lub nekrozy, procesów prowadzących do śmierci komórki. Z drugiej strony wiadomo, że poprzez aktywację ścieżki sygnałowej związanej z NF κ B stymuluje komórki w kierunku proliferacji, promując ich przeżycie, co w przypadku nowotworów przekłada się na progresję choroby. Jak pokazały ostatnie badania, jednym z najważniejszych działań TNF- α w kontekście inwazji i przerzutowania nowotworów jest zdolność do indukcji ekspresji i aktywacji białek proteolitycznych, przede wszystkim metaloproteinazy macierzy 9 (MMP9), której podwyższone poziomy charakteryzują większość nowotworów i korelują z ich inwazyjnością i przerzutowaniem. Wiadomo też, że TNF- α ma wpływ na regulację metabolizmu lipidów i komórkowej homeostazy glukozy. Są dowody, że działając jako potencjalny induktor efektu Warburga, może odgrywać istotną rolę w przeprogramowaniu metabolicznym komórek nowotworowych, w którym kluczowym enzymem jest dehydrogenaza mleczanowa (LDH), odpowiadająca nie tylko za dostosowanie komórek nowotworowych do specyficznych wymagań metabolicznych ale też za wzrost kwasowości mikrośrodowiska guza, co sprzyja inwazji, neoangiogenezie, przerzutowaniu, immunosupresji i oporności na leczenie.

Mechanizmy, które determinują pro- i antyapoptotyczny efekt TNF- α na komórki nie są jasne. Pytanie więc, czy zmiany metaboliczne związane z adaptacją metabolizmu zależnego od LDH przez komórki nowotworowe mają wpływ na zdolność przełączania ścieżki transmisji sygnału stymulowanego przez TNF- α z prowadzącego do apoptozy na promujący przeżycie, pozostaje otwarte. Dlatego celem tej pracy była próba oceny udziału LDH, w szczególności podjednostki A (LDHA), w ucieczce komórek nowotworowych przed apoptozą, indukowaną cytokiną prozapalną TNF- α , na przykładzie komórek raka przełyku.

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem danych, zgromadzonych w internetowej bazie TNMplot, dotyczących poziomu ekspresji wybranych genów (*LDHA*, *LDHB*, *TNFA*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B* oraz *MMP9*) w guzach pierwotnych przełyku i tkankach przerzutowych; materiału klinicznego w formie preparatów parafinowych raka przełyku, barwionych metodą immunohistochemii (IHC); oraz linii komórkowych, KYSE150 oraz EC7, reprezentujących odpowiednio płaskonabłonkowego raka przełyku oraz gruczolakoraka przełyku, które analizowano za pomocą testów komórkowych takich jak: test żywotności (MTT), proliferacji, migracji, senescencji i apoptozy (przy użyciu cytometrii przepływowej), oraz takich metod jak: elektroforeza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) i natywnych (zymografia), Western blotting, reakcja łańcuchowa polimerazy (qPCR) i kolorymetryczny pomiar stężenia mleczanu. W celu zahamowania aktywności LDHA w komórkach raka przełyku użyto specyficznego dla LDHA inhibitora, oksamatu sodu (SO) i wyciszono ekspresję genu *LDHA* za pomocą siRNA.

Wykazano, że ekspresja *LDHA* była znacząco zwiększona w tkankach guzów pierwotnych ($p < 0,00001$) i znacząco zmniejszona ($p < 0,00001$) w tkankach przerzutowych w porównaniu z tkankami prawidłowymi. Ekspresja *LDHB* zwiększała się istotnie w tkankach guzów pierwotnych ($p < 0,00001$) oraz w tkankach przerzutowych ($p < 0,05$) w porównaniu z tkankami prawidłowymi. Ekspresja *TNFA* w tkankach guzów pierwotnych nie różniła się od tej w tkankach prawidłowych ($p > 0,05$) ale zwiększała się znacząco w tkankach przerzutowych ($p < 0,00001$). Ekspresja genu kodującego receptor 1 TNF- α , *TNFRSF1A*, w tkankach guzów pierwotnych nieznacznie się zmniejszała, a w tkankach przerzutowych nie zmieniła się w porównaniu z tkankami prawidłowymi ($p > 0,05$). Ekspresja genu kodującego receptor 2 TNF- α , *TNFRSF1B*, w tkankach guzów pierwotnych nie różniła się od tej w tkankach prawidłowych, ale zwiększyła się istotnie w tkankach przerzutowych ($p < 0,00001$). Ekspresja *MMP9* zwiększała się istotnie zarówno w tkankach guzów pierwotnych ($p < 0,00001$) jak i w tkankach przerzutowych ($p < 0,00001$) w

porównaniu z tkankami prawidłowymi, przy czym poziom ekspresji *MMP9* w tkankach przerzutowych był istotnie większy niż w tkankach pierwotnych ($p < 0,00001$). Analiza zmian ekspresji LDHA na poziomie białka, oznaczonego metodą IHC, w tkankach nowotworowych przełyku (N=10) wykazała istotnie większy poziom w porównaniu z histologicznie prawidłowym nabłonkiem przełyku (N=10), pochodzącym z marginesu resekcji ($p < 0,00001$).

Wykorzystując metodę RT-qPCR do analizy zmian ekspresji *LDHA* i *LDHB* w odpowiedzi na TNF- α w warunkach *in vitro* wykazano, że traktowanie komórek KYSE150 TNF- α powodowało istotne zwiększenie ekspresji obu podjednostek (FC=1,98 \pm 0,08 i 1,88 \pm 0,2, odpowiednio dla LDHA i LDHB, $p < 0,005$). W przypadku EC7 traktowanie TNF- α znacząco zwiększyło ekspresję LDHA (FC= 2,28 \pm 0,26; $p < 0,001$) ale nie LDHB (FC=1,47 \pm 0,39; $p > 0,05$). Analiza poziomu LDHA i LDHB za pomocą metody Western blotting pokazała brak pozytywnej reakcji dla LDHB w EC7 co było zgodne z izoenzymogramem LDH. W komórkach KYSE150 obserwowano aktywność wszystkich izoenzymów LDH (LD1-LD5), natomiast w komórkach EC7 aktywna była tylko izoforma LD5, zbudowana z podjednostek A.

Analiza ilościowa apoptozy metodą cytometrii przepływownej, w populacji komórek EC7 transfekowanych siRNA LDHA i traktowanych TNF- α (30 ng/ml/24h) wykazała, że wyciszenie ekspresji LDHA nie uwrażliwiło komórek raka przełyku na proapoptotyczne działanie TNF- α . Całkowita liczba komórek apoptotycznych w populacji komórek z wyciszoną ekspresją LDHA i traktowanych TNF- α (7,75%) nie zmieniła się znacząco w porównaniu z komórkami kontrolnymi (8,8% i 9,19%, odpowiednio transfekowanych siRNA kontrolnym i nietransfekowanych). Podobnie, hamowanie aktywności LDHA za pomocą SO (50 mM/48h) nie uwrażliwiło komórek EC7 na proapoptotyczne działanie TNF- α . Całkowita liczba komórek apoptotycznych w populacji komórek traktowanych SO i TNF- α (16,41%) nie zmieniła się znacząco w porównaniu z komórkami kontrolnymi (19,28%, traktowanymi wyłącznie SO). Efekt ten został potwierdzony w badaniach z użyciem metody Western blotting, oceniających zmiany w aktywacji markerów apoptozy. Zmniejszanie aktywności LDHA, zarówno za pomocą siRNA, jak i SO, w KYSE150 i EC7 nie powodowało aktywacji kaspazy 8 i kaspazy 3 oraz PARP1 w odpowiedzi na TNF- α .

Analiza procentowego udziału komórek pozytywnie barwiących się w kierunku lizosomalnej β -galaktozydazy w populacji komórek traktowanych SO i TNF- α (12,5 \pm 1,9%) wykazała brak różnic statystycznych ($p > 0,05$) w stosunku do populacji komórek traktowanych

wyłącznie SO ($11,3 \pm 1,5\%$) co pokazało, że hamowanie aktywności LDHA za pomocą SO (50 mM) również nie miało wpływu na senescencję indukowaną TNF- α .

Hamowanie LDHA za pomocą SO nie miało też znaczącego wpływu na żywotność i proliferację komórek raka przełyku. Żywotność komórek KYSE150 i EC7 mierzono po 48-godzinnej ekspozycji na SO w stężeniach 25 mM i 50 mM przy użyciu testu MTT. Komórki były dodatkowo traktowane lub nie TNF- α (30 ng/ml/24h). Użycie SO samego, jak i w kombinacji z TNF- α nie powodowało znaczących zmian w żywotności komórek ($p > 0,05$). Analiza ilościowa potencjału proliferacyjnego komórek EC7 traktowanych SO (50 mM) wykazała, że hamujący wpływ na proliferację można było obserwować po 72 h ($p < 0,001$) i 96 h ($p < 0,005$) ale nie po 24 h ekspozycji na SO ($p > 0,05$)

Natomiast SO skutecznie hamował wydzielanie mleczanu w KYSE150 i EC7, a obserwowane różnice w stosunku do kontroli były istotne statystycznie ($p < 0,005$). Wyciszenie ekspresji genu *LDHA* za pomocą siRNA również skutkowało zmniejszeniem produkcji mleczanu w obu liniach komórkowych, jednak zmiany te były nieznaczne i statystycznie nieistotne w stosunku do kontroli ($P > 0,05$). Wyniki uzyskane w teście migracji pokazały, że SO istotnie hamował efekt indukowanej przez TNF- α (30 ng/ml) migracji komórek raka przełyku ($p < 0,005$). Podobny efekt obserwowano w komórkach z wyciszoną ekspresją LDHA. TNF- α istotnie zwiększał potencjał migracyjny komórek kontrolnych, ale nie komórek transfekowanych siRNA LDHA ($p > 0,05$).

Analizując wpływ hamowania aktywności LDHA oraz wpływ mleczanu na indukowaną przez TNF- α sekrecję i aktywację MMP9 w komórkach raka przełyku wykazano, że mleczan działa synergistycznie z TNF- α , potęgując jego efekt na sekrecję i aktywację MMP9 w komórkach KYSE150 (FC=1,38) w porównaniu z kontrolą natomiast, SO znacząco ten efekt hamuje (FC=0,47), co wykazano za pomocą zymografii żelatynowej. Wyciszenie ekspresji LDHA w KYSE150 za pomocą siRNA znacząco obniżyło sekrecję MMP9 indukowaną przez TNF- α w porównaniu z komórkami kontrolnymi, zarówno nietransfekowanymi, jak i transfekowanymi kontrolnym siRNA (odpowiednio FC=0,79 i FC=0,5).

Podsumowując, w tej pracy wykazano, że hamowanie aktywności LDHA w komórkach raka przełyku nie odblokowuje ścieżki apoptotycznej związanej z TNF- α , a więc nie generuje zmiany odpowiedzi komórkowej na TNF- α z pronowotworowej na antynowotworową.

Udowodniono jednak, że użycie specyficznego inhibitora LDHA znosi promigracyjny efekt TNF- α na komórki raka przełyku oraz hamuje indukowaną przez TNF- α sekrecję MMP9, co wiąże

się z osłabieniem aktywacji ścieżki sygnałowej związanej z Erk1/2. Potwierdzono tym samym bezpośrednią zależność pomiędzy statusem metabolicznym glukozy i skutecznością odpowiedzi komórek nowotworowych na pronowotworowe działanie TNF- α , jednej z głównych cytokin prozapalnych, związanych z kancerogenezą i progresją nowotworową.

Udowodniono ponadto skuteczność SO w hamowaniu sekrecji mleczanu oraz jego antyproliferacyjne działanie na komórki raka przełyku. Uzyskane w tej pracy wyniki dają podstawę do rozważenia zastosowania inhibitora LDHA w projektowaniu terapii uzupełniającej u pacjentów z rakiem przełyku.

Summary

Esophageal cancer, the eighth most common cancer in the world, is one of the most aggressive malignancies. It is characterized by low survival rate and rapid metastasis. There are two main histological types: squamous cell carcinoma (ESCC) and adenocarcinoma (EAC). Squamous cell carcinoma, being the most commonly diagnosed type overall in the world, predominates in the developing countries, while adenocarcinoma is the dominant type in developed countries, especially in America and Europe, including Poland.

Many factors are involved in the pathogenesis of esophageal cancer, one of which is inflammation, currently recognized as one of the hallmarks of cancer.

Among the mediators of inflammation, released into the tumor microenvironment and considered crucial for the development of cancer, there are cytokines, among which one of the best known is tumor necrosis factor α (TNF- α).

TNF- α , like most cytokines, is pleiotropic. On the one hand, it has the ability to induce apoptosis (programmed cell death) or necrosis, processes leading to cell death. On the other hand, it is known that by activating the signaling pathway associated with NF κ B, it stimulates cells to proliferate, promoting their survival, which in the case of cancer leads to disease progression. As recent studies have shown, one of the most important functions of TNF- α regarding the tumor invasion and metastasis is its ability to induce the expression and activation of proteolytic proteins, primarily matrix metalloproteinase 9 (MMP9), whose elevated levels characterize most cancers and correlate with their invasiveness and metastasis. TNF- α is also known to influence the regulation of lipid metabolism and cellular glucose homeostasis. There is evidence that acting as a potential inducer of the Warburg effect, it may play an important role in the metabolic reprogramming of cancer cells, in which the key enzyme is lactate dehydrogenase (LDH), responsible not only for adapting cancer cells to specific metabolic requirements, but also for increasing the acidity of the tumor microenvironment which promotes invasion, neo-angiogenesis, metastasis, immunosuppression and treatment resistance.

The mechanisms that determine the pro- and anti-apoptotic effect of TNF- α on cells are not clear. Thus, the question of whether the metabolic changes associated with the adaptation of LDH-dependent metabolism by cancer cells affect the ability to switch the TNF- α -stimulated signaling pathway from the one leading to apoptosis to the one promoting survival remains open.

Therefore, the aim of this study was to assess the role of LDH, in particular the A subunit (LDHA), in the escape of cancer cells from apoptosis, induced by the proinflammatory cytokine TNF- α , based on the example of esophageal cancer cells.

The study was conducted using data collected in the online database TNMplot, concerning the level of expression of selected genes (*LDHA*, *LDHB*, *TNFA*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B* and *MMP9*) in primary esophageal tumors and metastatic tissues; clinical material in the form of paraffin preparations of esophageal cancer stained by immunohistochemistry (IHC); and cell lines, KYSE150 and EC7, representing esophageal squamous cell carcinoma and esophageal adenocarcinoma, respectively, which were analyzed by cell assays such as MTT, proliferation, migration, senescence and apoptosis (using flow cytometry), and methods such as denaturing (SDS-PAGE) and native (zymography) electrophoresis, Western blotting, polymerase chain reaction (qPCR) and colorimetric measurement of lactate concentration. To inhibit LDHA activity in esophageal cancer cells, the LDHA-specific inhibitor sodium oxamate (SO) was used and LDHA gene expression was silenced with siRNA.

It was shown that *LDHA* expression was significantly increased in primary tumor tissues ($p < 0.00001$) and significantly decreased ($p < 0.00001$) in metastatic tissues compared to normal tissues. *LDHB* expression was significantly increased in primary tumor tissues ($p < 0.00001$) and metastatic tissues ($p < 0.05$) compared to normal tissues. *TNFA* expression in primary tumor tissues did not differ from normal tissues ($p > 0.05$) but was significantly increased in metastatic tissues ($p < 0.00001$). The expression of the TNF- α receptor 1 gene, *TNFRSF1A*, was slightly decreased in primary tumor tissues and remained unchanged in metastatic tissues compared to normal tissues ($p > 0.05$). Expression of the gene encoding TNF- α receptor 2, *TNFRSF1B*, in primary tumor tissues did not differ from that in normal tissues, but was significantly increased in metastatic tissues ($p < 0.00001$). *MMP9* expression was significantly increased in both primary tumor tissues ($p < 0.00001$) and metastatic tissues ($p < 0.00001$) compared to normal tissues, with *MMP9* expression levels significantly higher in metastatic tissues than in primary tissues ($p < 0.00001$). The analysis of changes in LDHA expression at the protein level, determined by IHC, in esophageal cancer tissues (N=10) showed a significantly higher level compared to histologically normal esophageal epithelium (N=10) from the resection margin ($p < 0.00001$).

Using the RT-qPCR method to analyze changes in the expression of *LDHA* and *LDHB* in response to TNF- α in vitro, it was shown that treatment of KYSE150 cells with TNF- α

significantly increased the expression of both subunits (FC=1.98±0.08 and 1.88±0.2 for LDHA and LDHB, respectively, $p < 0.005$). For EC7, TNF- α treatment significantly increased expression of LDHA (FC=2.28±0.26; $p < 0.001$) but not LDHB (FC=1.47±0.39; $p > 0.05$). Analysis of LDHA and LDHB levels by Western blotting showed no positive reaction for LDHB in EC7, which was consistent with the LDH isoenzyme. In KYSE150 cells, the activity of all LDH isoenzymes (LD1-LD5) was observed, while in EC7 cells only the LD5 isoform, built of A subunits, was active.

Quantitative analysis of apoptosis by flow cytometry in a population of EC7 cells transfected with LDHA siRNA and treated with TNF- α (30 ng/ml/24h) showed that suppression of LDHA expression did not sensitize esophageal cancer cells to the pro-apoptotic effects of TNF- α . The total number of apoptotic cells in the population of LDHA-silenced and TNF- α -treated cells (7.75%) did not change significantly compared to control cells (8.8% and 9.19%, transfected with control siRNA and not transfected, respectively). Similarly, inhibition of LDHA activity with SO (50 mM/48 h) did not sensitize EC7 cells to the pro-apoptotic effects of TNF- α . The total number of apoptotic cells in the population of cells treated with SO and TNF- α (16.41%) did not change significantly compared to control cells (19.28%, treated with SO alone). This effect was confirmed in studies using the Western blotting method, evaluating changes in the activation of apoptosis markers. Silencing of LDHA expression by both siRNA and SO in KYSE150 and EC7 did not activate caspase 8 and caspase 3 and PARP1 in response to TNF- α .

Analysis of the percentage of cells staining positively for lysosomal β -galactosidase in the population of cells treated with SO and TNF- α (12.5±1.9%) showed no statistical differences ($p > 0.05$) in relation to the population of cells treated with SO alone (11.3±1.5%), which showed that inhibition of LDHA activity with SO (50 mM) also had no effect on TNF- α -induced senescence.

Inhibition of LDHA with SO also had no significant effect on the viability and proliferation of esophageal cancer cells. KYSE150 and EC7 cell viability was measured after 48-hour exposure to SO at 25 mM and 50 mM using the MTT assay. Cells were additionally treated with or without TNF- α (30 ng/ml/24h). The use of SO alone and in combination with TNF- α did not cause significant changes in cell viability ($p > 0.05$). Quantification of the proliferative potential of EC7 cells treated with SO (50 mM) showed that the inhibitory effect on proliferation could be observed after 72 h ($p < 0.001$) and 96 h ($p < 0.005$) but not after 24 h exposure to SO ($p > 0.05$).

On the other hand, SO effectively inhibited lactate secretion in KYSE150 and EC7, and the observed differences in relation to the control were statistically significant ($*p < 0.005$). Silencing of LDHA gene expression with siRNA also resulted in a decrease in lactate production in both cell lines, but these changes were small and not statistically significant compared to controls ($P > 0.05$). The results obtained in the migration test showed that SO significantly inhibited the effect of TNF- α (30 ng/ml) induced migration of esophageal cancer cells ($p < 0.005$). A similar effect was observed in cells with suppressed LDHA expression. TNF- α significantly increased the migration potential of control cells, but not cells transfected with LDHA siRNA ($p > 0.05$).

By analyzing the effect of inhibition of LDHA activity and the effect of lactate on TNF- α -induced MMP9 secretion and activation in esophageal cancer cells, it was shown that lactate acts synergistically with TNF- α , enhancing its effect on MMP9 secretion and activation in KYSE150 cells (FC=1.38) in compared to the control, SO significantly inhibited this effect (FC=0.47), as demonstrated by gelatin zymography. Silencing of LDHA expression in KYSE150 with siRNA significantly reduced MMP9 secretion induced by TNF- α compared to control cells, both untransfected and transfected with control siRNA (FC=0.79 and FC=0.5, respectively).

In summary, this study showed that inhibition of LDHA activity in esophageal cancer cells does not unblock the apoptotic pathway associated with TNF- α , and thus does not generate a change in the cellular response to TNF- α from pro-cancer to anti-cancer.

However, it has been proven that the use of a specific LDHA inhibitor abolishes the promigratory effect of TNF- α on esophageal cancer cells and inhibits the secretion of MMP9 induced by TNF- α . Thus, a direct relationship between the metabolic status of glucose and the effectiveness of the response of cancer cells to the pro-cancer effect of TNF- α , one of the main pro-inflammatory cytokines associated with carcinogenesis and cancer progression, was confirmed.

Moreover, the effectiveness of SO in inhibiting lactate secretion and its anti-proliferative effect on esophageal cancer cells has been proven. The results obtained in this work provide grounds for considering the use of an LDHA inhibitor in the design of adjuvant therapy in patients with esophageal cancer.