

**POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
W SZCZECINIE**



Mgr Donata Simińska

**EKSPRESJA RECEPTORÓW ZALEŻNYCH OD HORMONÓW PŁCIOWYCH
W GLEJAKU WIELOPOSTACIOWYM**

**EXPRESSION OF SEX HORMONE DEPENDENT RECEPTORS
IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Dyscyplina nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n. med. Irena Baranowska-Bosiacka

Promotor pomocniczy: dr n. med. Patrycja Kupnicka

Szczecin 2023 r.

STRESZCZENIE

Wstęp: Glejak wielopostaciowy (GBM) jest nowotworem, którego charakterystyczny sposób wzrostu może wywierać wpływ na tworzenie się w jednym guzie różnych linii komórkowych. GBM podczas naciekania zdrowych tkanek tworzy swego rodzaju długie wypustki. Ograniczony dostęp do składników odżywczych i tlenu w niektórych częściach guza, wpływa na powstanie w guzie obszarów martwicy. W wyniku czego w samym guzie powstają różniące się od siebie struktury. Za udziałem receptorów zależnych od hormonów płciowych w zmianie biologii komórek glejaka przemawia fakt, iż występowanie tych nowotworów różni się istotnie pomiędzy płciami. Znacznie częściej chorują mężczyźni, a kobiety w wieku przed menopauzalnym charakteryzują się wyższą przeżywalnością w stosunku do kobiet w wieku po menopauzalnym, czy mężczyzn. Receptory zależne od hormonów płciowych pełnią istotną rolę w progresji wielu nowotworów. Wpływają na regulację szlaków indukujących proliferację i migrację komórek glejaka wielopostaciowego.

Cel: Celem przeprowadzonych badań było określenie ekspresji receptorów zależnych od hormonów płciowych w poszczególnych strukturach guza GBM, a także sprawdzenie wpływu warunków panujących w guzie na ekspresję receptorów zależnych od hormonów płciowych *in vitro*. Cele szczegółowe obejmowały: (1) Sprawdzenie ekspresji genów i białek oraz lokalizacji komórkowej białek receptorów zależnych od hormonów płciowych (receptora androgenowego (AR), progesteronowego (PGR), estrogenowego α (ER α), estrogenowego β (ER β), prolaktynowego (PRLR), folikulotropowego (FSHR)) w poszczególnych strukturach guza (rdzeń, kora, obrzeże guza). (2) Sprawdzenie różnic w ekspresji genów i białek receptorów zależnych od hormonów płciowych (AR, PGR, ER α , ER β , PRLR, FSHR) w poszczególnych strukturach guza (rdzeń, kora, obrzeże guza) u kobiet i mężczyzn. (3) Sprawdzenie ekspresji genów i białek oraz lokalizacji komórkowej białek receptorów zależnych od hormonów płciowych (AR, PGR, ER α , ER β , PRLR, FSHR) w różnych warunkach występujących w guzie (warunki nekrozy, hipoksji, niedoboru składników odżywczych) w modelu *in vitro* z wykorzystaniem hodowli komórek glioblastoma astrocytoma (U87).

Materiał i metody: W badaniu zastosowano dwa modele badawcze. Pierwszy wykorzystywał materiał pochodzący z różnych struktur guza GBM od pacjentów hospitali-

zowanych w Klinice Neurochirurgii PUM. Do projektu włączonych zostało 28 pacjentów, w tym 16 mężczyzn i 12 kobiet, w wieku od 36 do 81 lat. Materiał stanowiły próby pobrane z trzech obszarów guza: niewzrastającego rdzenia guza obejmującego głównie obszary martwicy, kory guza, czyli strefy guza rosnącego i obrzeża guza. Drugi model badawczy, model *in vitro*, został stworzony w celu sprawdzenia, czy analizowane czynniki wpływają na ekspresję badanych receptorów. Hodowle komórkowe linii U87 poddano wpływowi warunków: nekrozy, hipoksji i niedoboru składników odżywczych, imitujących warunki panujące w guzie. W badanym materiale określono ekspresję genów badanych receptorów metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR). Ekspresję białek badanych receptorów określono przy użyciu testów immunoenzymatycznych. Obecność i lokalizację białek receptorów zależnych od hormonów płciowych w badanym materiale dodatkowo wykazano metodami mikroskopii konfokalnej (w komórkach linii U87) i analizy immunohistochemicznej (tkanki guza pochodzące od pacjentów).

Wyniki: W obrzeżu guza GBM zaobserwowano wzrost ekspresji białek AR, ER β , PGR w stosunku do rdzenia guza, a także wzrost białka PGR w stosunku do kory guza. W korze guza zauważono natomiast wzrost białka AR i mRNA ER β w stosunku do rdzenia guza. Po uwzględnieniu podziału na kobiety i mężczyzn w analizach zaobserwowano, że guzy pochodzące od kobiet charakteryzowały się wzrostem białek AR, ER β w obrzeżu guza w stosunku do rdzenia guza. Guzy pozyskane od mężczyzn cechowały się natomiast wzrostem mRNA ER β w korze guza w stosunku do rdzenia guza. Zauważono również, że guzy mężczyzn charakteryzowały się wzrostem białka PRLR w rdzeniu guza w stosunku do guzów kobiet. Nie zaobserwowano różnic w ekspresji PRLR, ER α , FSHR pomiędzy strukturami guza, a także różnic w ekspresji ER α , FSHR pomiędzy płciami. Warunki niedoboru składników odżywczych wywołały wzrost ekspresji mRNA AR i spadek ekspresji mRNA ER β . Warunki hipoksji spowodowały spadek ekspresji mRNA AR, ER β , PRLR i wzrost ekspresji mRNA ER α . Warunki nekrotyczne nie wywołały natomiast zmian w ekspresji badanych receptorów.

Wnioski: Niewzrastający rdzeń guza GBM, obejmujący obszar martwicy, charakteryzował się obniżonym lub niezmiennym poziomem ekspresji badanych receptorów zależnych od hormonów płciowych w porównaniu do strefy guza rosnącego (kora guza) i obrzeża guza. Strefa silnego wzrostu guza (kora guza) GBM cechowała się obniżonym lub niezmiennym poziomem ekspresji badanych receptorów zależnych

od hormonów płciowych w porównaniu do obrzeża guza. Ekspresja badanych receptorów w poszczególnych strukturach guza nie różniła się u kobiet i mężczyzn, z wyjątkiem ekspresji receptora PRLR w rdzeniu guza, która była niższa u kobiet. Mężczyźni charakteryzowali się niższą ekspresją mRNA receptora ER β w rdzeniu guza w porównaniu do kory guza GBM. Kobiety cechowały się niższą ekspresją białka receptorów AR i ER β w rdzeniu guza w porównaniu do obrzeża guza GBM. Warunki panujące w guzie GBM (hipoksja i niedobór składników odżywczych) były czynnikami, które wywarły wpływ na zmiany w ekspresji badanych receptorów w warunkach *in vitro*. Za udziałem receptorów zależnych od hormonów płciowych w zmianie biologii komórek glejaka wielopostaciowego mogą przemawiać stwierdzone zmiany w ekspresji badanych receptorów u kobiet i mężczyzn. Jednakże dostępne dane nie pozwalają jednoznacznie określić roli tych receptorów w progresji glejaka wielopostaciowego.

SUMMARY

Introduction: Glioblastoma multiforme (GBM) is a neoplasm whose characteristic way of growth may influence the formation of different cell lines in one tumor. GBM, when infiltrating healthy tissues, forms a kind of long protrusions. Limited access to nutrients and oxygen in certain parts of the tumor results in the formation of areas of necrosis in the tumor. As a result, different structures are formed in the tumor itself. The participation of sex hormone-dependent receptors in changing the biology of GBM cells is supported by the fact that the occurrence of these tumors differs significantly between sexes. Men are affected much more often, and premenopausal women have a higher survival rate than postmenopausal women or men. Sex hormone-dependent receptors play an important role in the progression of many cancers. They affect the regulation of pathways inducing the proliferation and migration of GBM cells.

Aim: The study aimed to determine the expression of sex hormone-dependent receptors in individual structures of the GBM tumor, as well as to check the effect of the conditions in the tumor on the expression of sex hormone-dependent receptors in vitro. Specific objectives included: (1) Checking gene and protein expression and cellular localization of sex hormone-dependent receptor proteins (androgen receptor (AR), progesterone receptor (PGR), estrogen α receptor (ER α), estrogen β receptor (ER β), prolactin receptor (PRLR), follicle-stimulating receptor (FSHR)) in individual tumor structures (tumor core, enhancing tumor region, and peritumoral area). (2) Checking the differences in the expression of genes and proteins of sex hormone-dependent receptors (AR, PGR, ER α , ER β , PRLR, FSHR) in individual tumor structures (tumor core, enhancing tumor region, and peritumoral area) in women and men. (3) Checking gene and protein expression and cellular localization of proteins of sex hormone-dependent receptors (AR, PGR, ER α , ER β , PRLR, FSHR) in various tumor conditions (necrosis, hypoxia, nutrient deficiency conditions) in in vitro model using a glioblastoma astrocytoma (U87) cell culture.

Material and methods: Two research models were used in the study. The first one used material from various structures of the GBM tumor from patients hospitalized at the Department of Neurosurgery, PUM. 28 patients were included in the project, including 16 men and 12 women, aged 36 to 81. The material consisted of samples taken from three areas of the tumor: the non-growing tumor core, covering mainly areas of necrosis, the enhancing tumor region, and the peritumoral area. The second research model, the in vitro

model, was created to check whether the analyzed factors affect the expression of the studied receptors. Cell cultures of the U87 line were exposed to the following conditions: necrosis, hypoxia, and nutrient deficiency, imitating conditions in a tumor. The expression of genes of the tested receptors in the tested material was determined by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Protein expression of the studied receptors was determined using enzyme immunoassays. The presence and localization of sex hormone-dependent receptor proteins in the examined material were additionally demonstrated by confocal microscopy (in cells of the U87 line) and immunohistochemical analysis (tumor tissues from patients).

Results: In the peritumoral area of the GBM tumor, an increase in the expression of AR, ER β , and PGR proteins was observed in relation to the tumor core, as well as an increase in the PGR protein in relation to the enhancing tumor region. In the enhancing tumor region, however, an increase in the AR protein and ER β mRNA was observed in relation to the tumor core. After considering the division into women and men in the analyses, it was observed that tumors originating from women were characterized by an increase in AR and ER β proteins in the peritumoral area in relation to the tumor core. On the other hand, tumors obtained from men were characterized by an increase in ER β mRNA in the enhancing tumor region in relation to the tumor core. It was also noted that male tumors were characterized by an increase in PRLR protein in the tumor core relative to female tumors. There were no differences in the expression of PRLR, ER α , and FSHR between tumor structures, and no differences in the expression of ER α , and FSHR between sexes. Nutrient-deficient conditions increased AR mRNA expression and decreased ER β mRNA expression. Hypoxic conditions resulted in a decrease in AR, ER β , and PRLR mRNA expression and an increase in ER α mRNA expression. However, necrotic conditions did not cause changes in the expression of the studied receptors.

Conclusions: The non-growing tumor core of the GBM, including the area of necrosis, was characterized by a reduced or unchanged level of expression of the sex hormone-dependent receptors tested in comparison to the enhancing tumor region and the peritumoral area. The zone of strong tumor growth (enhancing tumor region) of GBM was characterized by a reduced or unchanged level of expression of the sex hormone-dependent receptors studied compared to the peritumoral area. The expression of the studied receptors in individual tumor structures did not differ between men and women, except

for PRLR expression in the tumor core, which was lower in women. Males were characterized by a lower mRNA expression of ER β in the tumor core compared to the GBM-enhancing tumor region. Women were characterized by lower AR and ER β protein expression in the tumor core compared to the GBM peritumoral area. The conditions prevailing in the GBM tumor (hypoxia and nutrient deficiency) were the factors that influenced the changes in the expression of the studied receptors in vitro. The participation of sex hormone-dependent receptors in the change in the biology of glioblastoma multiforme cells may be supported by the observed changes in the expression of the studied receptors in women and men. However, the available data do not allow to unambiguously determine the role of these receptors in the progression of glioblastoma multiforme.