



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Stacjonarne Studia Doktoranckie Genetyki Molekularnej,
Cytogenetyki i Biofizyki Medycznej

Kamila Soboska

Neuromedyna U (NMU) jako regulator aktywności komórek mikrośrodowiska raka jelita grubego

*Neuromedin U (NMU) as a regulator of the activity
of colon cancer microenvironment cells*

Praca doktorska
wykonana w Instytucie Biologii Medycznej
Polskiej Akademii Nauk

Promotor:

- dr hab. Joanna Boncela, prof. IBM PAN

Promotor pomocniczy:

- dr Patrycja Przygodzka

→ Łódź, 2022

*Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania
Pani dr hab. Joannie Bonceli, prof. IBM PAN
za opiekę, nieocenioną pomoc, cierpliwość i wsparcie
podczas przygotowywania niniejszej rozprawy doktorskiej.*

*Szczególne podziękowania składam również
Patrycji Przygodzkiej
za możliwość udziału w inspirującym projekcie i stworzenie niezwyklej atmosfery pracy,
za powierzone zaufanie i możliwość rozwoju umiejętności,
a także pomoc w przygotowaniu niniejszej rozprawy doktorskiej.*

*Dziękuję całemu Zespołowi Pracowni Sygnalizacji Komórkowej
za miłą atmosferę pracy, życzliwość oraz pomoc
podczas wykonywania badań.*

Spis treści

Źródła finansowania badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej.....	4
Wykaz skrótów.....	5
Wstęp.....	9
1. Rak jelita grubego.....	9
2. Mikrośrodowisko nowotworu	12
3. Neuromedyna U i jej receptory	14
4. Działanie receptorów dla NMU.....	17
5. Działanie NMU w procesach fizjologicznych i patologicznych	18
6. NMU a wzajemne oddziaływania w mikrośrodowisku nowotworu	19
Cel pracy	21
Materiały i metody.....	23
1. Odczynniki.....	23
2. Linie komórkowe	26
3. Hodowla linii komórkowych	27
4. Transfekcja i selekcja klonalna.....	28
4.1. Przygotowanie wektora ekspresyjnego	28
4.2. Transfekcja komórek HT29 i selekcja klonalna.....	30
5. Izolacja monocytów z kożuszka leukocyтарно-пłytkowego	31
6. Różnicowanie monocytów i polaryzacja makrofagów	33
7. Wyciszenie ekspresji <i>NMURI</i>	34
8. Przygotowanie medium pohodowlanego (CM, ang. <i>conditioned medium</i>).....	34
8.1. Komórki RJG	34
8.2. Makrofagi i komórki śródbłónka mikronaczyniowego	35
9. Izolacja RNA	35
10. Reakcja odwrotnej transkrypcji	36
11. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym	36
12. Przygotowanie lizatów komórkowych.....	39
13. Oznaczenie ilości białka całkowitego metodą BCA.....	39
14. Analiza Western Immunoblotting (WB).....	40
15. Immunoprecypitacja NMU z medium pohodowlanego.....	41
16. Analiza obecności cytokin w medium pohodowlanym	42
17. Barwienie immunofluorescencyjne oraz mikroskopia konfokalna	43

18. Cytometria przepływowa.....	44
19. Ocena aktywacji ścieżki sygnałowej MAPK	45
20. Ocena zmian fenotypu	46
21. Chemotaksja	47
22. Ocena migracji komórek przez membranę poliwęglanową	48
23. Ocena migracji testem zarastania rysy	49
24. Tworzenie struktur pseudokapilarnych	50
25. Analiza statystyczna	51
Wyniki	52
1. Charakterystyka komórek linii raka jelita grubego (RJG).....	52
1.1. Ocena ekspresji <i>NMU</i> w komórkach RJG	52
1.2. Ocena wewnątrzkomórkowego poziomu <i>NMU</i> w komórkach RJG.....	53
1.3. Ocena wydzielania <i>NMU</i> do środowiska.....	53
2. Przygotowanie i charakterystyka komórek ze stabilną nadekspresją <i>NMU</i>	54
2.1. Przygotowanie wektora ekspresyjnego i transfekcja komórek linii HT29	55
2.2. Transfekcja komórek HT29, selekcja klonalna i identyfikacja <i>NMU</i>	55
2.3. Ocena wydzielania <i>NMU</i> do środowiska przez stabilne klony HT29	56
2.4. Ocena zmian profilu cytokin wydzielanych przez komórki HT29	57
3. Charakterystyka monocytów i makrofagów stosowanych w badaniach.....	59
3.1. Opracowanie optymalnej metody różnicowania monocytów i polaryzacji makrofagów	59
3.2. Ocena ekspresji <i>NMU</i>	62
3.3. Ocena ekspresji <i>NMURs</i>	63
3.4. Ocena ekspresji <i>NTSR1</i> i <i>GHSR1b</i>	65
4. Charakterystyka komórek linii HMEC-1	66
4.1. Ocena ekspresji <i>NMU</i>	66
4.2. Ocena ekspresji <i>NMURs</i>	66
4.3. Ocena ekspresji <i>NTSR1</i> i <i>GHSR1b</i>	67
5. Ocena aktywności receptorów dla <i>NMU</i> w makrofagach i komórkach śródbłonka mikronaczyniowego.....	68
5.1. Fosforylacja kinaz ERK 1/2 w makrofagach pod wpływem <i>NMU</i> -9.....	68
5.2. Analiza fosforylacji kinaz ERK 1/2 w makrofagach po inkubacji z medium pohodowanym z komórek RJG.....	71

5.3. Ocena fosforylacji kinaz ERK 1/2 w komórkach linii HMEC-1 pod wpływem NMU-9	72
5.4. Analiza fosforylacji kinaz ERK 1/2 w komórkach linii HMEC-1 po inkubacji z medium pochodzonym z komórek RJG	73
6. Ocena zmian fenotypowych i funkcjonalnych w komórkach mikrośrodowiska pod wpływem NMU	75
6.1. Ocena zmian fenotypowych w makrofagach wywołanych działaniem NMU	75
6.2. Ocena wpływu NMU na ekspresję markerów śródbłonna nowotworowego	76
6.3. Analiza wpływu NMU na profil cytokin wydzielanych przez makrofagi i komórki śródbłonna mikronaczyniowego.....	76
6.4. Ocena chemotaktycznego działania NMU na makrofagi	77
6.5. Ocena wpływu NMU na zdolności migracyjne makrofagów	78
6.6. Ocena wpływu NMU na zdolności migracyjne komórek linii HMEC-1	79
6.7. Ocena wpływu NMU na zdolność tworzenia struktur pseudokapilarnych przez komórki HMEC-1.....	81
7. Udział NMU w oddziaływaniach składników mikrośrodowiska nowotworu.....	83
7.1. Ocena zdolności migracyjnych komórek RJG w obecności czynników wydzielanych przez komórki mikrośrodowiska guza pod wpływem NMU	83
Dyskusja.....	84
Wnioski	94
Streszczenie.....	96
Abstract.....	99
Literatura	102

Źródła finansowania badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej

Badania zawarte w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały przeprowadzone w Instytucie Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi



BiolMed

i były finansowane z grantu przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu Sonata Bis pt. „*Neuromedyna U jako nowy potencjalny regulator przerzutowania w raku jelita grubego i odbytnicy*” (2016/22/E/NZ3/00341), kierowanego przez dr Patrycję Przygodzką.



Wykaz skrótów

- AA – ang. *arachidonic acid*; kwas arachidonowy
- AC – ang. *adenylate cyclase*; cyklaza adenylanowa
- APC – łac. *adenomatous polyposis coli*; gruczolakowata polipowatość okrężnicy
- ATCC – ang. *American Type Culture Collection*
- ATM – ang. *ataxia telangiectasia mutated*
- BCA – ang. *bicinchoninic acid assay*; metoda oznaczania ilości białka z wykorzystaniem kwasu bicynchoninowego
- BSA – ang. *bovine serum albumin*; albumina surowicy bydlęcej
- cAMP – ang. *cyclic adenosine monophosphate*; cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan
- CCL-2, -3, -4, -5 – ang. *C-C motif chemokine ligand 2, 3, 4, 5*
- CD14 – ang. *cluster of differentiation 14*
- CD163 – ang. *cluster of differentiation 163*
- CD206 – ang. *cluster of differentiation 206*; receptor mannozowy
- CD80 – ang. *cluster of differentiation 80*
- cDNA – ang. *complementary DNA*; komplementarny DNA
- CM – ang. *conditioned medium*; medium pohodowlane
- CMS – ang. *consensus molecular subtypes*; molekularna klasyfikacja raków jelita grubego
- CXCL-1, -10, -12 – ang. *C-X-C motif chemokine ligand 1, 10, 12*
- EDTA – ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*; kwas etylenodiaminotetraoctowy
- EGF – ang. *epidermal growth factor*; czynnik wzrostu naskórka
- EMT – ang. *epithelial–mesenchymal transition*; przejście epitelialno-mezenchymalne
- ERK – ang. *extracellular signal-regulated kinase*; kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym
- FBS – ang. *foetal bovine serum*; płodowa surowica bydlęca
- FITC – ang. *fluorescein isothiocyanate*; izotiocyjanian fluoresceiny
- GAPDH – ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*; dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego

- G-CSF – ang. *granulocyte colony stimulating factor*; czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów
- GHSR1b – ang. *growth hormone secretagogue receptor 1b*; receptor uwalniający hormon wzrostu
- GM-CSF – ang. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*; czynnik stymulacji tworzenia kolonii granulocytów i makrofagów
- GPCRs – ang. *G-protein-coupled receptors*; receptory związane z białkami G
- HLA-DR – ang. *human leukocyte antigens DR*; ludzki antygen leukocytarny DR
- HRP – ang. *horseradish peroxidase*; peroksydaza chrzanowa
- IARC – ang. *International Agency for Research on Cancer*; Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem
- ICAM-1 – ang. *intercellular adhesion molecule 1*; międzykomórkowa molekula adhezyjna-1
- IFN- γ – interferon γ
- IGFBP-7 – ang. *insulin-like growth factor-binding protein 7*; białko wiążące insulinopodobne czynniki wzrostu
- IL-1ra – ang. *interleukin 1 receptor antagonist*; agonista receptora interleukiny 1
- IL-4, -6, -8, -10, -12, -13 – interleukiny 4, 6, 8, 10, 12, 13
- IP3 – ang. *inositol trisphosphate*; 3-fosfatydyloinozytol
- j. a. – jednostki arbitralne
- LOH – ang. *loss of heterozygosity*; utrata heterozygotyczności
- LPS – lipopolisacharydy
- MAPK – ang. *mitogen activated protein kinases*; kinazy białkowe aktywowane mitogenem
- MDM – ang. *monocyte derived macrophages*; makrofagi różnicowane z monocytów izolowanych z krwi obwodowej zdrowych dawców
- MEM – ang. *Minimum Essential Medium*
- MMPs – ang. *matrix metalloproteinases*; metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej
- MMR – ang. *mismatch repair genes*; system naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych
- MSI – ang. *microsatellite instability*; niestabilność mikrosatelitarna
- NEAA – ang. *non-essential amino acids*; aminokwasy endogenne

- NMU – neuromedyna U
- NMUR-1 – ang. *neuromedin U receptor 1*; receptor 1 dla neuromedyny U
- NMUR-2 – ang. *neuromedin U receptor 2*; receptor 2 dla neuromedyny U
- NMURs – ang. *neuromedin U receptors*; receptory dla neuromedyny U
- NT siRNA – ang. *non-targeting siRNA*
- NTSR1 – ang. *neurotensin receptor 1*; receptor dla neruotensyny
- PBM – ang. *peripheral blood monocytes*; monocyty izolowane z krwi obwodowej zdrowych dawców
- PBS – ang. *phosphate buffered saline*; roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanami
- PCR – ang. *polymerase chain reaction*; reakcja łańcuchowa polimerazy
- PE – ang. *phycoerythrin*; fikoerytryna
- PFA – ang. *paraformaldehyde*; paraformaldehyd
- PI3K – ang. *phosphoinositide 3-kinases*; kinazy 3-fosfatydyloinozytolu
- PLA2 – ang. *phospholipase A2*; fosfolipaza A2
- PLC – ang. *phospholipase C*; fosfolipaza C
- PMA – ang. *phorbol 12-myristate-13-acetate*; 12-mirystynian-13-octan forbolu
- PTEN – ang. *phosphatase and tensin homolog*
- RB – białko retinoblastoma
- RCKiK – Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa
- RIN – ang. *RNA integrity number*; współczynnik integralności RNA
- RIPA – ang. *radioimmunoprecipitation assay buffer*;
- RJG – rak jelita grubego
- RPMI 1640 – ang. *Roswell Park Memorial Institute 1640*
- RT – ang. *reverse transcription*; odwrotna transkrypcja
- SDS – ang. *sodium dodecyl sulfate*; siarczan dodecyłu sodu
- STR – ang. *short tandem repeats*; krótkie powtórzenia tandemowe
- siRNA – ang. *small interfering RNA*; małe interferujące RNA
- TAE – ang. *TRIS-Acetate-EDTA*; bufor TRIS-octan-EDTA
- TAMs – ang. *tumour associated macrophages*; makrofagi związane z nowotworem
- TBS – ang. *tris buffered saline*; roztwór soli fizjologicznej buforowany TRIS-em
- TCF/LEF – ang. *T-cell factor/lymphoid enhancer factor*

- TCGA – ang. *The Cancer Genome Atlas*
- TDM – ang. *THP-1 derived macrophages*; makrofagi różnicowane z komórek linii THP-1
- TGF- β – ang. *transforming growth factor β* ; transformujący czynnik wzrostu β
- TME – ang. *tumour microenvironment*; mikrośrodowisko nowotworu
- TMEM – ang. *tumour microenvironment of metastasis*; mikrośrodowisko sprzyjające przerzutom nowotworowym
- TNF- α – ang. *tumour necrosis factor α* ; czynnik martwicy nowotworów α
- TRIS – 2-amino-2-(hydroxymethyl)propano-1,3-diol
- VEGF – ang. *vascular endothelial growth factor*; czynnik wzrostu śródbłonna naczyń
- WGA – ang. *wheat germ agglutinin*; aglutynina z kielków pszenicy

Wstęp

1. Rak jelita grubego

Jelito grube jest ostatnim z odcinków układu pokarmowego człowieka składającym się z: jelita ślepego (kątnicy), okrężnicy (w której wyróżnia się odcinki wstępujący, poprzeczny, zstępujący, esowaty) oraz odbytnicy. Rak jelita grubego (RJG) jest zmianą patologiczną ograniczoną najczęściej do okrężnicy. Łagodne polipy rozwijające się z komórek gruczołowych nabłonka wyścielającego jelito grube stanowią zmiany patologiczne, z których wywodzi się większość nowotworów (szacowane na około 96% wszystkich zmian) [1].

RJG w większości diagnozowanych przypadków ma charakter sporadyczny. Niemniej, część przypadków stanowią zmiany o podłożu dziedzicznym, jak w przypadku m.in. rodzinnej polipowatości gruczolakowatej czy zespołu Lyncha, które są powiązane z przewlekłymi chorobami zapalnymi jelita grubego [2]. Do zmian genetycznych i epigenetycznych prowadzących do powstania i rozwoju RJG zalicza się m.in.: mutacje punktowe, niestabilność chromosomalną, niestabilność mikrosatelitarną lub hypermetylację wysp CpG [2, 3]. Zmiany te dotyczą licznych genów kodujących białka wchodzące w skład szlaków sygnałowych: Wnt, p53, kinaz białkowych aktywowanych mitogenem (MAPK, ang. *mitogen activated protein kinases*), Notch, kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K, ang. *phosphoinositide 3-kinase*) czy transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β , ang. *transforming growth factor β*), które odpowiadają za kontrolę takich procesów, jak podziały komórkowe, różnicowanie czy apoptoza. Nieprawidłowości w ich funkcjonowaniu prowadzą do niekontrolowanych podziałów komórkowych, zahamowania apoptozy oraz zwiększenia zdolności inwazyjnych komórek nowotworowych [4].

Większości przypadków transformacji nowotworowej nabłonka jelita grubego towarzyszą zmiany zachodzące w genach *APC* (łac. *adenomatous polyposis coli*) i *TP53* oraz genach kodujących białka szlaku sygnałowego MAPK. Zmiany dotyczące genu *APC*, obserwowane już we wczesnych etapach transformacji nowotworowej, odpowiedzialne są za rozwój zarówno sporadycznych, jak i dziedzicznych nowotworów jelita grubego. Są to w większości mutacje punktowe prowadzące do utraty funkcji kodowanego białka oraz/lub delecja jednego z alleli *APC* prowadząca do utraty heterozygotyczności (LOH, ang. *loss of heterozygosity*). Białko APC wchodzi w skład kompleksu wiążącego β -kateninę i kierującego ją do degradacji w proteasomie. Nieprawidłowości w ekspresji bądź

aktywności białka APC występujące w RJG skutkują brakiem degradacji β -kateniny, jej nagromadzeniem w komórce i translokacją do jądra komórkowego, gdzie aktywuje czynniki transkrypcyjne TCF/LEF (ang. *T-cell factor/lymphoid enhancer factor*). W efekcie obserwuje się aktywację szlaku Wnt i niekontrolowaną, nadmierną intensywność podziałów komórkowych [2, 3]. Zmiany zachodzące w genie *TP53* obserwowane są głównie w przypadku sporadycznych RJG, w późniejszych etapach procesu nowotworzenia. Podstawowa funkcja białka p53 wiąże się z odpowiedzią komórki na uszkodzenia jej materiału genetycznego. Białko p53 aktywuje w tym przypadku transkrypcję genów kodujących m.in. białka zaangażowane w funkcjonowanie punktów kontrolnych cyklu komórkowego i zatrzymanie cyklu komórkowego, takich jak inhibitor kinaz zależnych od cyklin, p21^{WAF1} i białko retinoblastoma (RB). Działanie p53 wiąże się również z aktywacją apoptozy m.in. poprzez regulację transkrypcji proapoptotycznych białek z grupy Bcl-2. Mutacje genu *TP53* w RJG są głównie mutacjami punktowymi prowadzącymi do utraty funkcji kodowanego białka. Dysfunkcja białka p53 skutkuje postępowaniem cyklu komórkowego oraz brakiem uruchomienia mechanizmów programowanej śmierci komórkowej pomimo nienaprawionych uszkodzeń w materiale genetycznym komórki [5]. Inne mutacje punktowe występujące w RJG dotyczą genów kodujących kinazy serynowo-treoninowe zaangażowane w szlak sygnałowy MAPK, jak *KRAS*, *BRAF* oraz *NRAS*, i wiążą się ze zmianami aktywacji produkowanych białek. Białka powstające w wyniku ekspresji zmutowanych genów pozostają w stanie aktywacji, co z kolei prowadzi do pobudzenia ścieżki sygnałowej MAPK niezależnie od wystąpienia zewnątrzkomórkowego sygnału i, podobnie jak w poprzednich przypadkach, skutkuje niekontrolowanymi podziałami komórkowymi [2, 3, 4].

Inne zmiany genetyczne towarzyszące procesowi powstawania i rozwoju RJG obejmują zjawisko niestabilności mikrosatelitarnej (MSI, ang. *microsatellite instability*), która towarzyszy częściej dziedzicznej postaci RJG (zespół Lyncha), ale także przypadkom sporadycznym. MSI związana jest głównie z nieprawidłowościami w funkcjonowaniu systemów naprawczych genomu. Błędy powstające podczas replikacji sekwencji mikrosatelitarnych powinny być korygowane przez system naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych (MMR, ang. *mismatch repair genes*). Dysfunkcje białek naprawczych systemu MMR, w tym MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2, prowadzą do nagromadzenia błędnie zreplikowanych sekwencji mikrosatelitarnych. Przyczyną nieprawidłowego działania systemu MMR w przypadku sporadycznych RJG jest głównie hypermetylacja sekwencji promotorowych w genach białek naprawczych (np. *MLH1*), zaś w rakach dziedzicznych obserwuje się głównie mutacje punktowe tych genów [2, 3].

RJG jest wysoce heterogenną chorobą o zróżnicowanym podłożu molekularnym, mechanizmie powstawania, fenotypie komórek wchodzących w skład guza, a co za tym idzie niejednakowym przebiegu choroby. Fakt ten stał się powodem do opracowania klasyfikacji tych nowotworów pozwalającej na ujednoczenie prowadzonych badań i przedstawianych wyników. W odniesieniu klinicznym klasyfikacja RJG ułatwia oszacowanie rokowania, dobór najbardziej skutecznej terapii, określenie prawdopodobieństwa występowania nawrotów oraz wskaźnika 5-letniego i całkowitego przeżycia [6]. Jedną z najnowszych klasyfikacji RJG uwzględniającą powyższe cechy jest klasyfikacja molekularna CMS (ang. *consensus molecular subtypes*), która powstała na podstawie analizy transkryptomicznej oraz obserwacji klinicznych przebiegu choroby. W jej obrębie wyróżnia się cztery podtypy RJG: immunologiczny (CMS1), kanoniczny (CMS2), metaboliczny (CMS3) oraz mezenchymalny (CMS4) [6]. Pierwszy z podtypów (CMS1) wyróżnia się wysoką niestabilnością mikrosatelitarną oraz zwiększoną ilością komórek immunologicznych (np. limfocytów) w środowisku nowotworu. CMS1 związany jest również z hypermetylacją wysp CpG oraz wysokim prawdopodobieństwem wystąpienia mutacji genów *BRAF*, *PTEN* (ang. *phosphatase and tensin homolog*) i *ATM* (ang. *ataxia telangiectasia mutated*). Podtyp CMS2 wiąże się z niestabilnością chromosomalną, mutacjami *APC* oraz aktywacją szlaku Wnt i Myc. Inne występujące w tym typie mutacje dotyczą genów *KRAS* oraz *TP53*. W przypadku typu CMS3 obserwuje się najwyższą częstotliwość występowania mutacji genu *KRAS* oraz niewielką częstością występowania niestabilności chromosomalnej. Ponadto, nowotwory tego typu charakteryzuje brak równowagi metabolicznej (przejawiającej się zaburzeniami metabolizmu glutaminy czy kwasów tłuszczowych). Ostatni z podtypów – CMS4 związany jest z aktywacją szlaku TGF- β , nasileniem odczynu zapalnego w środowisku guza oraz ze zwiększoną intensywnością angiogenezy [6, 7, 8].

Według najnowszych statystyk RJG jest trzecim najczęściej diagnozowanym na świecie typem nowotworu oraz drugą co do częstości przyczyną śmierci spowodowanej chorobą nowotworową [9]. Wysoki współczynnik śmiertelności spowodowany jest w tym przypadku długotrwałym rozwojem choroby, podczas którego mało specyficzne objawy (takie jak biegunki, wzdęcia czy ból brzucha) mylone są z zatruciem pokarmowym. Szanse na skuteczne wyleczenie RJG drastycznie obniżają się również poprzez częste tworzenie przerzutów m.in. do płuc czy wątroby [9]. W związku z powyższym, poznanie i szczegółowe badanie mechanizmów przyczyniających się do powstawania oraz rozwoju RJG stanowią istotną część walki z tą chorobą. Pomimo wielu badań prowadzonych na przestrzeni lat,

nadal poszukuje się markerów molekularnych ułatwiających decyzję o rodzaju wprowadzanej terapii oraz informacji będących podstawą do opracowania nowych terapii spersonalizowanych o bardziej skutecznym działaniu i mniejszym obciążeniu organizmu chorego [9]. Co ważne, istotnym tematem najnowszych badań nad chorobami nowotworowymi stają się wzajemne oddziaływania zachodzące pomiędzy składnikami mikrośrodowiska nowotworu (TME, ang. *tumour microenvironment*). Szczególne znaczenie zyskują czynniki wydzielane przez komórki nowotworowe, które mogą zmieniać charakter TME i sprzyjać rozwojowi choroby poprzez stymulację procesu angiogenezy oraz rozsiewania komórek nowotworowych w organizmie [10].

2. Mikrośrodowisko nowotworu

Środowisko w jakim dochodzi do powstania i rozwoju zmiany nowotworowej jest układem, na który składają się m.in. macierz zewnątrzkomórkowa, fibroblasty, komórki układu odpornościowego oraz komórki śródbłonna mikronaczyń krwionośnych i limfatycznych występujących w bezpośrednim sąsiedztwie guza [11].

Szczególnie interesującą częścią mikrośrodowiska w RJG wydają się być makrofagi, zwyczajowo określane jako makrofagi związane z mikrośrodowiskiem nowotworu (TAMs, ang. *tumour associated macrophages*) i stanowiące najliczniejszą z populacji komórek immunologicznych obecnych w niszy nowotworowej. TAMs obecne w RJG różnicują się z monocytarnych komórek prekursorowych przenikających do masy guza z krwiobiegu w odpowiedzi na czynniki wydzielane przez pozostałe składniki niszy. Dzięki naturalnym zdolnościom do polaryzacji (zmiany fenotypu) makrofagi mają możliwość przystosowania się do otaczającego je środowiska. Ze względu na czynniki aktywujące oraz wywołane przez nie zmiany funkcjonalne wyróżnia się dwa zasadnicze typy makrofagów: aktywowane klasycznie M1 oraz alternatywnie M2. Makrofagi M1 o charakterze prozapalnym powstają w odpowiedzi na lipopolisacharydy (LPS) oraz inne czynniki pochodzenia bakteryjnego i wchodzi w interakcję z limfocytami Th1. Cechami charakterystycznymi dla tego fenotypu jest m.in. zwiększona ekspresja białek powierzchniowych CD80 i HLA-DR oraz zwiększenie wydzielania interleukin 6 i 12 (IL-6, -12), czynnika martwicy nowotworu α (TNF- α , ang. *tumour necrosis factor α*) czy interferonu γ (IFN- γ). Makrofagi M2 wykazują działanie przeciwzapalne i proangiogenne, powstają w odpowiedzi na stymulację interleukinami 4, 13, 10 (IL-4, -13, -10) lub glukokortykoidami i współdziałają z limfocytami Th2. Makrofagi M2 wykazują m.in. zwiększoną ekspresję białek

powierzchniowych CD163 i CD206 oraz sekrecję IL-10, TGF- β oraz enzymów z grupy metaloproteinaz (MMPs, ang. *matrix metalloproteinases*) [12, 13, 14, 15].

W przypadku większości rodzajów nowotworów zwiększona ilość TAMs koreluje z gorszymi prognozami. Wiąże się to zazwyczaj z plastycznością fenotypu makrofagów, które mogą wykazywać ekspresję markerów powierzchniowych, cechy oraz funkcje charakterystyczne dla obu fenotypów jednocześnie. Możliwość zmiany fenotypu wykorzystywana jest przez komórki nowotworowe, które poprzez zmianę charakteru mikrośrodowiska mogą stymulować stopniową polaryzację makrofagów z antynowotworowego fenotypu M1 w pronowotworowy fenotyp M2 wraz z rozwojem choroby [14]. Rola makrofagów w przebiegu RJG nadal pozostaje kontrowersyjna i wymaga dalszych badań. Część z publikowanych do tej pory wyników przedstawia korelacje większej infiltracji mikrośrodowiska RJG przez TAMs z większymi szansami na wyleczenie [14, 16, 17], podczas gdy w innych pracach TAMs w RJG definiuje się jako sprzyjające progresji nowotworu makrofagi M2, a ich obecność wiąże się z gorszymi prognozami [17, 18, 19, 20]. Ostatecznie znaczenie makrofagów w RJG wydaje się być zarówno pro-, jak i antynowotworowe i zależne nie tylko od etapu rozwoju choroby, ale również od miejsca występowania makrofagów w masie guza [10, 21]. Jak wykazują jedne z ostatnich badań, makrofagi obecne w obszarze zmiany nowotworowej, a szczególnie w tzw. froncie inwazyjnym nowotworu, to głównie pronowotworowe makrofagi M2, zaś te obecne w tkance otaczającej guz wykazują cechy charakterystyczne dla fenotypu M1 [20].

Innym komponentem mikrośrodowiska, istotnym z punktu widzenia rozwoju nowotworu, są komórki śródbłonka mikronaczyń nowotworowych. Fizjologicznie warstwa śródbłonkowa naczyń stanowi zwartą warstwę komórek nabłonkowych płaskich pełniących funkcje wydzielnicze (przez co zaangażowane są m.in. w kontrolę ciśnienia krwi) oraz biorących udział w wymianie tlenu, substancji odżywczych i zbędnych metabolitów z tkankami. Z funkcjonowaniem komórek śródbłonka związany jest ściśle proces angiogenezy (tworzenia nowych naczyń krwionośnych), który poza fizjologicznym występowaniem w rozwoju zarodkowym, w ukształtowanym organizmie zachodzi m.in. podczas gojenia się ran oraz w stanach patologicznych (jak proces nowotworzenia) [22]. Chociaż w początkowej fazie rozwoju nowotworów obserwowany jest etap awaskularny, gdzie zmiany o wielkości do 2 mm³ funkcjonują bez obecności własnego unaczynienia, to dalszy ich wzrost nie byłby możliwy bez uruchomienia tzw. angiogenezy nowotworowej. Proces ten wymaga wytworzenia środowiska, w którym aktywność czynników antyangiogennych zostanie przewyższona przez działanie czynników proangiogennych,

czemu sprzyja niedostateczna ilość tlenu (hipoksja) indukująca wydzielanie czynnika wzrostu śródbłona naczyń (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) przez komórki nowotworowe. Efektem procesu angiogenezy towarzyszącej nowotworzeniu są naczynia krwionośne znacznie różniące się od naczyń prawidłowych m.in. niejednorodną średnicą w różnych odcinkach naczynia, rozluźnieniem warstwy śródbłona, a co się z tym wiąże spowolnieniem przepływu krwi i zwiększonej przepuszczalności naczyń. Chociaż budową odbiegają od prawidłowych naczyń krwionośnych, naczynia otaczające rozwijający się guz są w stanie dostarczyć do rozwijającej się masy nowotworowej niezbędne czynniki odżywcze czy komórki immunologiczne [23]. Ponadto naczynia krwionośne, wraz z naczyniami limfatycznymi, stanowią główne drogi przemieszczania się komórek nowotworowych do innych narządów [22]. Jak wiadomo, w RJG gęste unaczynienie guza stanowi jeden z czynników przewidywania wystąpienia przerzutów oraz gorszej prognozy [24, 25].

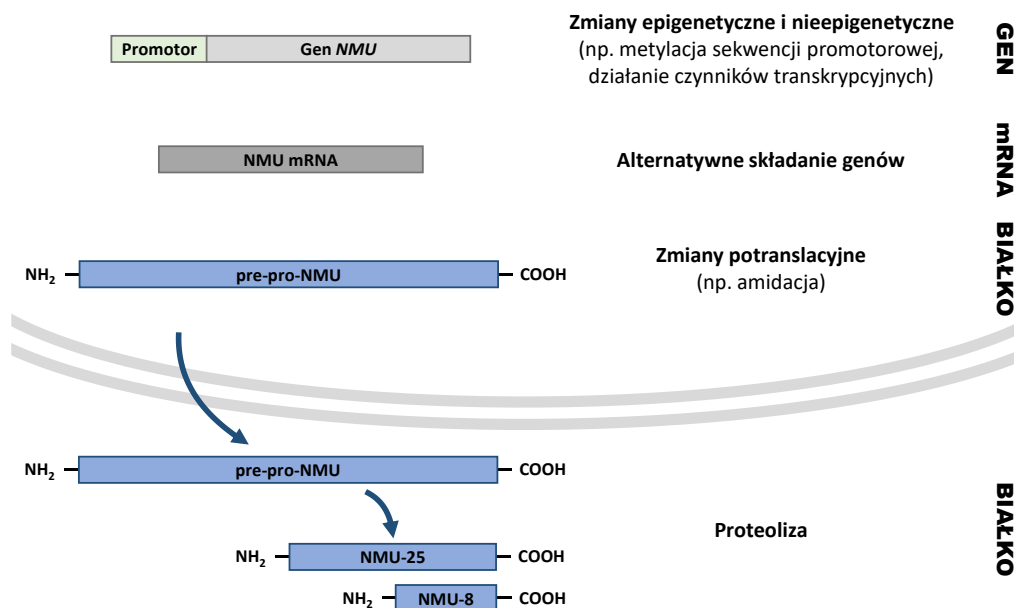
Wspólne działanie komórek nowotworowych, makrofagów oraz komórek śródbłona znajdujących się w TME zostało zaobserwowane w nowotworze piersi. Obszary bogate w wyżej wymienione komórki zostały opisane jako mikrośrodowisko sprzyjające przerzutom nowotworowym (TMEM, ang. *tumour microenvironment of metastasis*), a ich zwiększone zagęszczenie w tkance nowotworowej powiązane z większym prawdopodobieństwem wystąpienia przerzutów. W wyniku badań *in vitro* szczególne znaczenie w funkcjonowaniu TMEM przypisano bezpośredniej interakcji pomiędzy TAMs, a komórkami nowotworowymi. W tym układzie TAMs stymulowały migrację komórek raka piersi, a w szczególności proces formowania przez nie inwazyjnych naczyń, co w efekcie znacząco zwiększało intensywność procesu intrawazacji [26]. W RJG również zaobserwowano korelację pomiędzy większą infiltracją TME przez makrofagi a zwiększeniem zagęszczenia sieci mikronaczyń w nowotworach o wyższym stopniu zaawansowania [27].

3. Neuromedyna U i jej receptory

Małe białko wydzielnicze, neuromedyna U (NMU), należy do białek z grupy neuromedyn odkrytych w latach 80-tych ubiegłego wieku. NMU została wyizolowana po raz pierwszy z rdzenia kręgowego świni, a jej pierwsza zidentyfikowana funkcja wiązała się z wywołaniem skurczu mięśni gładkich. Prowadzone w późniejszych latach badania pozwoliły na stwierdzenie ekspresji NMU w organizmach różnych kręgowców, przy

zachowaniu wysokiej konserwatywności w sekwencji aminokwasowej białka pomiędzy gatunkami, szczególnie w jego C-końcowym fragmencie, odpowiadającym za aktywność biologiczną. W organizmach ssaków najczęściej występujące formy aktywne NMU tworzone są przez łańcuch zbudowany z 25 lub 23 oraz 8 lub 9 aminokwasów. W tym przypadku, niezależnie od formy aktywnej oraz rodzaju organizmu, ostatnie 5 aminokwasów (Phe-Arg-Pro-Arg-Asn) stanowi fragment niezmienny, a ostatni aminokwas w miejscu aktywnym NMU jest amidowany [28, 29, 30, 31].

W organizmie człowieka NMU kodowana jest przez gen leżący na 4 chromosomie (4q12), którego ekspresja obserwowana jest w wielu tkankach, w tym na najwyższym poziomie w centralnym układzie nerwowym oraz układzie pokarmowym [28, 31]. Pomimo wielu badań nad mechanizmem działania NMU, nadal niewiele wiadomo o regulacji ekspresji oraz wydzielania tego białka z komórki. Opublikowane do tej pory wyniki wskazują na regulację ekspresji *NMU* przez mechanizmy epigenetyczne i nieepigenetyczne, polegające m.in. na metylacji sekwencji promotorowej genu oraz działaniu czynników transkrypcyjnych [30, 31]. Kolejno w wyniku zjawiska alternatywnego składania genów, powstaje mRNA dla 6 wariantów pre-pro-peptydu. Najważniejsze z występujących wariantów, z punktu widzenia funkcjonalności NMU, stanowią mRNA dla pre-pro-peptydów o długości 174 oraz 158 i 147 aminokwasów. Obecność w pre-pro-peptydzie 34-aminokwasowej sekwencji sygnałowej kierującej go na zewnątrz komórki wskazuje, że NMU jest wydzielana z komórki właśnie w formie pre-pro-peptydu. Dzięki obecności licznych miejsc cięcia proteolitycznego w sekwencji aminokwasowej, pre-pro-peptydy zostają przekształcone poza komórką, przez nieznaną do tej pory proteazę, do wielu izoform o różnym stopniu aktywności biologicznej, w tym aktywnych form: 25- i 8-aminokwasowej [30, 31]. Dodatkowo, aktywność krótkich form NMU jest zależna od wcześniej wspomnianej amidacji ich C-końca (Ryc. 1) [30, 31].



Ryc. 1. Schemat regulacji ekspresji NMU w ludzkich komórkach.

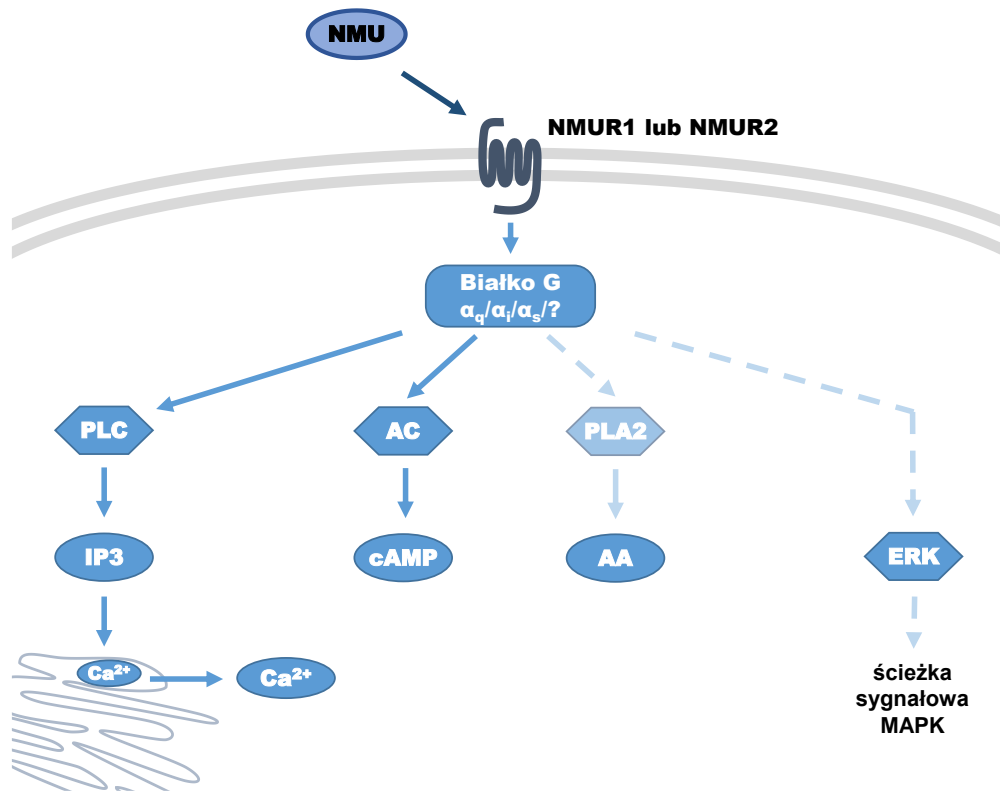
Neuromedyna U jest ligandem dla dwóch receptorów (NMURs, ang. *NMU receptors*) o wysokiej homologii sekwencji aminokwasowej (około 50%): receptora 1 dla NMU (NMUR1, FM-3) oraz receptora 2 dla NMU (NMUR2, FM-4). Białka te kodowane są przez geny położone odpowiednio na 2 (2q37.1) i 5 (5q33.1) chromosomie, a ich ekspresja uznawana była pierwotnie za tkankowo specyficzną, tj. ekspresja *NMUR1* była charakterystyczna dla tkanek całego organizmu (m.in. układu pokarmowego czy odpornościowego) z wyjątkiem centralnego układu nerwowego, gdzie obserwowano ekspresję *NMUR2*. Nowsze badania wykazują jednak, że pewne struktury mózgu, jak mózdzek czy hipokamp, wykazują również ekspresję *NMUR1*, a ekspresja *NMUR2* obserwowana jest w tkankach układu pokarmowego [32, 33, 34, 35, 36, 37]. Dodatkowo, sygnał wzbudzany przez NMU może być przekazywany przez alternatywny receptor stanowiący dimer tworzony przez receptor dla neurotensyny (NTSR1) oraz receptor uwalniający hormon wzrostu (GHSR1b) – receptory o wysokiej homologii sekwencji aminokwasowej względem klasycznych receptorów dla NMU [38]. Aktywność przedstawionego dimeru w kontekście działania NMU pozostaje jednak w dużej mierze niezbadana.

4. Działanie receptorów dla NMU

Wszystkie receptory przekazujące sygnał od NMU należą do receptorów związanych z białkiem G (GPCRs, ang. *G-protein-coupled receptors*) i posiadają klasyczną budowę charakterystyczną dla tej grupy. Zlokalizowane są w błonie komórkowej i składają się z położonego wewnątrzkomórkowo C-końca, 7 domen przezbłonowych i zlokalizowanego zewnątrzkomórkowo N-końca odpowiadającego za wiązanie liganda. Porównując budowę klasycznych receptorów dla NMU, NMUR1 stanowi nieznacznie dłuższe białko (426 aminokwasów) niż NMUR2 (415 aminokwasów) [31].

Szlaki sygnałowe wzbudzone przez NMU odpowiadają klasycznemu przekaznictwu sygnałowemu związanemu z GPCRs. Aktywacja receptora spowodowana związaniem liganda powoduje rozłączenie podjednostek białka G na podjednostki $G\alpha$ (wśród których rozróżnia się podrodzaje: $G\alpha_s$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{12/13}$ i $G\alpha_{i/o}$) i $G\beta\gamma$, które kolejno aktywują właściwe dla siebie białka efektorowe. Szlaki sygnałowe aktywowane przez interakcje GPCRs (w tym należące do nich NMURs) ze specyficznymi dla nich ligandami związane są z działaniem m.in. cykazy adenylanowej, fosfolipazy C oraz licznych kinaz białkowych m.in. biorących udział w szlaku kinaz MAPK [39].

Na podstawie analizy wyników eksperymentów z wykorzystaniem linii komórkowych transfekowanych *NMUR1* lub *NMUR2* oraz inhibitorów selektywnie wpływających na poszczególne podjednostki $G\alpha$, przedstawiono działanie szlaków sygnałowych generowanych przez NMU (Ryc. 2). Oba receptory dla NMU działają w analogiczny sposób, a związanie liganda powoduje aktywację podjednostek $G\alpha_q$ bądź $G\alpha_i$ i $G\alpha_s$. Wzbudzenie NMURs aktywowało w tym przypadku odpowiednie szlaki sygnałowe związane z aktywacją fosfolipazy C i fosfolipazy A2 bądź aktywacją lub zahamowaniem działania cykazy adenylanowej. Wtórne przekaźniki uwalniane w wyniku sygnalizacji związanej z NMU to m.in. 3-fosfatydyloinozytol, kwas arachidonowy, jony wapniowe Ca^{2+} lub cAMP [30, 40, 41]. W wyniku aktywacji receptorów NMURs dochodzi również do wzbudzenia szlaku kinaz MAPK [30, 41].



Ryc. 2. Ścieżki sygnałowe aktywowane przez NMU w ludzkich komórkach. Poszczególnymi skrótami oznaczono: NMU – neuromedyna U, NMUR1/2 – receptor 1/2 dla NMU, PLC – fosfolipaza C, AC – cyklaza adenylnowa, PLA2 – fosfolipaza A2, IP3 – 3-fosfatydyloinozytol, cAMP – cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan, AA – kwas arachidonowy, ERK - kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym. Przerzywaną linią zaznaczono prawdopodobne ścieżki sygnałowe aktywowane przez NMU, których mechanizm aktywacji nie został dotychczas szczegółowo zbadany.

5. Działanie NMU w procesach fizjologicznych i patologicznych

Jedną z lepiej poznanych ról NMU jest kontrola skurczu podłużnych mięśni gładkich wpływająca na ruchy jelit czy pęcherza moczowego. NMU bierze również udział w kontroli przepływu i ciśnienia krwi. Badania przeprowadzone na zwierzętach dowiodły, że podanie NMU wpływa na zwiększenie ciśnienia krwi w tętnicach oraz zwiększenie tętna, zaś to działanie zależnie jest od aktywności współczulnej części układu nerwowego. Działanie NMU obserwowane w centralnym układzie nerwowym przejawia się również w negatywnej regulacji ilości pobieranego pokarmu oraz w regulacji równowagi energetycznej [31].

NMU jest zaangażowana w kontrolę licznych procesów zachodzących w organizmie ludzkim, stąd zaburzenia w jej ekspresji wiążą się z powstaniem stanów patologicznych, jak otyłość, zaburzenia odżywiania czy choroby nowotworowe [30, 42]. Udział tego białka w chorobach nowotworowych został opisany stosunkowo niedawno i wymaga jeszcze wielu badań w celu jego wyjaśnienia. Najwięcej informacji o działaniu NMU w nowotworach

dostarczyły do tej pory badania nad rakiem piersi i endometrium. Przeprowadzone w tym zakresie badania *in vitro* wykazały, że zwiększenie ekspresji *NMU* w komórkach nowotworowych wiąże się ze wzrostem zdolności migracyjnych, inwazyjności czy oporności na niektóre ze stosowanych chemioterapeutyków i w efekcie gorsze rokowania dla osób chorych [30, 43, 44, 45, 46, 47]. Udział *NMU* w przebiegu RJG został zaobserwowany po raz pierwszy kilka lat temu. Wzrost ekspresji *NMU* wykryto w komórkach nowotworowych we wczesnych etapach przejścia epithelialno-mezenchymalnego (EMT, ang. *epithelial–mesenchymal transition*). Co więcej, badania te wskazały na potencjalną zdolność komórek RJG do wydzielania *NMU* do otaczającego je mikrośrodowiska [48]. Późniejsze analizy bioinformatyczne wykorzystujące dane z bazy TCGA (ang. *The Cancer Genome Atlas*) również wykazały nadekspresję *NMU* w RJG [49, 50, 51, 52]. Najnowsze badania dotyczące udziału *NMU* w przebiegu RJG obejmowały zarówno poznanie mechanizmu działania samego białka, jak i jego receptorów. Wykazano, że obserwowana jednocześnie wysoka ekspresja *NMU* i *NMUR2* w tkance nowotworowej wiąże się z niższą ekspresją genu *CDH-1* (kodującego E-kadherine) oraz wyższą ekspresją *MMP-1*. Interakcja *NMU* i *NMUR2* została potwierdzona również w badaniach *in vitro*. Obserwowana w komórkach wywodzących się z RJG aktywacja *NMUR2* przez *NMU* prowadziła do zwiększenia ich zdolności migracyjnych i inwazyjnych, a także do zwiększenia ekspresji podjednostek integrynowych związanych z metastazą [52]. Przedstawione badania dowodzą autokrynnego działania *NMU* na komórki RJG i zaangażowania opisanego białka w procesy promujące rozwój nowotworu.

6. NMU a wzajemne oddziaływania w mikrośrodowisku nowotworu

Mikrośrodowisko rozwijającego się nowotworu jest wysoce plastyczną strukturą zdolną do zmian w zależności od stymulujących je czynników. Przekształcanie mikrośrodowiska w sprzyjające rozwojowi nowotworu jest dość dobrze poznanym zjawiskiem w RJG [53]. Dzięki wydzielaniu cytokin, takich jak: CCL-3 (ang. *C-C Motif Chemokine Ligand 3*), CCL-4 (ang. *C-C Motif Chemokine Ligand 4*) lub IL-8, komórki RJG mogą przyciągać do niszy nowotworowej makrofagi oraz inne komórki układu immunologicznego [53, 54]. Co więcej, ostatnia z wymienionych cytokin (IL-8) działa również stymulująco na zdolności migracyjne komórek nowotworowych, makrofagów oraz komórek śródbłonna mikronaczyń nowotworowych (promując proces angiogenezy) [55]. TAMs obecne w RJG mogą również wpływać na rozwój nowotworu poprzez wydzielanie czynników modelujących macierz

zewnątrzkomórkową, w tym enzymów proteolitycznych (np. MMPs). TAMs aktywują również zdolności migracyjne otaczających je komórek oraz działają proangiogenicznie m.in. poprzez wydzielanie IL-6 oraz IL-8 [14, 17, 56].

Chociaż wiadomo, że NMU jest jednym z czynników, który bierze udział w procesie nowotworzenia, to mechanizm jej oddziaływania na komórki mikrośrodowiska nowotworu nadal pozostaje w dużej mierze niezbadany. Nieliczne doniesienia naukowe opublikowane do tej pory w kontekście możliwego działania NMU na makrofagi oraz komórki śródbłonna mikronaczyniowego nie dotyczyły chorób nowotworowych. Ekspresję *NMU* oraz jednego z jej receptorów – *NMUR1* w makrofagach izolowanych z jamy otrzewnej myszy wykazano podczas badań udziału NMU w szoku septycznym indukowanym podaniem LPS. Co ciekawe, poziom ekspresji obu genów zależny był w tym przypadku od fenotypu makrofagów. W makrofagach aktywowanych w klasyczny sposób (z wykorzystaniem LPS) poziom ekspresji receptora obniżał się, podczas gdy w przypadku NMU obserwowano wzrost ekspresji. W powyższych badaniach zwrócono również uwagę na możliwy udział oddziaływań NMU/NMUR1 w zwiększeniu wydzielania IL-6 przez makrofagi [57]. Obecność NMU oraz NMUR1 została potwierdzona również w komórkach śródbłonna naczyń pochodzących z układu sercowo-naczyniowego. Jednak dokładne działanie NMU w tym układzie nie zostało wyjaśnione [58].

Powyższe prace dostarczyły podstawowych informacji dotyczących możliwości ekspresji jednego z receptorów dla NMU – NMUR1 w komórkach potencjalnie obecnych w mikrośrodowisku nowotworu. Wraz z doniesieniami wskazującymi na potencjalną zdolność wydzielania NMU do otaczającego je środowiska przez komórki RJG, przedstawione informacje mogą wskazywać na znaczenie NMU w niszy RJG. Ze względu na istotne znaczenie mikrośrodowiska w powstawaniu i rozwoju RJG oddziaływanie NMU pochodzenia nowotworowego z NMUR1 obecnym na komórkach mikrośrodowiska wydaje się być interesującym obiektem badań.

Cel pracy

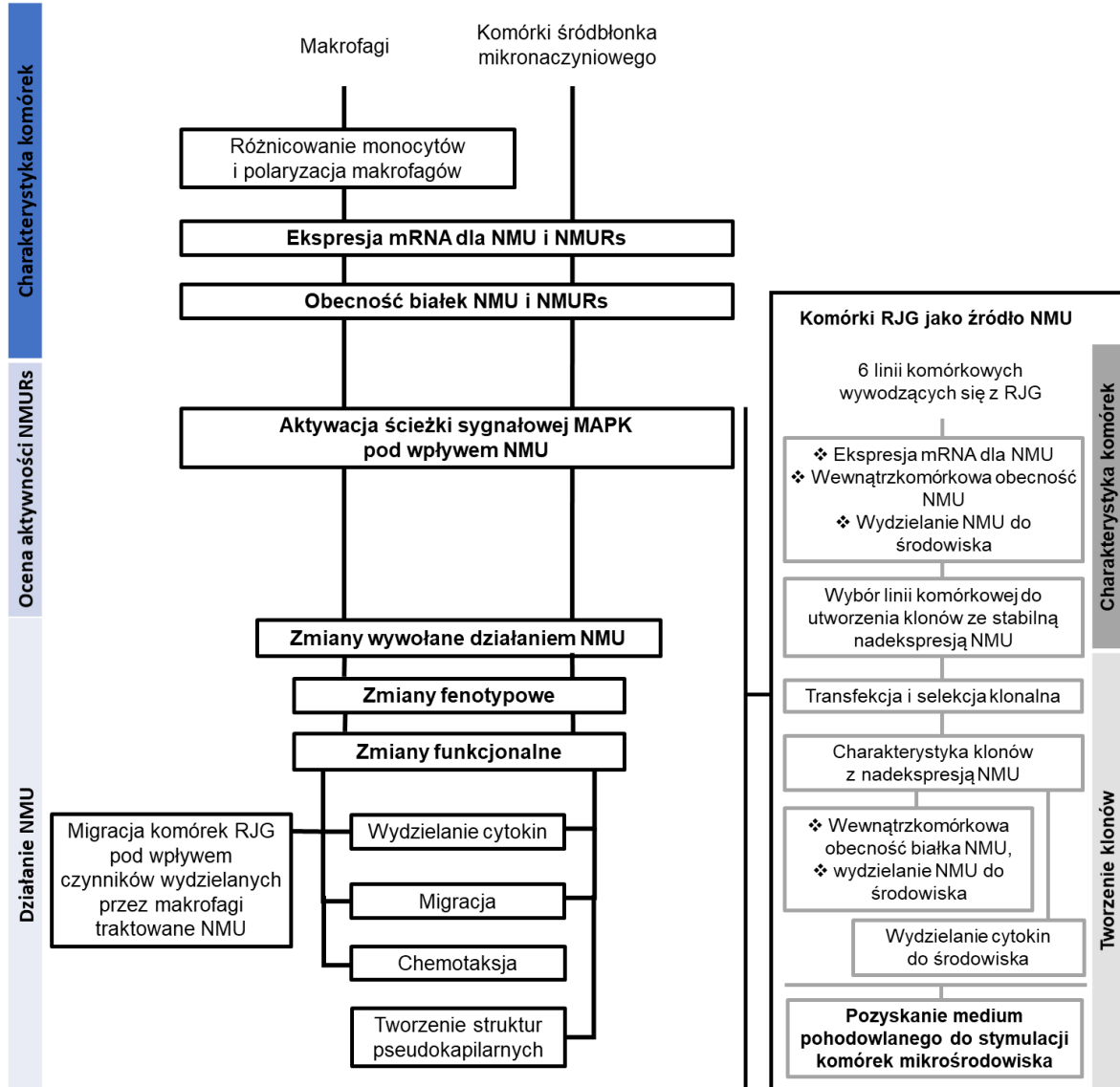
Niniejsza praca podejmuje słabo poznaną do tej pory tematykę udziału neuromedyny U w procesie rozwoju raka jelita grubego. Podstawą do zaplanowania i przeprowadzenia badań było potwierdzenie możliwości wydzielania NMU przez komórki nowotworowe i odbierania sygnału pochodzącego od NMU przez jej receptory obecne na makrofagach oraz komórkach śródbłonna mikronaczyniowego, które potencjalnie są związane z mikrośrodowiskiem RJG.

W związku z powyższym, głównym celem niniejszej pracy była weryfikacja hipotezy, że NMU wydzielona przez komórki nowotworowe reguluje aktywność wybranych komórek niszy w taki sposób, aby sprzyjały rozwojowi RJG.

Powyższą hipotezę zweryfikowano poprzez osiągnięcie kolejnych celów szczegółowych (Ryc. 3), w ramach których:

- na podstawie opracowanej charakterystyki komórek linii wywodzących się z RJG, pod względem ekspresji *NMU* oraz obecności NMU wewnątrz komórki i wydzielonej do środowiska, przygotowano klony ze stabilną nadekspresją NMU i znanym, wysokim poziomem wydzielania badanego białka, które wykorzystano w kolejnych badaniach jako model komórek RJG oddziałujących na komórki mikrośrodowiska,
- opracowano metodę różnicowania monocytów i polaryzacji makrofagów oraz określono poziom markerów powierzchniowych charakterystycznych dla poszczególnych fenotypów,
- opracowano charakterystykę komórek modelowych monocytów, makrofagów oraz komórek śródbłonna mikronaczyniowego pod względem ekspresji genów oraz obecności białek NMU i NMURs,
- oceniono aktywność receptorów dla NMU w komórkach modelowych makrofagów oraz komórek śródbłonna mikronaczyniowego,
- oceniono zmiany fenotypowe oraz funkcjonalne wywołane działaniem NMU na komórki modelowe makrofagów oraz śródbłonna mikronaczyniowego,
- oceniono wpływ czynników wydzielonych przez komórki modelowe makrofagów pod wpływem NMU na migrację komórek wybranej linii wywodzącej się z RJG.

ODDZIAŁYWANIE NMU NA KOMÓRKI MODELOWE MIKROŚRODOWISKA NOWOTWORU



Ryc. 3. Schemat badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej.

Materialy i metody

1. Odczynniki

Peptydy:

- NMU-9 (roztwór 100 μ M; Phoenix Pharmaceuticals, USA), neuromedyna U powstała na drodze chemicznej syntezy zawierająca sekwencję aminokwasową odpowiadającą 9 ostatnim aminokwasom ludzkiej NMU (Gly-Tyr-Phe-Leu-Phe-Arg-Pro-Arg-Asn-NH₂), charakteryzująca się powinowactwem do ludzkich receptorów dla NMU porównywalnym z formą NMU-25 [29].

Ludzkie rekombinowane białka pozyskane z *Escherichia coli* lub linii komórkowej CHO:

- Czynniki stymulacji tworzenia kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF, ang. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*; 0,1 mg/ml; Gibco/Thermo Fisher Scientific, USA)
- Interleukina 4 (IL-4), interleukina 10 (IL-10; roztwory o stężeniu 100 μ g/ml; R&D Systems, USA)
- Interferon gamma (IFN- γ ; 200 μ g/ml; R&D Systems)
- Czynniki wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF; 20 mg/ml; R&D Systems)
- Czynniki wzrostu naskórka (EGF, ang. *epidermal growth factor*; Gibco/Thermo Fisher Scientific)

Inne czynniki biologiczne:

- Lipopolisacharydy *E. coli* (LPS; 1 mg/ml; Sigma-Aldrich, USA)
- Albumina surowicy bydłowej (BSA, ang. *bovine serum albumin*; Sigma-Aldrich)

Odczynniki chemiczne:

- β -merkaptoetanol (Sigma-Aldrich)
- Kwas etylenodiaminotetraoctowy, kwas wersenowy (EDTA, ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*; Sigma-Aldrich)
- Siarczan dodecyłu sodu (SDS; Sigma-Aldrich)
- Mieszanina inhibitorów proteaz, Halt Protease Inhibitor Cocktail (w składzie: chlorowodorek fluorku 4-benzenosulfonylu, aprotynina, bestatyna, E-64, leupeptyna, pepstatyna A; Thermo Fisher Scientific)

- Mieszanina inhibitorów proteaz i fosfataz, Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (w składzie: aprotynina, bestatyna, E-64, leupeptyna, fluorek sodu, ortowanadan sodu, pirofosforan sodu, β -glicerofosforan; Thermo Fisher Scientific)
- Agaroz (Abo Grażyna Boreysza, Polska)
- Bromek etydy (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich)
- 0,4% błękit trypanu (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific)
- 0,5% fiolet krystaliczny (Chempur, Polska)

Stosowane roztwory i bufony:

- Roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanami, pH 7,0 (PBS; ang. *phosphate buffered saline*), bez dodatku jonów wapniowych i magnezowych (Corning, USA)
- PBS z dodatkiem 2 mM EDTA (PBS/EDTA)
- 0,5% roztwór BSA (%w/o) w PBS z dodatkiem 2 mM EDTA (BSA/PBS/EDTA)
- 4% roztwór paraformaldehydu (PFA; Fluka Analytical, Szwajcaria) w PBS (% w/o)
- roztwór soli fizjologicznej buforowany TRIS-em (TBS, ang. *Tris Buffered Saline*), zawierający 50 mM TRIS-HCl (AppliChem, Niemcy) i 150 mM NaCl (AppliChem), pH 7,4
- bufor TBS z dodatkiem 0,1% Tween 20 (% o/o; Sigma-Aldrich; TBS-T)
- bufor octanowy (TRIS-kwas octowy-EDTA; TAE, ang. *TRIS-Acetate-EDTA*) zawierający 40 mM TRIS (AppliChem), 20 mM kwasu octowego oraz 1 mM EDTA, pH 8,0
- 2x stężony bufor lizujący RIPA (ang. *radioimmunoprecipitation assay buffer*) zawierający 100 mM TRIS-HCl (pH 7,5), 300 mM NaCl, 0,2% SDS (% w/o; Sigma-Aldrich), z dodatkiem 1% Igepal CA-630 (% o/o; Sigma-Aldrich) bezpośrednio przed użyciem
- 5x stężony bufor do próbek zawierający 312,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% SDS (% w/o), 50% glicerol (% w/o; Serva, Niemcy), 0,01% błękit bromofenolowy (% w/o; POCH, Polska) oraz dodawany na świeżo 5% β -merkaptoetanol (% o/o) jako czynnik redukujący
- bufor do elektrofrezji białek SDS-PAGE zawierający 192 mM glicyny (AppliChem), 25 mM TRIS (AppliChem), 0,1% SDS (% w/o)

Media do hodowli komórkowych (Thermo Fisher Scientific):

- MEM (ang. *Minimum Essential Medium*)
- RPMI 1640 (ang. *Roswell Park Memorial Institute 1640*; z modyfikacją ATTC)
- McCoy 5A
- MCDB 131

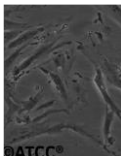
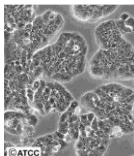
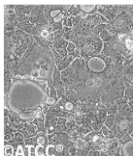
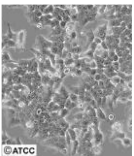
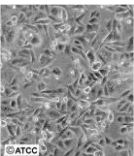

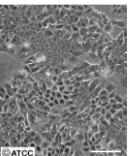
Odczynniki i antybiotyki stosowane do hodowli komórkowych:

- płodowa surowica bydlęca (FBS, ang. *foetal bovine serum*; Sigma-Aldrich) nieinaktywowana termicznie lub inaktywowana termicznie poprzez inkubację w 56°C przez 30 min
- ludzka surowica (grupa krwi AB; Sigma-Aldrich)
- 100x aminokwasy endogenne (NEAA, ang. *non-essential amino acids*; w składzie po 10 mM glicyny, alaniny, asparaginy, kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, proliny, seryny; Thermo Fisher Scientific)
- 100x pirogronian sodu (100 mM; Thermo Fisher Scientific)
- L-Glutamina (200 mM; Sigma-Aldrich)
- hydrokortyzon (2 mg/ml; Sigma-Aldrich)
- 12-mirystynian-13-octan forbolu (PMA, ang. *phorbol 12-myristate 13-acetate*; 1 mg/ml; InvivoGen, USA);
- Histopaque-1077 o gęstości 1,077 g/ml (Sigma-Aldrich)
- Poli-D-Lizyna (1 mg/ml; Merck Millipore, USA)
- Matrigel (12,1 mg/ml; preparat pozyskiwany z mięsaka Engelbreth-Holm-Swarm myszy, zawierający białka macierzy zewnątrzkomórkowej w tym głównie lamininę, kolagen IV, entaktynę i proteoglikan siarczanu heparanu; Corning)
- akutaza (400-600 U/ml w D-PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} ; Sigma-Aldrich)
- trypsyna-EDTA (0,25% w roztworze soli Hanksa; Sigma-Aldrich)
- odczynnik Turka zawierający 3,2% kwasu octowego i 0,0025% fioletu krystalicznego (%w/o) w roztworze wodnym z metanolem (płyn rozcieńczający leukocyty/krwinki białe; Aqua-Med, Polska)
- 500x primocyna (50 mg/ml; InvivoGen)
- 100x mieszanina penicyliny i streptomycyny (pen-strep; penicylina 10000 U/ml i streptomycyna 10000 µg/ml; Thermo Fischer Scientific)
- hygromycyna B (50 mg/ml; Toku-E, Japonia)

2. Linie komórkowe

W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy wykorzystano 6 linii komórkowych pozyskanych z ATCC (ang. *American Type Culture Collection*; USA) wywodzących się z nowotworów jelita grubego: HT29, Caco-2, HCT116, SW480, SW620, HCT15 oraz linię komórek nabłonka CCD 841 CoN, których charakterystykę przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. 1).

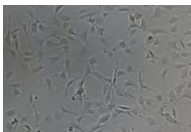
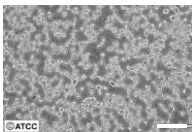
Tab. 1. Charakterystyka wykorzystanych linii komórkowych.

Fenotyp [59]	Linia kontrolna	Fenotyp nabłonkowy	Fenotyp mezenchymalny			Fenotyp silnie mezenchymalny	
	CCD 841 CoN	HT29	Caco-2	HCT116	SW480	SW620	HCT15
Rodzaj tkanki	Nabłonek	Nabłonek	Nabłonek	Nabłonek	Nabłonek	Nabłonek	Nabłonek
Miejsce izolacji	Jelito grube	Jelito grube	Jelito grube	Jelito grube	Jelito grube	Węzły chłonne	Jelito grube
Rodzaj zmiany	Tkanka prawidłowa	Gruczolakorak (<i>adenocarcinoma</i>), guz pierwotny	Gruczolakorak (<i>adenocarcinoma</i>), guz pierwotny	Rak (<i>carcinoma</i>), guz pierwotny	Gruczolakorak (<i>adenocarcinoma</i>), guz pierwotny	Gruczolakorak (<i>adenocarcinoma</i>), guz wtórny	Gruczolakorak (<i>adenocarcinoma</i>), guz pierwotny
Klasyfikacja CMS [60]	-	CMS3	CMS4	CMS4	CMS4	CMS4	CMS1 *
							

* Zdjęcia poglądowe komórek pochodzą ze strony dystrybutora (ATCC; *atcc.org*) z wyjątkiem SW620 (własne zdjęcia wykonane podczas prowadzenia hodowli). Skala na zdjęciach równa 100 µm.

Jako model komórek śródbłonka mikronaczyniowego wykorzystano komórki linii HMEC-1 (ang. *human microvascular endothelial cells*) zakupione w ATCC. Jako model monocytów użyto komórki linii THP-1 zakupionej w ATCC. Charakterystykę wyżej wymienionych komórek przedstawiono w Tab. 2.

Tab. 2. Charakterystyka pozostałych komórek wykorzystywanych w pracy.

	HMEC-1 [61]	THP-1 [62]
Pochodzenie	Śródbłonek mikronaczyń skóry; Tkanka prawidłowa	Krew obwodowa; Ostra białaczka monocytarna (ang. <i>acute monocytic leukemia</i>)
Wprowadzone modyfikacje; Unieśmiertelnienie linii komórkowej	Transfekcja genem dużego antygeny T pochodzącego z wirusa SV40 (ang. <i>Simian Virus 40</i>)	x
		

* Zdjęcie poglądowe komórek linii THP-1 pochodzi ze strony dystrybutora (ATCC; *atcc.org*), zdjęcia komórek linii HMEC-1 wykonano podczas prowadzenia hodowli. Skala na zdjęciach równa 100 µm.

3. Hodowla linii komórkowych

Hodowle komórkowe prowadzono w zależności od zapotrzebowania na butelkach hodowlanych o powierzchni wzrostu 25 lub 75 cm² (Nunc/Thermo Fisher Scientific) w inkubatorze CO₂, w temp. 37°C, przy zachowanej wilgotności 90-95% i zawartości CO₂ na poziomie 5%. Wszystkie media hodowlane uzupełniono nieinaktywowaną lub inaktywowaną termicznie surowicą oraz niezbędnymi suplementami według poniższych tabel (Tab. 3 i 4). Podczas prowadzenia hodowli, do medium dodawano antybiotyki: primocynę w stężeniu końcowym 100 µg/ml oraz mieszaninę penicyliny i streptomycyny (penicylina 100 U/ml i streptomycyna 100 µg/ml).

Tab. 3. Skład mediów wykorzystanych do hodowli komórek RJG.

Linia komórkowa	Rodzaj medium	FBS	Suplementy
CCD 841 CoN	MEM	10%, nieinaktywowana	0,1 mM NEAA, 1,0 mM pirogronian sodu
HT29	McCoy 5A, RPMI 1640	10 %, nieinaktywowana	x
Caco-2	MEM	20 %, nieinaktywowana	0,1 mM NEAA, 1,0 mM pirogronian sodu
HCT116	McCoy 5A	10 %, inaktywowana	x
SW480, SW620	RPMI 1640	10 %, nieinaktywowana	x
HCT15	RPMI 1640	10 %, inaktywowana	x

Tab. 4. Skład mediów wykorzystanych do hodowli pozostałych komórek.

Linia komórkowa	Rodzaj medium	FBS	Suplementy
HMEC-1	MCDB 131	10 %, nieinaktywowana	5,0 mM L-Glutamina, 1,0 µg/ml hydrokortyzon, 10,0 ng/ml EGF
THP-1	RPMI 1640	10 %, nieinaktywowana	0,05 mM β-merkaptioetanol

W celu pasażu komórek monowarstwę płukano jednokrotnie PBS, a następnie odklejano 0,25% roztworem trypsyny-EDTA. Komórki zawieszono we właściwym dla nich medium hodowlanym w celu inaktywacji trypsyny. W razie potrzeby komórki wirowano 160 x g przez 7 min w temp. pokojowej.

Liczbę komórek w zawieszynie oraz ich żywotność oceniono poprzez barwienie 0,4% roztworem błękitu trypanu z wykorzystaniem urządzenia Countess Automated Cell Counter (Invitrogen/Thermo Fischer Scientific). Komórki wykorzystywane do doświadczeń charakteryzowały się żywotnością przekraczającą 90%.

Hodowle komórek testowano okresowo na obecność bakterii z rodzaju *Mycoplasma* z wykorzystaniem zestawu Plasmotest - Mycoplasma Detection Kit (InvivoGen) zgodnie z instrukcją producenta. Komórki wysiane na płytkę 6-dołkową hodowano przez 48 godz. w medium bez dodatku antybiotyków. Medium wraz z komórkami zebrano, inkubowano w 98°C przez 15 min, a następnie przez 24 godz. z komórkami HEK-Blue-2. Wynik testu oceniono poprzez porównanie zabarwienia badanego medium nad komórkami HEK-Blue-2 do barwy próby negatywnej oraz pozytywnej dostarczonych przez producenta w zestawie.

Po przeprowadzeniu badań ponownie potwierdzono autentyczność wykorzystanych linii komórkowych poprzez analizę profilu STR (ang. *short tandem repeats*) komórek.

4. Transfekcja i selekcja klonalna

4.1. Przygotowanie wektora ekspresyjnego

Sekwencję kodującą NMU pozyskano na drodze reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, ang. *polymerase chain reaction*) z odwrotną transkrypcją (RT, ang. *reverse transcription*). 0,8 µg całkowitego RNA izolowanego z komórek linii SW480 (wg. metody „9. Izolacja RNA”) zostało poddane reakcji odwrotnej transkrypcji i amplifikacji z wykorzystaniem zestawu SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z zaleceniami producenta (Tab. 5).

Tab. 5. Skład mieszaniny reakcyjnej.

Składnik	Ilość
2x Reaction Mix (mieszanina zawierająca 0,4 mM dNTP i 2,4 mM MgSO ₄)	25,0 µl
Starter forward (10 µM)	1,0 µl
Starter reverse (10 µM)	1,0 µl
RT/Platinum™ Taq Mix	2,0 µl
Woda destylowana pozbawiona nukleaz	20,0 µl
RNA (0,8 µg)	1,0 µl
Całkowita objętość reakcji	50,0 µl

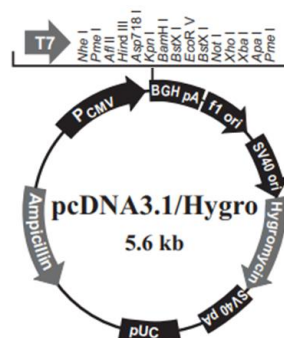
Do wygenerowania sekwencji kodującej ludzką prekursorową formę NMU (numer referencyjny sekwencji w bazie NCBI: NM_006681.4; długość amplifikowanej sekwencji równa 556 pz) wykorzystano startery: F: 5' AGCTAAGCTTGCCGAGATGCTGCGAACA GAGAG 3' i R: 5' GGTCAGCAGGGTTCATTTAACGCGGATCCAATAGC 3' wprowadzające na końcach amplikonu sekwencje nukleotydowe rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne HindIII i BamHI. Reakcję PCR przeprowadzano w termocyklerze T3 Termocykler (Biometra) w warunkach przedstawionych w poniższej tabeli (Tab. 6).

Tab. 6. Warunki reakcji PCR z odwrotną transkrypcją.

Etap reakcji		Temperatura	Długość trwania
Synteza cDNA		50°C	30 min
Denaturacja matrycy Aktywacja polimerazy DNA Taq		94°C	2 min
Amplifikacja w 35 cyklach	Denaturacja	94°C	15 s
	Przyłączenie starterów	58°C	30 s
	Wydłużanie łańcucha	68°C	45 s
Ostateczne wydłużanie łańcucha		72°C	10 min

Otrzymane produkty reakcji rozdzielono w 1% żelu agarozowym i zwizualizowano z wykorzystaniem bromku etydyny (o końcowym stężeniu w żelu 12,5 ng/ml). Wycięto fragment żelu zawierający prążek o długości 556 pz. Izolację produktu PCR wykonano za pomocą zestawu GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) według zaleceń producenta. Fragment żelu rozpuszczono w buforze zawartym w zestawie (z zachowaniem proporcji 100 µl buforu na każde 100 mg żelu agarozowego) poprzez ogrzewanie w temp. 55°C przez 10 min, przeniesiono na kolumnę ze złożem krzemionkowym wiążącym kwasy nukleinowe i wirowano 14000 x g przez 1 min w temp. pokojowej. Kolumnę płukano buforem płuczającym zawartym w zestawie i wirowano j.w. W celu usunięcia resztek buforów po płukaniu, kolumnę wirowano przez 1 min bez dodatku płynów. DNA wypłukano ze złoża 25 µl wody wolnej od nukleaz (BioShop, Kanada). Stężenie DNA oznaczono przy długości fal 260 nm, a jego jakość oznaczono poprzez wyznaczenie i oszacowanie współczynników 260/230 nm i 260/280 nm z wykorzystaniem urządzenia NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

Otrzymany produkt wklonowano do wektora pJET1.2/blunt z użyciem zestawu CloneJET PCR Cloning Kit zawierającego ligazę T4 (Invitrogen) zgodnie z zaleceniami producenta. Wektor wprowadzono za pomocą transformacji do komórek *Escherichia coli* TOP10. Komórki wysiano na szalki w celu otrzymania pojedynczych kolonii. Po 24 godz. inkubacji kolonie przeniesiono do 3-ml hodowli, z których wyizolowano i oczyszczono wektor korzystając z zestawu GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) według zaleceń producenta. Plazmidowe DNA wypłukano z kolumny z użyciem wody wolnej od nukleaz, oznaczono ilość oraz jakość DNA, jak powyżej. Wyizolowane plazmidy trawiono z użyciem enzymów restrykcyjnych HindIII i BamHI. Produkty trawienia rozdzielono w 1% żelu agarozowym. Prążek odpowiadający sekwencji NMU wycięto, wyizolowano z żelu i wklonowano do wektora pcDNA 3.1 (+) z genem odporności na hygromycynę B (Invitrogen; Ryc. 4) z użyciem metod, zestawów i komórek opisanych powyżej. Wektor zawierający sekwencję kodującą NMU wyizolowany i oczyszczony za pomocą zestawu GeneJET Endo-Free Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Fisher Scientific) poddano sekwencjonowaniu w celu sprawdzenia zgodności sekwencji.



Ryc. 4. Schemat wektora pcDNA 3.1 (+) z genem odporności na hygromycynę B.

4.2. Transfekcja komórek HT29 i selekcja klonalna

W celu ustalenia stężenia antybiotyku odpowiedniego do przeprowadzenia selekcji klonalnej, komórki HT29 wysiano na płytkę 24-dołkową w pełnym medium McCoy 5A z dodatkiem hygromycyny B w szeregu stężeń od 0 do 500 $\mu\text{g/ml}$, co 25 $\mu\text{g/ml}$. Komórki hodowano przez 3 tygodnie ze zmianą medium co 48 godz. oraz dodatkiem świeżej porcji antybiotyku selekcyjnego. Do selekcji klonów wybrano najniższe stężenie hygromycyny B, które wywołało śmierć wszystkich komórek w hodowli.

Wektor ekspresyjny pcNMU lub wektor kontrolny pcDNA (3 μg) wprowadzono do komórek linii HT29 na drodze nukleofekcji z zastosowaniem komercyjnie dostępnych odczynników firmy Lonza SF Cell Line Solution Box oraz zestawu Amaxa Cell Line

Nucleofector KitTM R i urządzenia Amaxa 4D nucleofector X Unit (Lonza, Szwajcaria) zgodnie z zaleceniami producenta. Komórki po transfekcji rozdzielono na dwie części i wysiano w pełnym medium McCoy 5A na płytkę 24-dołkową z przeznaczeniem do weryfikacji wydajności transfekcji oraz wyselekcjonowania stabilnych klonów.

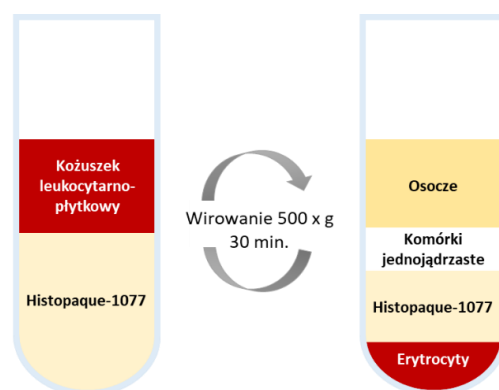
24 godz. po nukleofekcji komórki przeniesiono na szalki o średnicy 10 cm w pełnym medium z hygromycyną B i hodowano przez 4 tygodnie ze zmianą medium i dodatkiem antybiotyku selekcyjnego co 48 godz. Powstałe po około 4 tygodniach wyraźnie odseparowane pojedyncze kolonie zebrano i przeniesiono do osobnych dołków na płytce 24-dołkowej. Klony komórek linii HT29 ze stabilną nadekspresją NMU (HT29 pcNMU) i klony kontrolne (HT29 pcDNA) hodowano w medium RPMI 1460 uzupełnionym o 10% FBS z dodatkiem antybiotyków: primocyny (w stężeniu końcowym 100 µg/ml), mieszaniny pen-strep (penicylina 100 U/ml i streptomycyna 100 µg/ml) oraz hygromycyny B (we wcześniej wyznaczonym stężeniu).

Skuteczność przeprowadzenia transfekcji i utrzymania stabilnej nadekspresji NMU zweryfikowano poprzez analizę Western Immunoblotting (opisaną poniżej: „14. Analiza Western Immunoblotting (WB)”). Jakościową ocenę wydzielania NMU przez komórki wybranych klonów, z potwierdzoną nadekspresją NMU, wykonano z wykorzystaniem metod immunoprecypitacji NMU z medium pohodowlanego (opisaną poniżej: „15. Immunoprecypitacja NMU z medium pohodowlanego”), a następnie Western Immunoblotting.

5. Izolacja monocytów z kożuszka leukocyтарno-płytkowego

Materiał wykorzystany do niniejszych badań pochodził z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK) w Łodzi. Zdrowi dawcy, od których pobrano krew obwodową, zostali poinformowani przez Pracowników RCKiK i wyrazili pisemną zgodę na wykorzystanie pobranej krwi do celów badawczych. Otrzymane próbki zostały zanonimizowane przed wydaniem z RCKiK.

Kożuszki leukocyтарno-płytkowe rozcieńczono 4-krotnie PBS z dodatkiem EDTA w stężeniu końcowym 2 mM (PBS/EDTA) i nawarstwiono na Histopaque-1077. Materiał rozdzielono na frakcje (Ryc. 5) przez wirowanie w gradiencie gęstości 500 x g przez 30 min (wszystkie wirowania w niniejszej metodzie prowadzono w temp. pokojowej).



Ryc. 5. Uproszczony schemat rozdzielania komórek leukocytno-płytkowych w gradientie gęstości Histopaque-1077.

Powstały po wirowaniu biały pierścień komórek jednojądrzastych przeniesiono do nowych probówek i płukano 2-krotnie buforem PBS/EDTA z wirowaniem 350 x g przez 15 min. Osad zawieszono w 10 ml buforu PBS/EDTA, komórki jednojądrzaste barwiono odczynnikiem Turka (w stosunku ilościowym 190 μ l barwnika na 10 μ l zawiesiny komórkowej) i naniesiono na komorę Burkera. Liczba komórek na określonej powierzchni siatki zliczeniowej została określona przez dwie niezależne osoby.

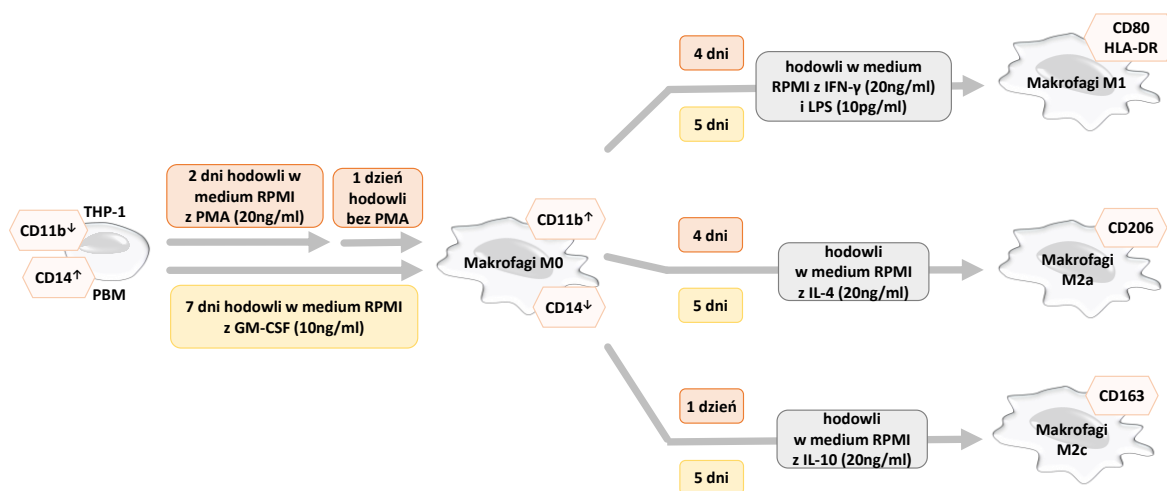
Monocyty zawarte w mieszaninie komórek jednojądrzastych izolowano następnie z wykorzystaniem kulek magnetycznych opłaszczonych mysimi przeciwciałami skierowanymi przeciwko ludzkiemu białku CD14 (CD14 MicroBeads; Miltenyi Biotec, Niemcy) oraz zestawu do magnetycznej separacji z kolumnami MS Column (Miltenyi Biotec). Odpowiednią liczbę komórek wirowano 300 x g przez 10 min, zawieszono w zimnym roztworze 0,5% BSA w PBS z 2 mM EDTA (BSA/PBS/EDTA) w ilości 80 μ l na każde 1×10^7 komórek, dodano zawiesinę kulek magnetycznych w ilości 20 μ l na każde 1×10^7 komórek i całość inkubowano na lodzie przez 15 min. Niezwiązane kulki magnetyczne odpłukano poprzez dodanie 10 ml zimnego buforu BSA/PBS/EDTA i wirowanie 300 x g przez 10 min. Osad po wirowaniu zawieszono w buforze BSA/PBS/EDTA w ilości 100 μ l na każde 1×10^7 komórek i naniesiono na kolumnę ze złożem ferromagnetycznym umieszczoną w magnesie i aktywowaną wcześniej zimnym buforem BSA/PBS/EDTA (3 ml). Komórki posiadające antygen CD14 wraz z kulkami magnetycznymi zostały związane przez złożę kolumny, pozostałe komórki usunięto z kolumny przez jej 3-krotne płukanie zimnym buforem BSA/PBS/EDTA (3 x 3 ml). Po zdjęciu kolumny z magnesu, monocyty wypłukano ze złoża 5 ml zimnego buforu BSA/PBS/EDTA. Otrzymaną zawiesinę wirowano 300 x g przez 10 min. Po zawieszeniu osadu w 5 ml buforu BSA/PBS/EDTA monocyty barwiono 0,4% roztworem błękitu trypanu i liczono z wykorzystaniem urządzenia Countess Automated Cell Counter.

Monocyty izolowane z krwi obwodowej zdrowych dawców (PBM, ang. *peripheral blood monocytes*) hodowano w medium RPMI 1640 z dodatkiem 10% ludzkiej surowicy i mieszaniny pen-strep (penicylina 100 U/ml i streptomycyna 100 µg/ml).

6. Różnicowanie monocytów i polaryzacja makrofagów

W przeprowadzonych eksperymentach wykorzystano dwa modele badawcze: makrofagi różnicowane z komórek linii THP-1 (TDM, ang. *THP-1 derived macrophages*) oraz makrofagi różnicowane z monocytów izolowanych z krwi obwodowej zdrowych dawców (MDM, ang. *monocyte derived macrophages*). Komórki THP-1 i PBM oraz TDM i MDM w kolejnych częściach pracy wspólnie nazywane będą odpowiednio „monocytami” oraz „makrofagami”.

Monocyty różnicowano w pełnym medium na płytkach 6-dołkowych w ilości $1,5 \times 10^6$ lub 2×10^6 na dołek w zależności od zapotrzebowania. Komórki linii THP-1 różnicowano na drodze 48-godz. stymulacji PMA w stężeniu 20 ng/ml z dodatkową 24-godz. inkubacją w pełnym medium bez dodatku czynnika różnicującego. PBM różnicowano poprzez 7-dniową stymulację GM-CSF w stężeniu 10 ng/ml. Po otrzymaniu makrofagów M0 polaryzowano je do określonego fenotypu. Makrofagi M1 otrzymano poprzez 24-godz. stymulację (TDM M0) lub 5-dniową stymulację (MDM M0) IFN-γ w stężeniu 20 ng/ml oraz LPS w stężeniu 10 pg/ml. W celu uzyskania makrofagów M2 TDM M0 stymulowano przez 4 dni, a MDM M0 przez 5 dni roztworami interleukin w stężeniu 20 ng/ml: IL-4 dla fenotypu M2a oraz IL-10 dla fenotypu M2c (Ryc. 6).



Ryc. 6. Schemat różnicowania monocytów i polaryzacji makrofagów do fenotypów M1 i M2 (a i c) z zaznaczeniem makreryów charakterystycznych dla każdego z otrzymanych fenotypów.

Opisane powyżej optymalne metody różnicowania i polaryzacji opracowane zostały w ramach i na potrzeby niniejszej pracy doktorskiej poprzez zastosowanie zróżnicowanych czasów stymulacji czynnikami różnicującymi oraz polaryzującymi, jak również różnych stężeń przedstawionych czynników.

7. Wyciszenie ekspresji *NMUR1*

Ekspresję *NMUR1* w komórkach THP-1 wyciszono stosując komercyjnie dostępny zestaw Human *NMUR1* ON-TARGETplus siRNA SMARTpool (Dharmacon, USA). siRNA (ang. *small interfering RNA*) specyficzne względem *NMUR1* oraz kontrolne NT siRNA (ang. *non-targeting siRNA*) wprowadzono do komórek THP-1 na drodze nukleofekcji z zastosowaniem komercyjnie dostępnych odczynników firmy Lonza SF Cell Line Solution Box oraz zestawu Amaxa Cell Line Nucleofector KitTM R i urządzenia Amaxa 4D nucleofector X Unit (Lonza) zgodnie z zaleceniami producenta. 4×10^6 komórek po transfekcji zawieszono w medium hodowlanym bez mieszaniny pen-strep i wysiano na płytkę 12-dołkową w ilości 1×10^6 komórek na dołek. Po upływie 4 godz. od nukleofekcji do komórek dodano PMA (w końcowym stężeniu 20 ng/ml) i różnicowano je do TDM M0 przez 48 godz. ze zmianą medium i dodatkiem PMA po 24 godz. Następnie komórki inkubowano przez 48 godz. bez dodatku PMA i przygotowano lizaty komórkowe.

Skuteczność wyciszenia ekspresji *NMUR1* analizowano poprzez ocenę poziomu *NMUR1* w lizatach komórkowych metodą Western Immunoblotting. Następnie komórki wykorzystano do oceny intensywności fosforylacji kinaz ERK 1/2.

8. Przygotowanie medium pohodowlanego (CM, ang. *conditioned medium*)

8.1. Komórki RJG

Klony komórek HT29 pcDNA i pcNMU hodowano w pełnym medium RPMI 1640 w butelce hodowlanej o powierzchni wzrostu 25 cm² do osiągnięcia około 80% konfluencji. Następnie komórki płukano jednokrotnie PBS i zmieniono medium na 3 ml RPMI 1640 bez dodatku FBS. Po 48 godz. medium zebrano, wirowano 1000 x g przez 20 min w temp. 4°C w przypadku analiz profilu wydzielanych cytokin lub w temp. pokojowej w przypadku użycia medium do badań wpływu NMU na komórki modelowe makrofagów i śródbłonna mikronaczyniowego.

8.2. Makrofagi i komórki śródbłonka mikronaczyniowego

PBM różnicowano w ilości 2×10^6 komórek na dołek na płytce 6-dołkowej według standardowej procedury (opisanej powyżej „6. Różnicowanie monocytów i polaryzacja makrofagów”). MDM M0 inkubowano przez 24 godz. w pełnym medium bez dodatku GM-CSF, płukano PBS i zmieniono medium na 1,3 ml pełnego medium RPMI 1640 z dodatkiem NMU-9 w końcowym stężeniu 500 nM. Komórki linii HMEC-1 hodowano na płytkach 6-dołkowych do osiągnięcia około 80% konfluencji i po zmianie medium inkubowano przez 24 godz. bez dodatku EGF oraz hydrokortyzonu. Monowarstwę komórek płukano następnie buforem PBS i zmieniono medium na 1,3 ml MCDB 131 z dodatkiem L-glutaminy, mieszaniny pen-strep oraz 2,5% FBS i NMU-9 w końcowym stężeniu 500 nM. W obu przypadkach kontrolę stanowiły komórki hodowane we właściwym dla nich medium bez dodatku NMU-9. Po 48 godz. inkubacji medium pohodowlane zebrano i wirowano 1000 x g przez 20 min w 4°C.

9. Izolacja RNA

RNA izolowano z komórek hodowanych na płytkach 6-dołkowych lub w przypadku monocytów z $1,5 \times 10^6$ komórek w osadzie powstałym po wirowaniu zawiesiny (160 x g, 7 min, temp. pokojowa) z wykorzystaniem komercyjnego zestawu ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega, USA). Komórki lizowano przez 5 min w 250 µl buforu lizującego zawartego w zestawie z dodatkiem 2% 1-tioglicerolu, a następnie dodano 85 µl izopropanolu w celu wytrącenia RNA z fazy wodnej i wortexowano. Materiał przeniesiono na kolumny ze złożem krzemionkowym i wirowano 14000 x g przez 45 s (wszystkie wirowania prowadzono w temp. pokojowej). Złoże płukano buforem zawartym w zestawie i wirowano j.w. przez 30 s. Następnie naniesiono 30 µl roztworu DNAzy I i inkubowano przez 15 min w temp. pokojowej. Kolumnę płukano kolejno buforami zawartymi w zestawie z wirowaniem j.w. odpowiednio przez 15, 30 i 45 s. Pozostałości buforów usunięto przez 2-min wirowanie 14000 x g. RNA wypłukano ze złoża 30 µl wody destylowanej pozbawionej nukleaz przez wirowanie kolumny 14000 x g przez 1 min. Oznaczono stężenie otrzymanego RNA oraz oceniono jego jakość poprzez pomiar absorbancji przy długościach fal 260/230 nm i 260/280 nm (NanoDrop 1000 Spectrophotometer) oraz wyznaczenie współczynnika integralności RNA (RIN, ang. *RNA integrity number*) na drodze zautomatyzowanej elektroforezy kapilarnej z wykorzystaniem zestawu RNA 6000 Nano LabChip oraz urządzenia Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA).

10. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Reakcje odwrotnej transkrypcji przeprowadzono z użyciem 0,5 – 1 µg całkowitego RNA oraz zestawu High Capacity cDNA Reverse transcription kit (Applied Biosystems, USA) według zaleceń producenta. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w poniższej tabeli (Tab. 7).

Tab. 7. Skład mieszaniny reakcyjnej.

Składnik:	Objętość
10x RT Buffer	2,0 µl
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10x RT Random Primers	2,0 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µL)	1,0 µl
Woda destylowana pozbawiona nukleaz	4,2 µl
RNA (1 lub 0,5 µg)	10,0 µl
Całkowita objętość reakcji	20,0 µl

Reakcje przeprowadzono w termocyklerze T3 Termocykler (Biometra) w warunkach opisanych w tabeli poniżej (Tab. 8).

Tab. 8. Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji.

	Temperatura	Długość trwania
Przyłączenie starterów	25°C	10 min
Synteza cDNA	37°C	120 min
Dezaktywacja odwrotnej transkryptazy	85°C	5 min

11. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Reakcje PCR w czasie rzeczywistym dla genu *NMU* oraz kontroli endogennej (β -aktyny) w komórkach linii RJG wykonano z wykorzystaniem zestawu odczynników FastStart Essential DNA Probes Master, sond TaqMan (odpowiednio Hs00183624_m1 oraz Hs_01060665_g1; Thermo Fischer Scientific) oraz urządzenia Roche LightCycler 96 (Roche, Szwajcaria). Składniki i warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym przedstawiono w tabelach poniżej (Tab. 9 i 10).

Tab. 9. Skład mieszaniny reakcyjnej.

Składnik:	Objętość
2x FastStart Essential DNA Probes Master: FastStart Taq Polimeraza DNA Bufor reakcyjny dNTP Mix (z dUTP), MgCl ₂	10,0 µl
20x Sondy TaqMan	1,0 µl
cDNA	do 2,0 µl
Woda destylowana pozbawiona nukleaz	do 20,0 µl objętości mieszaniny reakcyjnej

Tab. 10. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem sond TaqMan.

	Temperatura	Czas trwania
Inkubacja wstępna	95°C	10 min
Amplifikacja w 45 cyklach	95°C 60°C	10 s 20 s

Ekspresję pozostałych badanych genów oceniono z wykorzystaniem FastStart Essential DNA Green Master. Pary starterów wykorzystane do oceny ekspresji genów *NMU*, *NMUR1*, *NTSRI* i *GHSR1b* w komórkach modelowych monocytów, makrofagów i śródbłonka mikronaczyniowego przygotowano w oparciu o dostępne publikacje. Parę starterów specyficzną dla genu *NMUR2* oraz genów stanowiących kontrolę endogenną kodujących: dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (*GAPDH*, ang. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) lub β -aktynę zaprojektowano na podstawie ich sekwencji (numer referencyjny sekwencji w bazie NCBI odpowiednio: NM_020167.5, NM_002046.7, NM_001101.5). Sekwencje poszczególnych par starterów zebrano w tabeli poniżej (Tab. 11).

Tab. 11. Pary starterów wykorzystane do oceny ekspresji badanych genów.

Gen	Starter	Sekwencja	Referencje
<i>NMU</i>	Forward	5' GGATTACAGCCTGAACAACAGC 3'	[63]
	Reverse	5' GGCTTTGGTAGCATTCCCATA 3'	
<i>NMUR1</i>	Forward	5' GCCGGAGACAAGTGACCAAGA 3'	[64]
	Reverse	5' TGACACGACGCTCCACATG 3'	
<i>NMUR2</i>	Forward	5' TCAACCTCGTCCATGTGGTG 3'	x
	Reverse	5' AGCGGCGAGACAGTAGGTT 3'	
<i>NTSR1</i>	Forward	5' CCGTCAAGGTCGTCATACAG 3'	[38]
	Reverse	5' GATGGTGGAGCTGACGTAGAA 3'	
<i>GHSR1b</i>	Forward	5' CTTGGGACACCAACGAGTG3'	[38]
	Reverse	5' AGGACCCGCGAGAGAAAGC 3'	
<i>GAPDH</i>	Forward	5' TTGCCCTCAACGACCACTTT 3'	x
	Reverse	5' TCCTCTTGCTCTTGCTGG 3'	
<i>β-aktyna</i>	Forward	5' CTGGAACGGTGAAGGTGACA 3'	x
	Reverse	5' AAGGACTTCCTGTAACAATGCA 3'	

Ilość produktu wykorzystanego do reakcji PCR, wybór genu referencyjnego oraz warunki reakcji amplifikacji (przedstawione w Tab. 12 i 13) wyznaczono na drodze analiz krzywych wydajności dla poszczególnych par starterów.

Tab. 12. Skład mieszaniny reakcyjnej.

Składnik:	Objętość
2x FastStart Essential DNA Green Master:	10 µl
FastStart Taq Polimeraza DNA	
Bufor reakcyjny	
Mieszanina dNTP Mix (z dUTP),	
SYBR Green I	
MgCl ₂	
Startery forward (5 µM)	2 µl / 1,2 µl *
Startery reverse (5 µM)	2 µl / 1,2 µl *
cDNA	do 2 µl
Woda destylowana pozbawiona nukleaz	do 20 µl objętości mieszaniny reakcyjnej

Tab. 13. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem SYBR Green I.

Etap reakcji		Temperatura	Czas trwania
Inkubacja wstępna		95°C	10 min
Amplifikacja w 45 cyklach	Denaturacja	95°C	20 s
	Przyłączenie starterów	60°C	20 s
	Wydłużanie łańcucha	72°C	20 s / 28 s*
Krzywa topnienia		95°C	10 s
		65°C	60 s
		97°C	1 s

* Dla par starterów dla *NTSRI* i *GHSRIb*

Otrzymane wyniki analizowano z wykorzystaniem oprogramowania LightCycler 96 v 1.1. (Roche) oraz DataAssist v 3.01 (Applied Biosystems). Relatywną ekspresję mRNA dla poszczególnych genów opracowano poprzez porównanie względem ekspresji genu referencyjnego ($2^{-\Delta C_t}$).

12. Przygotowanie lizatów komórkowych

Komórki hodowane na płytkach 6- lub 12-dołkowej w postaci monowarstwy płukano zimnym buforem PBS, monocyty hodowane w zawiesinie wirowano 160 x g przez 7 min w temp. pokojowej. Komórki lizowano przez 30 min na lodzie buforem RIPA z dodatkiem inhibitorów proteaz (Halt Protease Inhibitor Cocktail) lub mieszaniny inhibitorów proteaz i fosfataz (Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail) dla oznaczenia poziomu białek fosforylowanych. Przygotowany lizat wirowano 18000 x g przez 20 min w temp. 4°C.

13. Oznaczenie ilości białka całkowitego metodą BCA

Całkowite stężenie białka w otrzymanych lizatach komórkowych oceniono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) na płytce 96-dołkowej, z wykorzystaniem krzywej kalibracyjnej (standard BSA 2 mg/ml, współczynnik rozcieńczenia 2). Do 10 μ l próby badanej i prób o znanym stężeniu dodano 200 μ l mieszaniny Reagentu A zawierającego kwas bicinechinowy i Reagentu B zawierającego jony miedzi Cu^{2+} (w stosunku 50:1). Po 30-min inkubacji (w temp. 37°C w ciemności) mierzono absorbancję przy długości fal 562 nm (z wykorzystaniem urządzenia SPARK; TK Biotech, Szwajcaria).

Stężenie białka całkowitego w lizatach komórkowych wyznaczono na podstawie krzywej kalibracyjnej. Każdy pomiar prób badanych oraz prób o znanym stężeniu został wykonany w trzech powtórzeniach technicznych.

14. Analiza Western Immunoblotting (WB)

Próbki do rozdzielania elektroforetycznego SDS-PAGE, o określonej zawartości białka całkowitego (10 µg do oceny fosforylacji kinaz ERK 1/2 lub 30 µg do oceny obecności białek NMU i NMUR1 oraz markerów śródbłonka mikronaczyń nowotworowych: IGFBP-7 i wimentyny), przygotowano w 5-krotnie stężonym buforze do próbek z dodatkiem β-merkaptoetanolu (jako czynnika redukującego) przez 5-min inkubację w temp. 95°C w celu zdenaturowania białek. Rozdział elektroforetyczny białek wykonano z użyciem gotowych, 10%, 12% lub gradientowych 4-15% żeli poliakrylamidowych (odpowiednio do oceny fosforylacji kinaz ERK, markerów śródbłonka nowotworowego lub obecności białek NMU i NMUR1) o grubości 1,5 mm (Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Gels; BioRad, USA), w warunkach stałego napięcia 100 V, w buforze do elektroforezy.

Białka przeniesiono z żelu poliakrylamidowego na membranę nitrocelulozową metodą półsuchego transferu białek z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych zestawów z membranami i urządzeniami Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad). Wolne miejsca wiązania białek na membranie blokowano przez godzinę w temp. pokojowej roztworem 5% BSA w buforze TBS lub 5% odtłuszczonym mlekiem w TBS-T w zależności od stosowanych kolejno przeciwciał (Tab. 14). Membrany inkubowano z przeciwciałami I-rzędowymi przez noc w temp. 4°C na kołyszce laboratoryjnej. Rodzaj przeciwciał i zastosowane rozcieńczenia przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. 14). Po 3-krotnym 15-min płukaniu buforem TBS-T membrany inkubowano (1 godz. w temp. pokojowej) z przeciwciałami drugorzędowymi z przyłączoną peroksydazą chrzanową (HRP, ang. *Horseradish peroxidase*; Tab. 15) i ponownie płukano buforem TBS-T j.w. Sygnał pochodzący od związanych przeciwciał zwizualizowano za pomocą zestawu do chemiluminescencji (Thermo Fisher Scientific) na kliszy rentgenowskiej Kodak BioMax Light Film (Eastman Kodak, USA). Wykonano analizę densytometryczną otrzymanego obrazu w programie ImageJ [65]. Wartości intensywności sygnału pochodzącego od badanego białka odniesiono do intensywności sygnału kontroli nałożenia (GAPDH lub β-aktyny dla NMU, NMUR1 i wimentyny oraz α-tubuliny dla ERK, pERK i IGFBP-7).

Otrzymane wyniki odpowiadały relatywnej zawartości badanego białka w lizatach komórkowych.

Tab. 14. Lista przeciwciał pierwszorzędowych wykorzystanych w analizach WB.

Białko	Blokowanie membrany	Przeciwciała I-rzędowe		
		Pochodzenie	Rozcieńczenie	Producent
NMU	5% mleko/TBS-T	królik	1:1000 w TBS-T	Genetex
NMUR1	5% mleko/TBS-T	królik	1:4000 w TBS-T	Genetex
ERK 1/2	5% mleko/TBS-T	mysz	1:500 w 5% mleku/TBS-T	Santa Cruz Biotechnology
pERK 1/2	5% BSA/TBS	królik	1:1000 w 3% BSA/TBS-T	Invitrogen
IGFBP-7	5% mleko/TBS-T	mysz	1:250 w TBS-T	Santa Cruz Biotechnology
Wimentyna	5% mleko/TBS-T	mysz	1:250 w 5% mleku/TBS-T	Santa Cruz Biotechnology
GAPDH	5% mleko/TBS-T	królik	1:20000 w TBS-T	Abcam
β-aktyna	5% mleko/TBS-T	królik	1:5000 w TBS-T	Abcam
α-tubulina	5% mleko/TBS-T	mysz	1:5000 w TBS-T	Abcam

Tab. 15. Lista przeciwciał drugorzędowych wykorzystanych w analizach WB.

Przeciwciała I-rzędowe		Przeciwciała II-rzędowe	
Pochodzenie	Pochodzenie	Rozcieńczenie	Producent
mysz	koza	1:5000 w TBS-T	Santa Cruz Biotechnology
królik	koza	1:5000 w TBS-T	Invitrogen

15. Immunoprecypitacja NMU z medium pohodowlanego

Immunoprecypitację NMU z medium pohodowlanego wykonano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Dynabeads™ Protein A Immunoprecipitation Kit (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z zaleceniami producenta. Zawarte w zestawie kulki magnetyczne opłaszczane białkiem A inkubowano przez 20 min (wszystkie inkubacje w niniejszej metodzie prowadzono w temp. pokojowej) z 2 µg króliczych przeciwciał skierowanych przeciwko NMU (Abxexa, WB) lub kontrolnych IgG pochodzących z króliczej surowicy (Sigma-Aldrich). Niezwiązane przeciwciała odpłukano 200 µl buforu zawartego w zestawie

(wszystkie płukania prowadzono z użyciem statywu magnetycznego unieruchamiającego kompleks z magnetycznymi kulkami na dnie probówki). Kompleks kulek magnetycznych oraz przeciwciał zawieszono w medium pohodowlanym i inkubowano na mieszadle obrotowym przez 2 godz. Medium pohodowlane usunięto, a kompleks zawierający związaną NMU płukano 2-krotnie buforem zawartym w zestawie. Po zawieszeniu w 100 µl buforu j.w. i przeniesieniu do nowej probówki bufor usunięto, a kulki magnetyczne ze związaną NMU zawieszono w rozcieńczonym PBS buforze do próbek (1x) i inkubowano przez 5 min w 95°C.

Materiał uzyskany po przeprowadzeniu immunoprecypitacji rozdzielono elektroforetycznie metodą SDS-PAGE. Obecność NMU analizowano metodą WB za pomocą specyficznych przeciwciał (jak przedstawiono w metodzie „14. Analiza Western Immunoblotting (WB)”). Wykonano analizę densytometryczną otrzymanych obrazów, a otrzymane wyniki znormalizowano względem ilości białka całkowitego zawartego w komórkach znad których zebrano medium.

16. Analiza obecności cytokin w medium pohodowlanym

Obecność cytokin w medium pohodowlanym analizowano z wykorzystaniem testu Proteome Profiler Human Cytokine Array Kit (R&D Biosystems) zgodnie z zaleceniami producenta. Membrany nitrocelulozowe z naniesionymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko ludzkim cytokinom (każde w dwóch powtórzeniach; Ryc. 7) blokowano przez godzinę w temp. pokojowej w buforze dostępnym w zestawie. W tym samym czasie 700 µl medium pohodowlanego inkubowano z mieszaniną biotynyłowanych przeciwciał skierowanych przeciwko badanym cytokinom. Medium pohodowlane po inkubacji z przeciwciałami naniesiono na membrany po usunięciu buforu blokującego i inkubowano razem przez noc w temp. 4°C w celu unieruchomienia kompleksów cytokin z przeciwciałami na membranie. Membrany płukano następnie 3-krotnie przez 10 min buforem płuczącym w celu usunięcia niezwiązanych cytokin. Kolejno membranę umieszczono na 30 min (temp. pokojowa) w buforze zawierającym streptawidynę wyznakowaną HRP wiążącą się do biotynyłowanych przeciwciał. Tak powstałe kompleksy unieruchomione na membranie zwizualizowano na kliszy rentgenowskiej Kodak BioMax Light Film z wykorzystaniem chemiluminescencji. Wykonano analizę densytometryczną otrzymanych obrazów w programie ImageJ. Wyniki intensywności sygnału pochodzącego od badanych cytokin

odniesione do intensywności sygnału obszarów odpowiadających białkom referencyjnym odpowiadały relatywnej zawartości cytokin w medium hodowlanym.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A	Ref I	CCL1/ I-309	CCL2/ MCP-1	MIP-1 α / MIP-1 β	CCL5/ RANTES	CD40 Ligand/ TNFSF5	C5/C5a	CXCL1/ GRO α	CXCL10/ IP-10	Ref II										
B		CXCL11/ I-TAC	CXCL12/ SDF-1	G-CSF	GM-CSF	ICAM-1/ CD54	IFN- γ	IL-1 α / IL-1F1	IL-1 β / IL-1F2											
C		IL-1ra/ IL-1F3	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12 p70											
D		IL-13	IL-16	IL-17A	IL-17E	IL-18/ IL-1F4	IL-21	IL-27	IL-32 α											
E	Ref III	MIF	Serpin E1/ PAI-1	TNF- α	TREM-1											Kontrola negatywna				

Ryc. 7. Schemat membrany Proteome Profiler Human Cytokine Array z zaznaczonymi obszarami odpowiadającymi poszczególnym cytokinom.

17. Barwienie immunofluorescencyjne oraz mikroskopia konfokalna

Na 8-dołkowe szkiełko hodowlane (Nunc/Thermo Scientific) pokryte 0,1 mg/ml roztworem Poli-D-Lizyny wysiano monocyty oraz komórki linii HMEC-1 w ilości odpowiednio 1×10^5 oraz $1,5 \times 10^5$ komórek na dołek w pełnym medium hodowlanym i inkubowano przez 24 godz. Monocyty różnicowano do makrofagów M0 na 8-dołkowych szkiełkach hodowlanych w ilości $0,5 \times 10^5$ komórek na dołek według standardowej procedury przedstawionej powyżej („6. Różnicowanie monocytów i polaryzacja makrofagów”).

Monocyty, makrofagi oraz komórki linii HMEC-1 utrwalono przez 10-min inkubację z 4% roztworem paraformaldehydu w PBS (wszystkie etapy prowadzono w temp. pokojowej), płukano 4-krotnie buforem PBS i blokowano 5% roztworem BSA w PBS przez 30 min. Komórki inkubowano kolejno przez 1 godz. z pierwszorzędowymi przeciwciałami, a następnie, po płukaniu PBS, przez 30 min w ciemności z drugorzędowymi przeciwciałami związanymi z Alexa-Fluor-488 przedstawionymi w poniższej tabeli (Tab. 16). Kontrolę negatywną stanowiły komórki inkubowane wyłącznie z przeciwciałami drugorzędowymi.

Tab. 16. Lista przeciwciał wykorzystanych w barwieniu immunofluorescencyjnym.

Przeciwciała	Białko	Pochodzenie	Rozcieńczenie	Producent
I-rzędowe	NMUR1	królik	1:500 w 3% BSA w PBS	Genetex
II-rzędowe	królicze IgG	osioł	1:200 w 3% BSA w PBS	LifeTechnologies/Thermo Fischer Scientific

Do zwizualizowania błon oraz jąder komórkowych zastosowano 10-min barwienie w ciemności roztworem odpowiednio aglutyniny z kielków pszenicy (WGA, ang. *wheat germ agglutinin*) związanej z Alexa-Fluor 594 oraz barwnika Hoechst33342 przedstawionymi w tabeli poniżej (Tab. 17). Następnie komórki płukano kilkakrotnie buforem PBS i zatapiono w medium Mowiol.

Tab. 17. Lista barwników wykorzystanych w barwieniu immunofluorescencyjnym.

Barwnik	Część komórki	Stężenie	Producent
Hoechst33342	Jądra komórkowe	5 µg/ml w 3% BSA w PBS	LifeTechnologies/ Thermo Fischer Scientific
WGA	Błony komórkowe	2 µM w 3% BSA w PBS	LifeTechnologies/ Thermo Fischer Scientific

Obrazy zarejestrowano za pomocą mikroskopu konfokalnego Nikon D-Eclipse C1 (Nikon, Japonia) z obiektywem 40x z imersją olejową i wykorzystaniem oprogramowania EZ-C1 v 3.6 (Nikon).

18. Cytometria przepływowa

Monocyty oraz makrofagi odklejone na lodzie w roztworze BSA/PBS/EDTA wirowano 180 x g przez 7 min (wszystkie wirowania prowadzono w temp. pokojowej), a następnie zawieszono w BSA/PBS/EDTA w gęstości 1×10^6 komórek na 1 ml. 100 µl zawiesiny (1×10^5 komórek) inkubowano przez 30 min w temp. pokojowej ze specyficznymi przeciwciałami lub odpowiadającymi im kontrolnymi przeciwciałami izotypowymi wyznakowanymi barwnikami fluorescencyjnymi (BD Biosciences, USA) przedstawionymi w tabeli poniżej (Tab. 18).

Tab. 18. Lista przeciwciał używanych do oceny fenotypu różnicowanych makrofagów.

Marker powierzchniowy	Izotyp	Znacznik fluorescencyjny
CD14	IgG1	FITC
CD80	IgG1	PE
HLA-DR	IgG2a	FITC
CD206	IgG1	FITC
CD163	IgG1	PE

Po inkubacji z przeciwciałami komórki płukano 1 ml BSA/PBS/EDTA z wirowaniem 180 x g przez 7 min. Otrzymany osad komórek zawieszono w 300 µl BSA/PBS/EDTA, przeniesiono do probówki przeznaczonej do cytometrii przepływowej i analizowano z wykorzystaniem urządzenia LSR II firmy Becton Dickinson oraz oprogramowania BD FACS Diva (Becton Dickinson). Otrzymane wyniki analizowano z wykorzystaniem oprogramowania Flow Jo (LLC; Becton Dickinson).

19. Ocena aktywacji ścieżki sygnałowej MAPK

1,5 x 10⁶ monocytów różnicowano na płycie 6-dołkowej (lub 12-dołkowej dla THP-1 po wyciszeniu ekspresji *NMUR1* według metody „7. Wyciszenie ekspresji *NMUR1*”) według standardowej metody („6. Różnicowanie monocytów i polaryzacja makrofagów”). Komórki linii HMEC-1 hodowano na płycie 6-dołkowej do osiągnięcia około 70-80% konfluencji. Komórki przygotowano do eksperymentu poprzez kolejne zmiany odpowiedniego medium i inkubacje według schematów przedstawionych w tabelach poniżej (Tab. 19 i 20).

Tab. 19. Etapy przygotowania makrofagów TDM M0 lub MDM M0 do oceny aktywności ścieżki MAPK.

Etap	Czas inkubacji	Medium	Surowica	Suplementy	Antybiotyki
Różnicowanie	2 lub 7 dni	RPMI 1640	10%	PMA i β-merkaptotanol lub GM-CSF	pen-strep
Inkubacja	1 dzień	RPMI 1640	10%	β-merkaptotanol lub x	pen-strep
Głodzenie	6 lub 4 godz.	RPMI 1640	x	β-merkaptotanol lub x	pen-strep
Eksperyment		RPMI 1640/ CM	x	β-merkaptotanol lub x	pen-strep

Tab. 20. Etapy przygotowania komórek linii HMEC-1 do oceny aktywności ścieżki MAPK.

Etap	Czas inkubacji	Medium	Surowica	Suplementy	Antybiotyki
Hodowla	x	MCDB 131	10%	L-Glutamina, hydrokortyzon, EGF	pen-strep, primocyna
Inkubacja	1 dzień	MCDB 131	10%	L-Glutamina	pen-strep
Głodzenie	4 godz.	MCDB 131	x	L-Glutamina	pen-strep
Eksperyment		MCDB 131/ CM	x	L-Glutamina/ x	pen-strep

Makrofagi lub komórki linii HMEC-1 płukano PBS i traktowano przez 3, 7, 15 oraz 30 min NMU-9 w stężeniu 250 nM (lub 3 i 7 min dla TDM po wyciszeniu *NMURI*) lub medium pohodowlanym (CM) z nadkłonów HT29 pcNMU lub pcDNA. Jako kontrolę pozytywną aktywacji szlaku kinaz MAPK dla każdego eksperymentu zastosowano 15-min inkubację z PMA w stężeniu 3 ng/ml. Podstawowy poziom aktywacji kinaz MAPK oceniono w komórkach nietraktowanych żadnym z wymienionych czynników (kontrola negatywna). Następnie komórki lizowano buforem RIPA, oznaczono ilość białka całkowitego metodą BCA i wykonano rozdział elektroforetyczny białek metodą SDS-PAGE. Fosforylację kinaz ERK 1/2 oceniono z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał oraz metody WB (opisanej powyżej „14. Analiza Western Immunoblotting (WB)”). Analizę densytometryczną otrzymanych wyników przeprowadzono w programie ImageJ.

20. Ocena zmian fenotypu

1,5 x 10⁶ PBM różnicowano na płycie 6-dołkowej według standardowej metody („6. Różnicowanie monocytów i polaryzacja makrofagów”). Komórki linii HMEC-1 hodowano na płycie 6-dołkowej do osiągnięcia około 70-80% konfluencji. Komórki przygotowano do eksperymentu poprzez kolejne zmiany odpowiedniego medium i inkubacje według schematów przedstawionych w tabelach poniżej (Tab. 21 i 22).

Tab. 21. Etapy przygotowania makrofagów TDM M0 lub MDM M0 do oceny zmiany fenotypu.

Etap	Czas inkubacji	Medium	Surowica	Suplementy	Antybiotyki
Różnicowanie	2 lub 7 dni	RPMI 1640	10%	PMA i β-merkaptioetanol lub GM-CSF	pen-strep
Inkubacja	1 dzień	RPMI 1640	10%	β-merkaptioetanol lub x	pen-strep
Eksperyment	1 dzień	RPMI 1640	5%	β-merkaptioetanol lub x	pen-strep

Tab. 22. Etapy przygotowania komórek linii HMEC-1 do oceny zmiany fenotypu.

Etap	Czas inkubacji	Medium	Surowica	Suplementy	Antybiotyki
Hodowla	x	MCDB 131	10%	L-Glutamina, hydrokortyzon, EGF	pen-strep, primocyna
Inkubacja	1 dzień	MCDB 131	10%	L-Glutamina	pen-strep
Eksperyment	1 dzień	MCDB 131	2,5%	L-Glutamina	pen-strep

Zmianę ekspresji markerów powierzchniowych polaryzacji makrofagów oceniono metodą cytometrii przepływowej (jak opisano w metodzie „18. Cytometria przepływowa”) po upływie 24 godz. traktowania MDM M0 NMU-9 w stężeniu 500 nM lub inkubacji w samym medium eksperymentalnym.

Komórki linii HMEC-1 traktowano przez 24 godz. VEGF-A w stężeniu 30 ng/ml (kontrola pozytywna) lub NMU-9 w stężeniu 500 nM w medium eksperymentalnym. Komórki lizowano buforem RIPA, oznaczono ilość białka całkowitego metodą BCA i wykonano rozdział elektroforetyczny białek metodą SDS-PAGE. Poziom białek markerowych śródbłonna nowotworowego IGFBP-7 i wimentyny oceniono z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał oraz metody WB (opisanej powyżej „14. Analiza Western Immunoblotting (WB)”). Analizę densytometryczną otrzymanych wyników przeprowadzono w programie ImageJ.

21. Chemotaksja

$1,5 \times 10^6$ monocytów różnicowano na płytce 6-dołkowej według standardowej metody („6. Różnicowanie monocytów i polaryzacja makrofagów”). Makrofagi przygotowano do eksperymentu poprzez kolejne zmiany medium i inkubacje według schematu przedstawionego w tabeli poniżej (Tab. 23).

Tab. 23. Etapy przygotowania makrofagów TDM M0 lub MDM M0 do oceny chemotaktycznego działania NMU.

Etap	Czas inkubacji	Medium	Surowica	Suplementy	Antybiotyki
Różnicowanie	2 lub 7 dni	RPMI 1640	10%	PMA i β -merkaptoetanol lub GM-CSF	pen-strep
Inkubacja	1 dzień	RPMI 1640	10%	β -merkaptoetanol lub x	pen-strep
Eksperyment	1 godz. 45 min lub 3 godz. 30 min	RPMI 1640	0,1%	β -merkaptoetanol lub x	pen-strep

Makrofagi M0 odklejono na lodzie za pomocą BSA/PBS/EDTA. $1,4 \times 10^5$ komórek wirowano, a następnie zawieszono w medium eksperymentalnym. Zawiesinę komórek przeniesiono na wkłady z membraną poliwęglanową z porami o średnicy 5 μ m (Costar/Corning). Wkłady umieszczono na płytce 24-dołkowej (Costar/Corning)

z wcześniej przygotowanym medium eksperymentalnym z dodatkiem NMU-9 w końcowym stężeniu 500 nM. Makrofagi TDM lub MDM inkubowano odpowiednio przez 1 godz. 45 min lub 3 godz. 30 min, a następnie usunięto z wnętrza wkładu medium z komórkami, które nie przemigrowały. Membrany utrwalono poprzez inkubację z mieszaniną kwasu octowego z metanolem (w stosunku 1:3) w temp. -20°C przez 10 min. Po utrwaleniu membrany płukano PBS, a ich wewnętrzną stronę wytarto bawełnianym aplikatorem. Komórki obecne na zewnętrznej stronie membrany wybarwiono 0,5% roztworem fioletu krystalicznego poprzez 30-min inkubację i płukano PBS. Wykonano zdjęcia komórek wybarwionych na membranach w pięciu różnych polach widzenia z użyciem mikroskopu Nikon Eclipse TE 2000-U (Nikon) z obiektywem 10x i oprogramowania NIS-Elements Advanced Research (Nikon). Średnia liczba komórek w obrębie każdej z membran została oceniona przez dwie niezależne osoby z wykorzystaniem oprogramowania Image J [65].

22. Ocena migracji komórek przez membranę poliwęglanową

1,5 x 10⁶ monocytów różnicowano na płycie 6-dołkowej według standardowej metody („6. Różnicowanie monocytów i polaryzacja makrofagów”). Makrofagi przygotowano do eksperymentu poprzez kolejne zmiany medium i inkubacje według schematu przedstawionego w tabeli poniżej (Tab. 24).

Tab. 24. Etapy przygotowania makrofagów TDM M0 lub MDM M0 do oceny migracji.

Etap	Czas inkubacji	Medium	Surowica	Suplementy	Antybiotyki
Różnicowanie	2 lub 7 dni	RPMI 1640	10%	PMA i β-merkaptotoetanol lub GM-CSF	pen-strep
Inkubacja I	1 dzień	RPMI 1640	10%	β-merkaptotoetanol lub x	pen-strep
Inkubacja II	3 godz. 30 min	RPMI 1640/ CM	10%	β-merkaptotoetanol lub x	pen-strep
Eksperyment	1 godz. 45 min lub 3 godz. 30 min	RPMI 1640	0,1%	β-merkaptotoetanol lub x	pen-strep

Makrofagi M0 traktowano wstępnie przez 3,5 godz. NMU-9 w stężeniu 500 nM (w medium jak wskazano w Tab. 24, Inkubacja II) lub CM znad hodowli komórek klonu HT29 pcNMU i kontrolnie pcDNA, a następnie odklejono na lodzie za pomocą BSA/PBS/EDTA. Test migracji przeprowadzono analogicznie do metody opisanej powyżej

(„20. Chemotaksja”) umieszczając wkłady z zawiesiną komórek nad medium eksperymentalne.

23. Ocena migracji testem zarastania rysy

Komórki linii HMEC-1 lub HCT116 hodowano do 95% konfluencji odpowiednio na 24-dołkowej płytce pokrytej 0,1 mg/ml roztworem Poli-D-Lizyny lub płytce 6-dołkowej. Komórki HMEC-1 przygotowano do eksperymentu właściwego poprzez zmiany medium MCDB 131 i kolejne inkubacje przedstawione w tabeli poniżej (Tab. 25).

Tab. 25. Etapy przygotowania komórek linii HMEC-1.

Etap	Czas inkubacji	Medium	Surowica	Suplementy	Antybiotyki
Hodowla	x	MCDB 131	10%	L-Glutamina, hydrokortyzon, EGF	pen-strep, primocyna
Inkubacja I	1 dzień	MCDB 131	10%	L-Glutamina	pen-strep
Inkubacja II, Eksperyment	3,5 godz.	MCDB 131/ CM	x	L-Glutamina/ x	pen-strep

W trakcie inkubacji wstępnej (Inkubacja II w Tab. 25) oraz właściwego eksperymentu komórki HMEC-1 traktowano VEGF-A w stężeniu 50 ng/ml (kontrola pozytywna) lub NMU-9 w stężeniu 500 nM lub medium pohodowlanym (CM) znad HT29 pcNMU oraz HT29 pcDNA (Tab. 25). Komórki HCT116 inkubowano z CM znad makrofagów nietraktowanych lub traktowanych NMU-9 (uzyskanym według metody „8. Przygotowanie medium pohodowlanego (CM, ang. conditioned medium)”).

Na monowarstwie komórek HMEC-1 lub HCT116 wykonano rysę sterylną, jednorazową końcówką do pipety automatycznej i odpłukano oderwane komórki PBS. W przypadku komórek HMEC-1 postęp zarastania rysy dokumentowano co 2 godz. (od momentu wykonania rysy przez kolejne 24 godz.) z wykorzystaniem urządzenia SPARK firmy TK Biotech (wyposażonego w komorę do hodowli komórkowych przy zachowaniu stałych warunków wilgotności, temperatury i stężenia CO₂). Powierzchnię rysy zajmowaną przez komórki w kolejnych punktach czasowych eksperymentu oceniono z wykorzystaniem oprogramowania Image J oraz narzędzia „MRI Wound Healing Tool” [65]. Postęp zarastania rysy wykonanej na monowarstwie komórek HCT116 dokumentowano z wykorzystaniem mikroskopii świetlnej 2 godz. oraz 24 godz. po wykonaniu rysy. Stopień

zarastania rysy oceniono poprzez porównanie średniej szerokości rysy (mierzonej w 5 losowych miejscach) po zakończeniu eksperymentu i porównano do szerokości rysy w zmierzonej w momencie rozpoczęcia eksperymentu (2 godz.).

24. Tworzenie struktur pseudokapilarnych

Komórki HMEC-1 hodowano na płycie 12-dółkowej i przygotowano do eksperymentu właściwego poprzez zmiany medium MCDB 131 i kolejne inkubacje przedstawione w tabeli poniżej (Tab. 26). W trakcie inkubacji wstępnej oraz właściwego eksperymentu komórki traktowano VEGF-A (kontrola pozytywna) w stężeniu 50 ng/ml lub NMU-9 w stężeniu 500 nM lub medium pohodowlanym (CM) z nad klonów HT29 pcNMU oraz pcDNA jako kontrola (Tab. 26).

Tab. 26. Etapy przygotowania komórek linii HMEC-1.

Etap	Czas inkubacji	Medium	Surowica	Suplementy	Antybiotyki
Hodowla	x	MCDB 131	10%	L-Glutamina, hydrokortyzon, EGF	pen-strep, primocyna
Inkubacja I	1 dzień	MCDB 131	10%	L-Glutamina	pen-strep
Inkubacja II, Eksperyment	3,5 godz.	MCDB 131/ CM	2,5%	L-Glutamina/ x	pen-strep

Po inkubacji wstępnej (Inkubacja II w Tab. 26) komórki odklejono akutazą. 3×10^4 komórek zawieszono w medium eksperymentalnym z odpowiednimi dodatkami (j.w.), przeniesiono na płytkę 48-dółkową wcześniej pokrytą 140 μ l roztworu Matrigel o stężeniu 10 mg/ml w pustym medium MCDB 131 i inkubowano przez 6 godz. Wykonano zdjęcia czterech pól widzenia z każdego dołka z wykorzystaniem mikroskopu Nikon Eclipse TE 2000-U microscope (Nikon) z obiektywem 4x i oprogramowania NIS-Elements Advanced Research (Nikon). Średnią liczbę połączeń tworzonych przez grupę węzłów i stanowiących struktury rozgałęzione (dalej opisane jako liczba węzłów) oraz długość segmentów tworzących strukturę zamkniętą z obu stron połączeniami (dalej opisane jako długość segmentów) w polu widzenia oceniano z wykorzystaniem oprogramowania Image J i narzędzia „Angiogenesis analyzer” [65, 66].

25. Analiza statystyczna

Wszystkie analizy statystyczne przedstawione w niniejszej pracy wykonano w programie GraphPad Prism v 7.05 (GraphPad Software, USA). Otrzymane wyniki analizowano pod względem normalności rozkładu testem Shapiro-Wilka. Istotność statystyczną różnic pomiędzy danymi zgodnymi z rozkładem normalnym analizowano odpowiednio testem t-Studenta dla dwóch grup lub testem ANOVA w przypadku większej ilości grup. Do oceny istotności statystycznej różnic danych niezgodnych z rozkładem normalnym wykorzystano testy nieparametryczne, t.j. test U Manna-Whitneya oraz test Kruskala-Wallisa odpowiednio w przypadku dwóch i więcej grup. W przypadku pozytywnego wyniku testu ANOVA bądź testu nieparametrycznego Kruskala-Wallisa wykonano testy porównania wielokrotnego Dunnetta bądź Dunna. Różnice pomiędzy danymi sparowanymi oceniono poprzez wykorzystanie odpowiednio sparowanego testu t-Studenta dla wyników zgodnych z rozkładem normalnym lub nieparametrycznego testu rang Wilcoxon, podobnie jak przy porównaniu wyników z określoną wartością hipotetyczną.

Różnice w porównywanych wynikach uznano za istotne statystycznie przy założeniu, że $p \leq 0,05$. Na wykresach w niniejszej pracy przedstawiono trzy stopnie istotności statystycznej, dla których $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ i $***p \leq 0,001$.

Wyniki

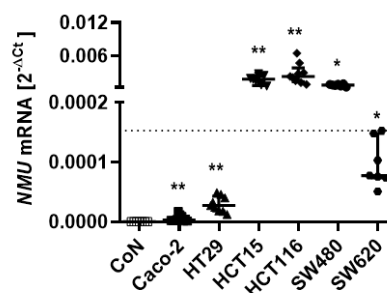
1. Charakterystyka komórek linii raka jelita grubego (RJG)

Układ badawczy pozwalający na ocenę wpływu NMU wydzielonej przez komórki RJG na komórki modelowe makrofagów i śródbłonka mikronaczyniowego wymagał użycia komórek linii pochodzenia nowotworowego wydzielających wspomniane białko. W celu zaprojektowania takiego układu opracowano podstawową charakterystykę 6 linii komórkowych wywodzących się z RJG (o fenotypie od nabłonkowego po silnie mezenchymalny, prezentujące różne klasy CMS; Tab. 1) pod względem ekspresji *NMU* oraz obecności *NMU* wewnątrz komórek i w medium pochodzonym.

1.1. Ocena ekspresji *NMU* w komórkach RJG

Ekspresję *NMU* określono w analizowanych liniach komórkowych RJG wykorzystując metodę PCR w czasie rzeczywistym oraz sondy TaqMan.

Ekspresję *NMU* na poziomie różnym od zera stwierdzono w każdej z 6 linii komórkowych wywodzących się z RJG (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; Ryc. 8). W komórkach linii nabłonkowej (CCD 841 CoN) nie wykryto mRNA dla badanego genu (Ryc. 8). Na podstawie analizy statystycznej otrzymanych wyników wyznaczono medianę poziomu ekspresji *NMU*, która wynosiła $2^{-\Delta Ct} = 0,00015$. Na podstawie porównania otrzymanych wyników do wyznaczonej mediany linie komórkowe podzielono na grupy o niskiej ($2^{-\Delta Ct}$ poniżej 0,00015, linie: Caco-2, HT29 i SW620) oraz wysokiej ($2^{-\Delta Ct}$ powyżej 0,00015, linie: HCT15, HCT116, SW480) ekspresji *NMU* (Ryc. 8).

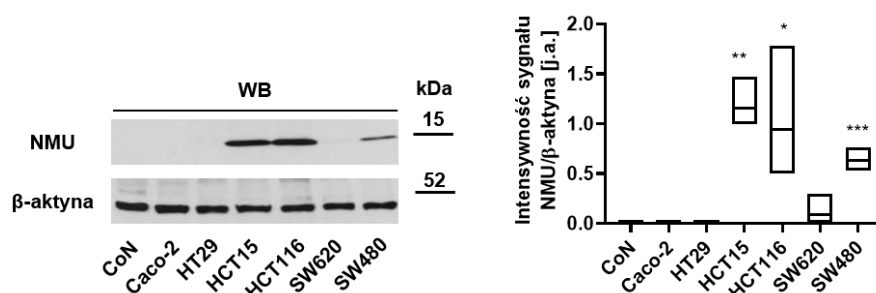


Ryc. 8. Ekspresja *NMU* w komórkach linii RJG oraz komórkach linii nabłonkowej. Poziom ekspresji *NMU* odniesiono do genu referencyjnego β -aktyny ($2^{-\Delta Ct}$). Wyniki przedstawiono jako medianę z rozstępem międzykwartylowym (istotność statystyczną różnic poziomu ekspresji od zera oszacowano testem Wilcozona; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; $n \geq 7$). Linia przerywaną zaznaczono medianę poziomu ekspresji *NMU* w komórkach linii RJG.

1.2. Ocena wewnątrzkomórkowego poziomu NMU w komórkach RJG

Obecność NMU analizowano w lizatach badanych linii komórkowych RJG z wykorzystaniem metody WB.

Obecność NMU na poziomie wykrywalnym zastosowaną metodą zaobserwowano w komórkach linii z grupy wysokiej ekspresji NMU (Ryc. 9). Na podstawie analizy statystycznej danych otrzymanych w wyniku densytometrii stwierdzono poziom białka istotnie różny od zera w komórkach linii HCT15 (** $p \leq 0,01$), HCT116 (* $p \leq 0,05$) i SW480 (***) $p \leq 0,001$; Ryc. 9).

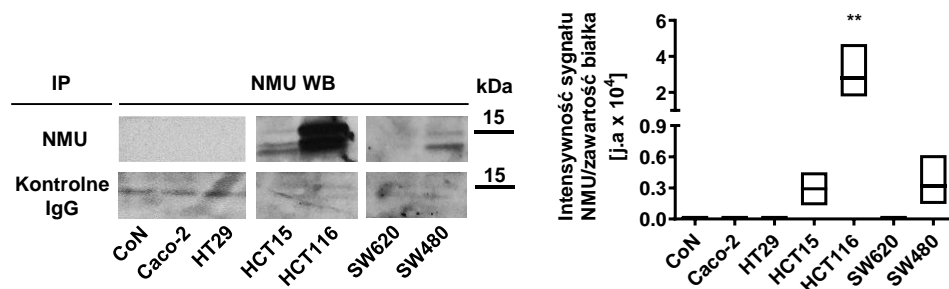


Ryc. 9. Ocena obecności NMU w lizatach komórkowych linii RJG. Reprezentatywny obraz analizy WB oraz analiza densytometryczna intensywności sygnału wykonana w programie ImageJ. Wyniki intensywności prążków pochodzących od NMU znormalizowano względem kontroli nałożenia (β -aktyna) i przedstawiono w jednostkach arbitralnych (j.a.) jako wartość średnią z zakresem min-max (istotność statystyczną różnicy sygnału od zera oszacowano testem t-Studenta; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; $n \geq 4$).

1.3. Ocena wydzielania NMU do środowiska

Zdolność wydzielania NMU do środowiska przez komórki badanych linii komórkowych RJG oceniono poprzez zastosowanie immunoprecypitacji białka z medium pohodowlanego za pomocą specyficznych przeciwciał, a następnie jego identyfikację metodą WB.

Obecność NMU w medium pohodowlanym, na poziomie istotnie różnym od zera wykryto wyłącznie w medium pohodowlanym znad komórek linii HCT116 (** $p \leq 0,01$; Ryc. 10).



Ryc. 10. Identyfikacja NMU w medium pochodzącym z linii komórkowych RJG za pomocą metod immunoprecypitacji i WB. Reprezentatywny obraz analizy WB oraz analiza densytometryczna intensywności sygnału wykonana w programie ImageJ. Wyniki intensywności prążków pochodzących od NMU znormalizowano względem ilości białka całkowitego izolowanego z komórek wydzielających i przedstawiono w jednostkach arbitralnych (j.a.) jako wartość średnią z zakresem min-max (istotność statystyczną różnicy intensywności prążków od zera oszacowano testem t-Studenta dla jednej próby; ** $p \leq 0,01$; $n \geq 3$).

2. Przygotowanie i charakterystyka komórek ze stabilną nadekspresją NMU

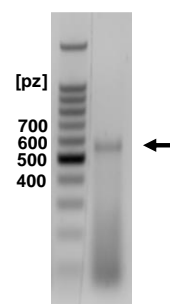
Wykorzystane w niniejszej pracy linie komórkowe RJG wykazywały znaczące różnice pod względem charakterystyki molekularnej, fenotypu (Tab. 1), a także pod względem ekspresji i poziomu wydzielania NMU. W związku z powyższym, opierając się na wynikach przedstawionych w poprzedniej części niniejszego rozdziału, do dalszych badań wybrano linię HT29 charakteryzującą się niskim poziomem ekspresji *NMU* przy jednoczesnym braku detekcji białka. Komórki wybranej linii transfekowano wektorem ekspresyjnym zawierającym sekwencję kodującą NMU, a wyprowadzone stabilne klony z nadekspresją *NMU* i określonym poziomem białka wydzielonego do środowiska wykorzystano jako model komórek nowotworowych wydzielających NMU. Komórki kontrolne stanowiły klony tej samej linii komórkowej po transfekcji samym wektorem pcDNA. W przypadku tych komórek nie potwierdzono obecności NMU w medium pochodzącym. Przygotowanie komórek z nadekspresją NMU umożliwiło zbadanie wpływu NMU pochodzenia nowotworowego na komórki modelowe makrofagów oraz śródbłonna mikronaczyniowego i wykluczenie niespecyficznego wpływu czynników wydzielanych przez komórki pochodzące z różnych linii komórkowych RJG.

2.1. Przygotowanie wektora ekspresyjnego i transfekcja komórek linii HT29

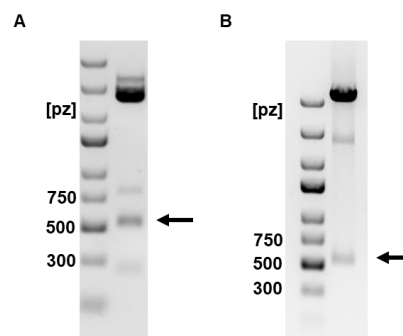
W celu transfekcji i wyselekcjonowania klonów komórek linii HT29 ze stabilną nadekspresją *NMU*, przygotowano wektor ekspresyjny pcDNA 3.1(+) z genem oporności na hygromycynę B zawierający sekwencję kodującą *NMU* (nazywany dalej pcNMU).

Sekwencję kodującą *NMU* wykorzystaną do przygotowania wektora pcNMU pozyskano z komórek SW480 na drodze reakcji PCR z odwrotną transkrypcją. Po rozdziale otrzymanych produktów w 1% żelu agarozowym zidentyfikowano prążek o długości 556 pz odpowiadający sekwencji kodującej *NMU* (Ryc. 11).

Otrzymany produkt oczyszczono z żelu, a następnie po wklonowaniu do wektora pJET1.2/blunt powielono w komórkach *E. coli* TOP10. Powielony plazmid izolowano i trawiono z użyciem enzymów restrykcyjnych HindIII i BamHI. Produkty trawienia rozdzielono w 1% żelu agarozowym (Ryc. 12A). Produkt o wielkości 556 pz wyizolowano z żelu. Po wklonowaniu do wektora pcDNA 3.1(+) przeprowadzono ponowną analizę restrykcyjną wektora (Ryc. 12B). Namnożone i wyizolowane z komórek *E. coli* wektory pcDNA i pcNMU poddano reakcji sekwencjonowania w celu potwierdzenia zgodności sekwencji.



Ryc. 11. Analiza rozdziału produktów reakcji PCR w 1% żelu agarozowym. Strzałką zaznaczono prążek odpowiadający sekwencji kodującej *NMU* (556 pz).

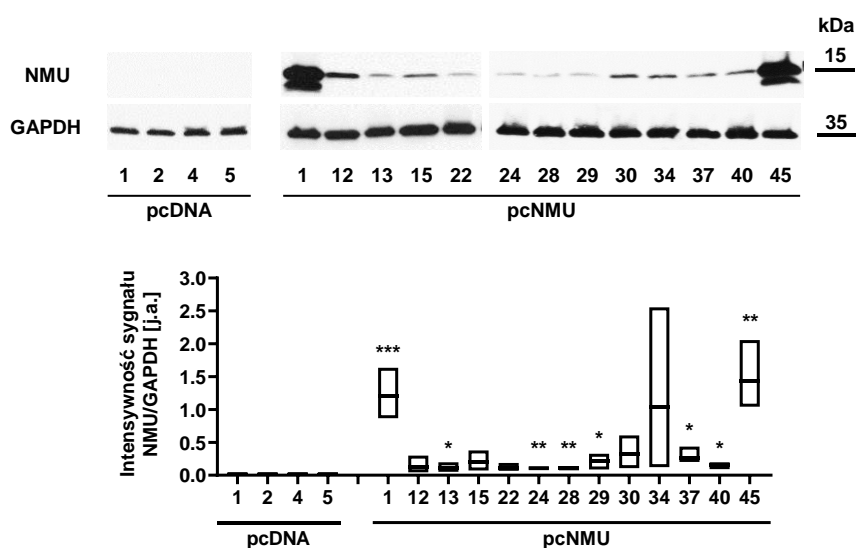


Ryc. 12. Analiza rozdziału produktów trawienia plazmidów (A) pJET1.2/blunt i (B) pcDNA 3.1(+) z wklonowaną sekwencją kodującą *NMU* w 1% żelu agarozowym. Strzałką zaznaczono prążek odpowiadający sekwencji kodującej *NMU* (556 pz).

2.2. Transfekcja komórek HT29, selekcja klonalna i identyfikacja *NMU*

Wyizolowane z komórek *E. coli* wektory pcDNA i pcNMU wprowadzono do komórek linii HT29 na drodze nukleofekcji. Kolejno komórki poddano selekcji klonalnej z zastosowaniem hygromycyny B. Stężenie antybiotyku selekcyjnego zostało wyznaczone doświadczalnie w ramach niniejszej pracy. Najniższe stężenie hygromycyny B, które w zastosowanych warunkach eksperymentalnych wywołało śmierć wszystkich komórek HT29 w hodowli, wynosiło 400 $\mu\text{g/ml}$.

Obecność NMU w lizatach z komórek otrzymanych po przeprowadzeniu transfekcji i selekcji klonalnej oceniono metodą WB. Na podstawie analizy otrzymanych wyników potwierdzono wyselekcjonowanie 4 klonów kontrolnych HT29, w których po wprowadzeniu wektora pcDNA nie stwierdzono obecności NMU, podobnie jak w nietransfekowanych komórkach linii HT29 (Ryc. 13). Podwyższony poziom NMU, różniący się statystycznie istotnie od zera, zidentyfikowano w 8 klonach HT29 wyselekcjonowanych po transfekcji wektorem pcNMU (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; Ryc. 13).

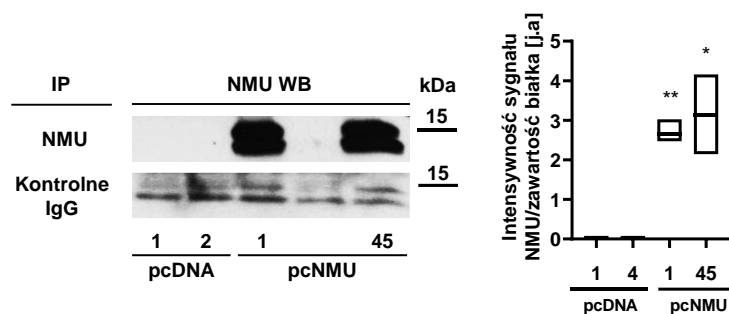


Ryc. 13. Ocena obecności NMU w klonach HT29. Reprezentatywny obraz analizy WB oraz analiza densytometryczna intensywności sygnału wykonana w programie ImageJ. Wyniki intensywności prążków pochodzących od NMU znormalizowano względem kontroli nałożenia (GAPDH) i przedstawiono w jednostkach arbitralnych (j.a.) jako wartość średnią z zakresem min-max (istotność statystyczną różnicy intensywności prążków od zera oszacowano testem t-Studenta dla jednej próby; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; $n \geq 3$).

2.3. Ocena wydzielania NMU do środowiska przez stabilne klon HT29

Obecność NMU oceniono z wykorzystaniem immunoprecypitacji i WB w mediach pochodowlanych z klonów HT29 o najwyższym poziomie NMU w lizatach komórkowych (Ryc. 13) oraz w medium z hodowli wybranych klonów kontrolnych.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono obecność NMU na poziomie istotnie wyższym od zera w medium pochodowlanym z dwóch klonów: pcNMU1 oraz pcNMU45 (odpowiednio ** $p \leq 0,01$ oraz * $p \leq 0,05$; Ryc. 14).



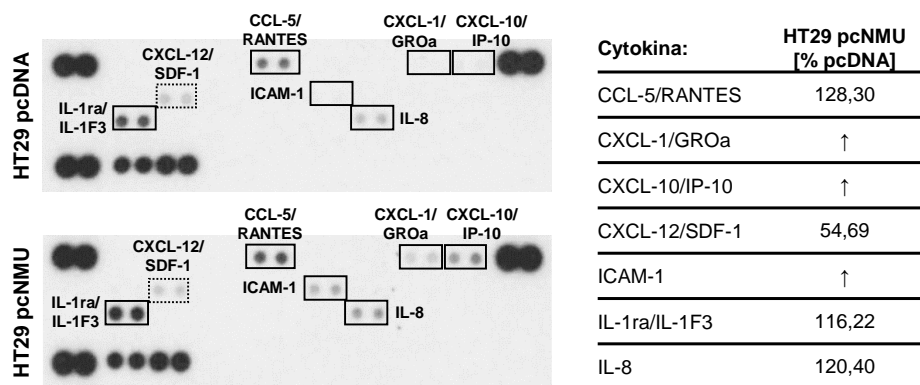
Ryc. 14. Identyfikacja NMU w medium pochodzącym z klonów HT29 za pomocą metod immunoprecypitacji i WB. Reprezentatywny obraz analizy WB oraz analiza densytometryczna intensywności sygnału wykonana w programie ImageJ. Wyniki intensywności prążków pochodzących od NMU znormalizowano względem ilości białka całkowitego izolowanego z komórek wydzielających i przedstawiono w jednostkach arbitralnych (j.a.) jako wartość średnią z zakresem min-max (istotność statystyczną różnicy intensywności prążków od zera oznaczono testem t-Studenta dla jednej próby; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; $n \geq 3$).

Na podstawie otrzymanych wyników, jako źródło NMU wydzielonej do środowiska przez komórki nowotworowe, wykorzystywane w kolejnych etapach badań, wybrano klon HT29 pcNMU45 (oznaczany dalej jako HT29 pcNMU) oraz kontrolny klon pcDNA1 (oznaczany dalej jako HT29 pcDNA).

2.4. Ocena zmian profilu cytokin wydzielanych przez komórki HT29

Zmiany profilu wydzielanych cytokin związane z nadekspresją NMU w komórkach HT29 oceniono wykorzystując test Proteome Profiler Human Cytokine Array.

Wyniki przeprowadzonego testu pozwoliły na stwierdzenie różnic w poziomach cytokin wydzielanych przez klony HT29 pcDNA i pcNMU. W medium pochodzącym z komórek klonu pcNMU zaobserwowano wyższy poziom cytokin CCL-5, CXCL-1, CXCL-10, ICAM-1, IL-1ra i IL-8 oraz niższy poziom CXCL-12 w stosunku do medium pochodzącego z klonu kontrolnego (Ryc. 15).



Ryc. 15. Zmiany profilu cytokin wydzielanych przez komórki RJG związane z nadekspresją NMU. Reprezentatywny obraz membran oraz analiza densytometryczna intensywności sygnału pochodzącego od cytokin wykonana w programie ImageJ (n = 1). Tendencję spadkową oraz wzrostową zmian intensywności wydzielania cytokin przez komórki klonu pcNMU w stosunku do klonu pcDNA oznaczono na obrazach odpowiednio linią przerywaną oraz ciągłą. Wyniki analizy densytometrycznej przedstawiono w tabeli jako procent intensywności sygnału pochodzącego od cytokin wydzielonych przez komórki HT29 pcNMU w odniesieniu do komórek klonu pcDNA (100%; oznaczeniem ↑ wskazano cytokiny, dla których sygnał wykryto wyłącznie w medium z nadkłonem pcNMU).

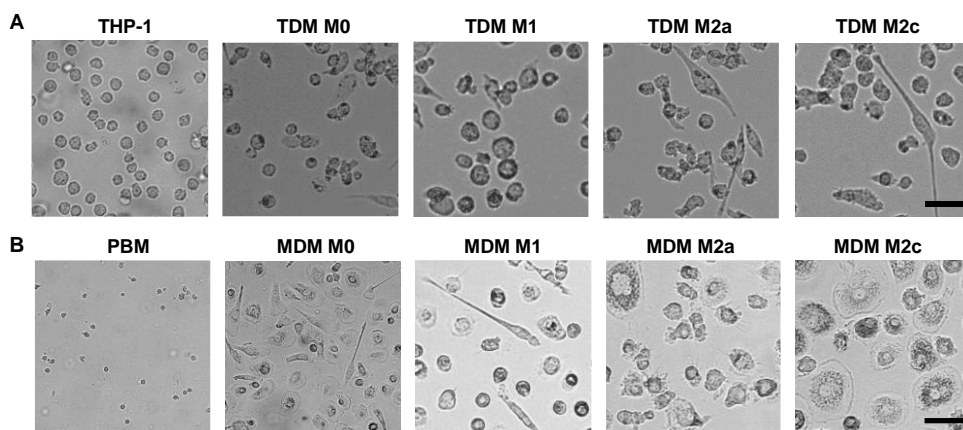
3. Charakterystyka monocytów i makrofagów stosowanych w badaniach

Stwierdzenie możliwości odbierania sygnału pochodzącego od NMU stanowiło podstawę zastosowania makrofagów w układzie badawczym tworzonym w ramach niniejszej pracy. W prowadzonych badaniach wykorzystano dwa modele monocytów i makrofagów (pochodzących z linii komórkowej THP-1 oraz izolowanych z krwi obwodowej zdrowych dawców). W obu zastosowanych modelach zbadano ekspresję receptorów dla NMU: *NMUR1*, *NMUR2* oraz *NTSR1* i *GHSR1b*, których produkty tworzą w postaci dimeru aktywny receptor. W celu wybrania komórek o najwyższej potencjalnej zdolności do przekazywania sygnału pochodzącego od NMU, dokonano analizy różnic w poziomie ekspresji receptorów w poszczególnych fenotypach makrofagów.

Dodatkowych informacji na temat charakterystyki zastosowanych modeli monocytów i makrofagów dostarczyły analizy wewnątrzkomórkowej obecności NMU i możliwości jej wydzielania do środowiska.

3.1. Opracowanie optymalnej metody różnicowania monocytów i polaryzacji makrofagów

Z uwagi na różnorodność dostępnych w literaturze metod różnicowania monocytów i polaryzacji makrofagów, w niniejszej pracy opracowano protokoły optymalne w stosowanych warunkach badawczych. Najlepsze wyniki różnicowania komórek linii THP-1 do niespolaryzowanych makrofagów TDM otrzymano poprzez 2-dniowe traktowanie PMA i 1-dniową inkubację bez dodatku czynnika różnicującego. PBM różnicowano do MDM M0 poprzez inkubację z GM-CSF przez 7 dni. W opracowanej metodzie polaryzacji makrofagów, niezależnie od ich pochodzenia, fenotyp M1 otrzymano poprzez stymulację IFN- γ oraz LPS (przez 1 lub 5 dni), M2a IL-4 (przez 4 lub 5 dni), zaś M2c IL-10 (przez 4 lub 5 dni). Różnice morfologiczne komórek otrzymanych z zastosowaniem powyższych metod przedstawiono poniżej (Ryc. 16).



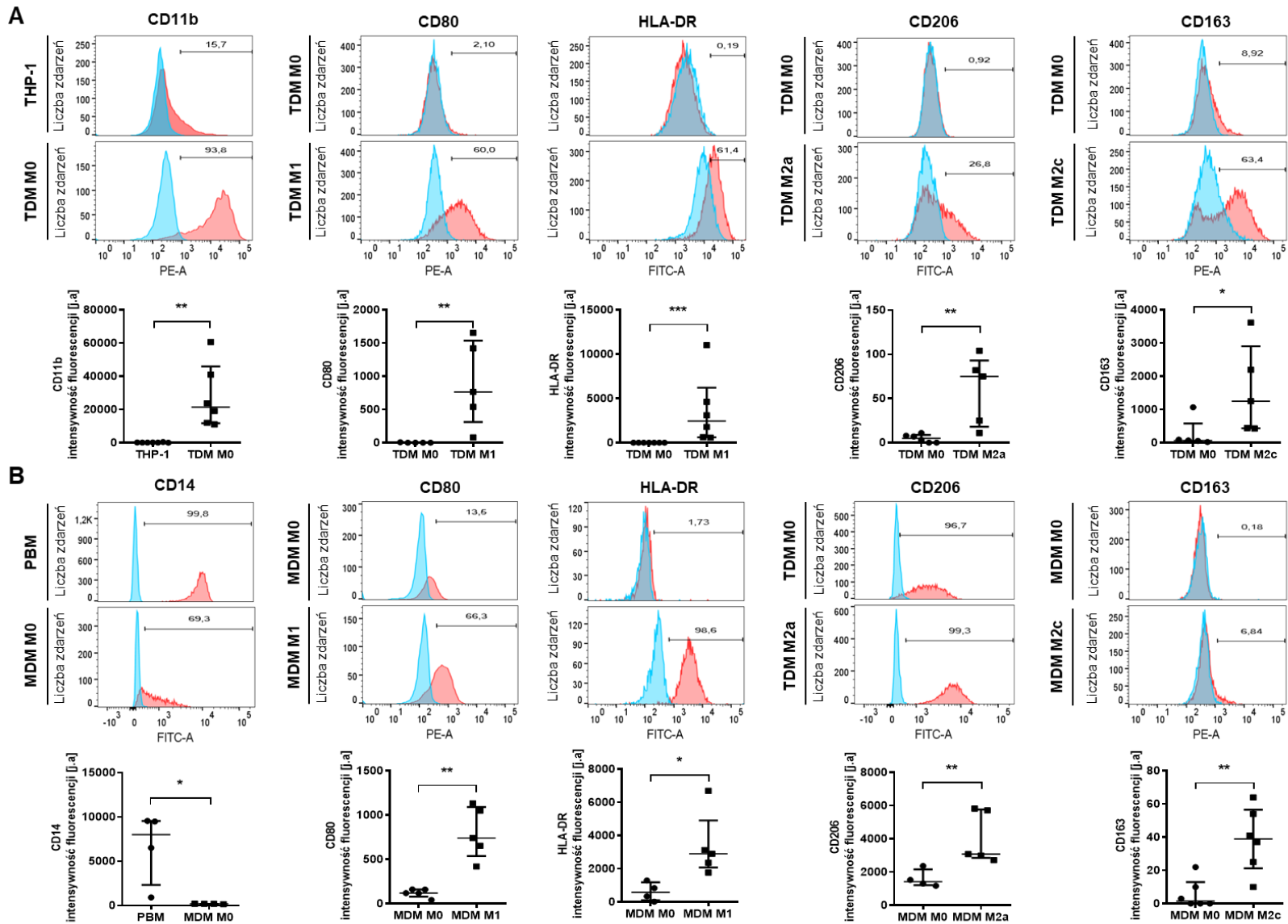
Ryc. 16. Morfologia (A) komórek linii THP-1 i (B) monocytów PBM oraz odróżnicowanych z nich makrofagów TDM i MDM niespolaryzowanych (M0) oraz po polaryzacji w fenotypy M1, M2a i M2c. Skala na zdjęciach odpowiada 20 μm .

Efektywność stosowanych procedur różnicowania monocytów i polaryzacji makrofagów zweryfikowano poprzez identyfikację markerów powierzchniowych charakterystycznych dla poszczególnych fenotypów (Tab. 27) z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.

Tab. 27. Markery powierzchniowe charakteryzujące monocyty oraz poszczególne fenotypy makrofagów.

Fenotyp makrofagów	Marker powierzchniowy	
TDM M0	CD11b	↑
MDM M0	CD14	↓
M1	CD80	↑
M1	HLA-DR	↑
M2a	CD206	↑
M2c	CD163	↑

Analiza otrzymanych wyników pozwoliła na potwierdzenie zmian ekspresji markerów powierzchniowych zgodnych z opisem w dostępnej literaturze. Podczas różnicowania THP-1 oraz PBM do makrofagów M0 zaobserwowano odpowiednio wzrost ekspresji markera powierzchniowego CD11b (Ryc. 17A) oraz spadek ekspresji CD14 (Ryc. 17B). Niezależnie od pochodzenia makrofagów, podczas polaryzacji zaobserwowano wzrost ekspresji markerów powierzchniowych CD80 oraz HLA-DR dla fenotypu M1, CD206 dla fenotypu M2a i CD163 dla fenotypu M2c (Ryc. 17A i B).

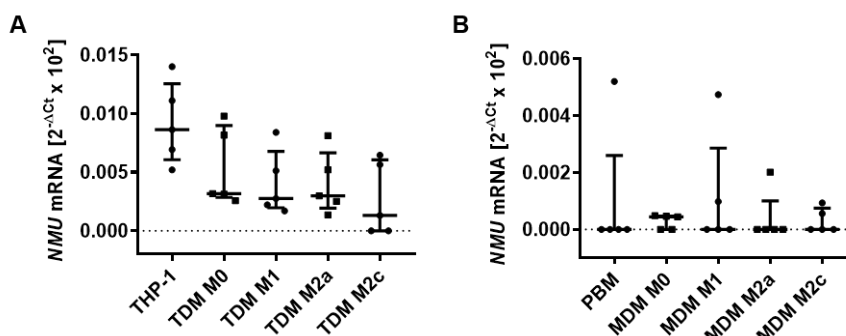


Ryc. 17. Analiza cytometryczna ekspresji markerów różnicowania (A) THP-1 oraz (B) PBM w makrofagi M0 oraz ich polaryzacji. Zmiany w ekspresji markerów powierzchniowych różnicowania monocytów w niespolaryzowane makrofagi M0: (A) CD11b dla THP-1/TDM M0 i (B) CD14 dla PBM/MDM M0 oraz markerów polaryzacji do fenotypu M1 oraz M2a i M2c odpowiednio: CD80, HLA-DR oraz CD206 i CD163. Obrazy przedstawiają reprezentatywne histogramy. Intensywność fluorescencji (j.a.) poszczególnych markerów powierzchniowych przedstawiono jako medianę z rozstępem międzykwartylowym (istotność statystyczną różnicy intensywności fluorescencji oszacowano testem U Manna-Whitney'a; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; $n \geq 4$).

3.2. Ocena ekspresji NMU

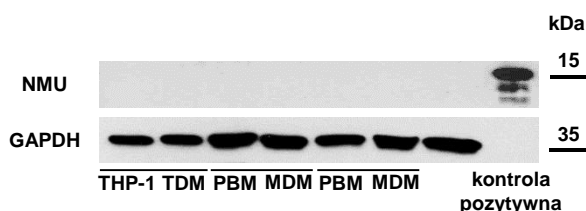
Ekspresję *NMU* oceniono w monocytach oraz makrofagach poszczególnych fenotypów z wykorzystaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Wewnątrzkomórkową obecność *NMU* zbadano następnie w tych samych komórkach metodą WB.

Na podstawie analizy otrzymanych wyników nie stwierdzono ekspresji *NMU* na poziomie istotnie różnym od zera w obu badanych modelach monocytów oraz makrofagów (Ryc. 18A i B). Dodatkowo w PBM oraz różnicowanych z nich MDM ekspresja *NMU* zależna była od dawcy, od którego pochodził badany materiał.



Ryc. 18. Ekspresja *NMU* w komórkach modelowych monocytów i różnicowanych z nich makrofagów. Poziom ekspresji *NMU* w (A) komórkach linii THP-1 i TDM oraz (B) PBM i MDM odniesiono do genu referencyjnego *GAPDH* ($2^{-\Delta Ct}$). Wyniki przedstawiono jako medianę z rozstępem międzykwartylowym (istotność statystyczną różnicy poziomu ekspresji *NMU* od zera oszacowano testem Wilcoxon'a; $n = 5$).

Na podstawie przeprowadzonej analizy WB nie stwierdzono wewnątrzkomórkowej obecności *NMU* na poziomie wykrywalnym zastosowaną metodą (Ryc. 19).

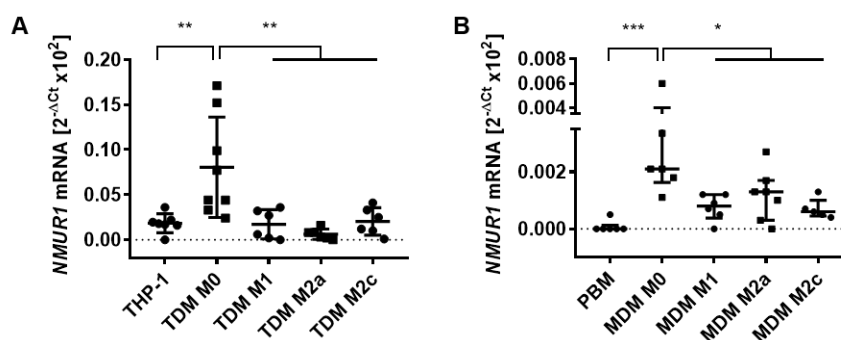


Ryc. 19. Ocena obecności *NMU* w lizatach z komórek THP-1 oraz PBM pochodzących od dwóch niezależnych dawców i różnicowanych z nich makrofagów M0 (odpowiednio TDM i MDM). Reprezentatywny obraz analizy WB.

3.3. Ocena ekspresji *NMURs*

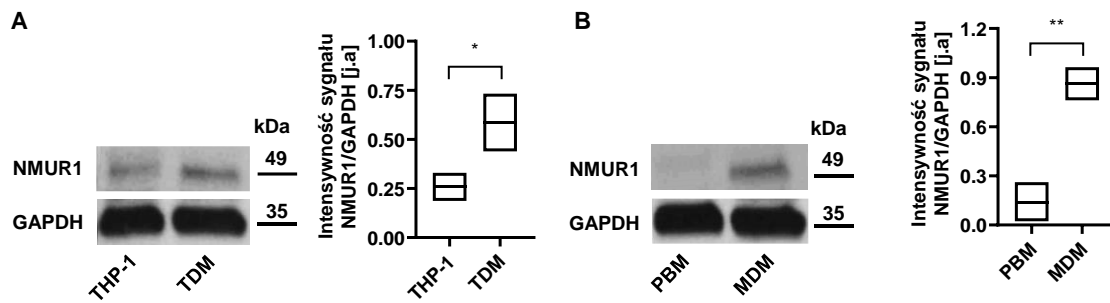
Ekspresję *NMUR1* i *NMUR2* oceniono w monocytach oraz makrofagach poszczególnych fenotypów z wykorzystaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym. W komórkach charakteryzujących się najwyższą ekspresją receptorów oceniono następnie ich obecność z wykorzystaniem metod WB oraz barwienia immunofluorescencyjnego i mikroskopii konfokalnej.

Ekspresja *NMUR1* została wykryta na różnym poziomie w komórkach linii THP-1 oraz w pochodzących od nich makrofagach (Ryc. 20A). W przypadku PBM ekspresja receptora nie osiągnęła poziomu istotnie różnego od zera (Ryc. 20B), obecna była jednak we wszystkich badanych fenotypach makrofagów. Najwyższy poziom ekspresji *NMUR1* wykazywały niespolaryzowane makrofagi, niezależnie od ich pochodzenia ($*p \leq 0,05$ – $***p \leq 0,001$; Ryc. 19A i B). Na podstawie przeprowadzonej analizy nie stwierdzono ekspresji *NMUR2* zarówno w monocytach, jak i w żadnych z badanych fenotypów makrofagów.



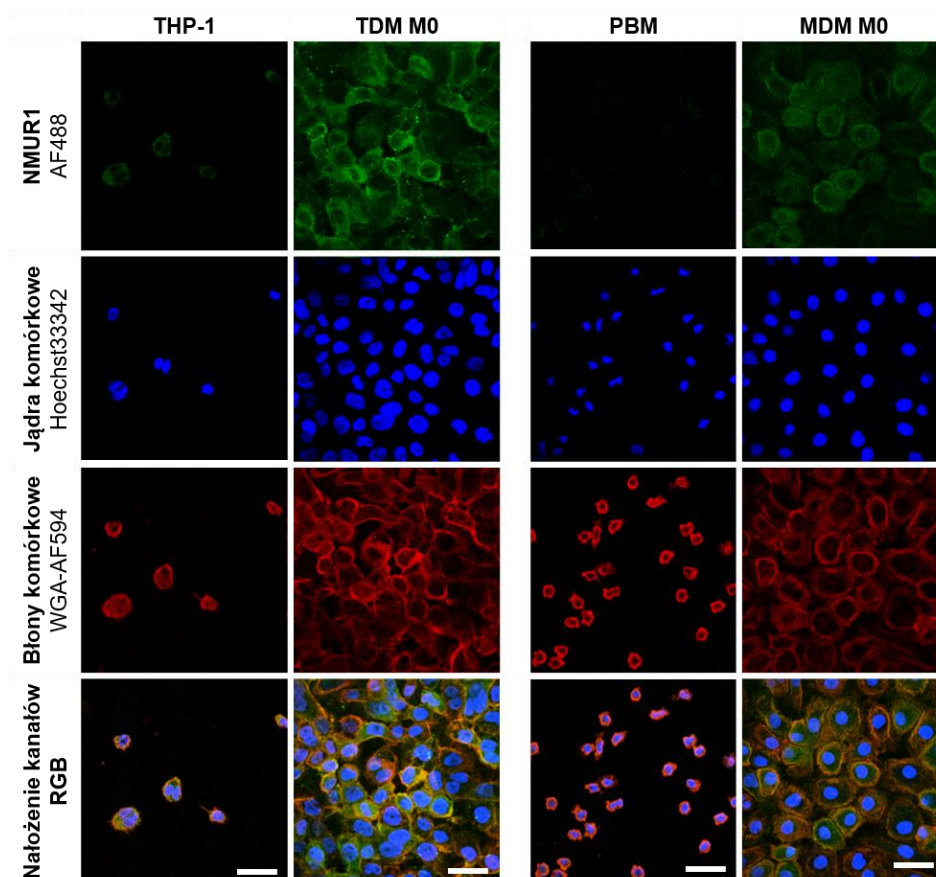
Ryc. 20. Analiza ekspresji *NMUR1* w komórkach modelowych monocytów i różnicowanych z nich makrofagów. Poziom ekspresji *NMUR1* w (A) komórkach linii THP-1 i TDM oraz (B) PBM i MDM odniesiono do genu referencyjnego *GAPDH* ($2^{-\Delta Ct}$). Wyniki przedstawiono jako wartość średnią z odchyleniem standardowym (istotność statystyczną różnicy poziomu ekspresji *NMUR1* od zera oszacowano testem t-Studenta dla jednej próby; $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$; istotność różnicy ekspresji *NMUR1* w makrofagach M0 oraz pozostałych fenotypach oszacowano testem ANOVA z testem post-hoc; $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$; $n \geq 5$).

Obecność *NMUR1* analizowano w komórkach o najwyższym poziomie ekspresji mRNA: niespolaryzowanych makrofagach TDM i MDM. Poziom białka porównano do odpowiednich komórek wyjściowych (THP-1 i PBM). Na podstawie analizy otrzymanych wyników stwierdzono obecność *NMUR1* na poziomie istotnie różnym od zera w komórkach THP-1 i jej brak w PBM (Ryc. 21A i B). Obecność *NMUR1* potwierdzono w makrofagach obu z badanych modeli na poziomie istotnie wyższym niż w monocytach, z których zostały zróżnicowane (TDM M0 $*p \leq 0,05$; Ryc. 21A; MDM M0 $**p \leq 0,01$; Ryc. 21B).



Ryc. 21. Analiza obecności NMUR1 w (A) komórkach linii THP-1 i (B) PBM różnicowanych z nich makrofagach M0 (odpowiednio TDM i MDM). Reprezentatywny obraz analizy WB oraz analiza densytometryczna intensywności sygnału wykonana w programie ImageJ. Wyniki intensywności prążków pochodzących od NMUR1 znormalizowano względem kontroli nałożenia (GAPDH) i przedstawiono w jednostkach arbitralnych (j.a.) jako wartość średnią z zakresem min-max (istotność statystyczną różnicy poziomu ekspresji *NMUR1* od zera oszacowano testem t-Studenta dla jednej próby; $p \leq 0,05$, $p \leq 0,001$; istotność statystyczną różnicy pomiędzy intensywnością sygnału pochodzącego od NMUR1 w monocytach i makrofagach oszacowano sparowanym testem t-Studenta; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; $n = 4$).

Obecność NMUR1 zwizualizowano na powierzchni monocytów i makrofagów M0 za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego i mikroskopii konfokalnej (Ryc. 22).



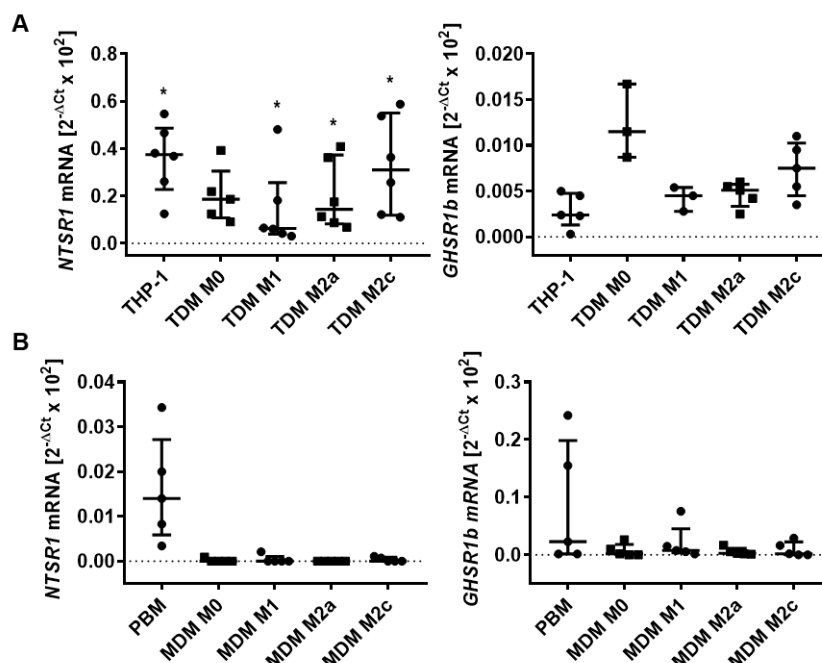
Ryc. 22. Wizualizacja NMUR1 na powierzchni monocytów THP-1 i PBM oraz makrofagów TDM M0 i MDM M0. Do barwienia immunofluorescencyjnego receptora wykorzystano specyficzne względem NMUR1 przeciwciała pierwszorzędowe oraz przeciwciała drugorzędowe sprzężone z fluoroforem AF488. Jądra i błony komórkowe zwizualizowano za pomocą barwienia odpowiednio Hoechst33342 i WGA sprzężonej z AF594. Skala na zdjęciu odpowiada 100 μm .

Ze względu na potwierdzony powyższymi wynikami najwyższy poziom ekspresji receptora dla NMU w niespolaryzowanych makrofagach komórki te wykorzystano w kolejnych badaniach prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy.

3.4. Ocena ekspresji *NTSR1* i *GHSR1b*

Ekspresję *NTSR1* i *GHSR1b*, których białkowe produkty tworzą w postaci dimeru alternatywny receptor dla NMU, oceniono w monocytach oraz makrofagach poszczególnych fenotypów z wykorzystaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Na podstawie analizy otrzymanych wyników stwierdzono ekspresję *NTSR1* na poziomie istotnie wyższym od zera ($*p \leq 0,05$; Ryc. 23A) w komórkach THP-1 oraz TDM wszystkich badanych fenotypów z wyjątkiem M0. Ekspresja *GHSR1b* nie osiągała poziomu istotnie różnego od zera w komórkach THP-1 i pochodzących od nich TDM (Ryc. 23A). W przypadku PBM poziom ekspresji *NTSR1* i *GHSR1b* był znacznie zróżnicowany i zależny od dawcy, od którego pochodził materiał. Zarówno w PBM oraz różnicowanych z nich MDM ekspresja *NTSR1* i *GHSR1b* nie osiągała poziomu istotnie różnego od zera (Ryc. 23B).



Ryc. 23. Analiza ekspresji *NTSR1* i *GHSR1b* w komórkach modelowych monocytów i różnicowanych z nich makrofagów. Poziom ekspresji *NTSR1* i *GHSR1b* w komórkach (A) linii THP-1 oraz (B) PBM i powstałych z nich makrofagach odniesiono do genu referencyjnego *GAPDH* ($2^{-\Delta Ct}$). Wyniki przedstawiono jako medianę z rozstępem międzykwartylowym (istotność statystyczną różnicy poziomu ekspresji od zera oszacowano testem Wilcozona; $*p \leq 0,05$; $n \geq 3$).

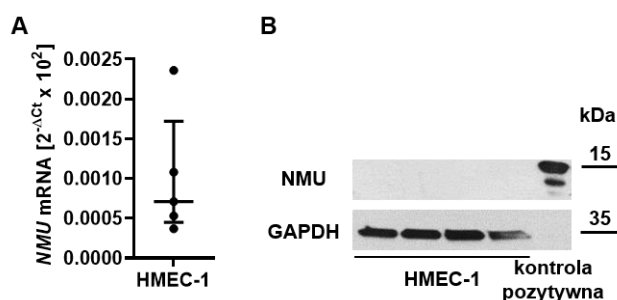
4. Charakterystyka komórek linii HMEC-1

Wchodzące w skład układu badawczego komórki HMEC-1, wykorzystane jako model śródbłonna mikronaczyniowego, pozostają słabo poznane pod względem ekspresji *NMU* i jej receptorów, stąd badania powyższych cech stały się kolejną częścią niniejszej pracy.

4.1. Ocena ekspresji *NMU*

Ekspresję *NMU* oceniono w komórkach linii HMEC-1 z wykorzystaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Wewnątrzkomórkową obecność *NMU* zbadano następnie metodą WB.

Na podstawie analizy otrzymanych wyników nie stwierdzono ekspresji *NMU* na poziomie istotnie różnym od zera w komórkach linii HMEC-1 (Ryc. 24A). Nie stwierdzono również wewnątrzkomórkowej obecności *NMU* na poziomie wykrywalnym zastosowaną metodą (Ryc. 24B).

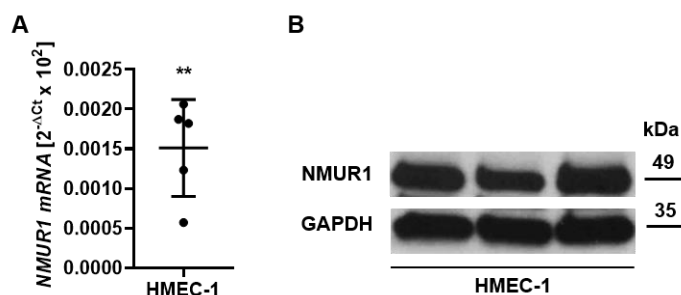


Ryc. 24. Analiza ekspresji *NMU* w komórkach linii HMEC-1. (A) Analiza ekspresji *NMU* w odniesieniu do ekspresji genu referencyjnego GAPDH ($2^{-\Delta Ct}$). Wyniki przedstawiono jako medianę z rozstępem międzykwartylowym (istotność statystyczną różnicy poziomu ekspresji *NMU* od zera oszacowano testem Wilcoxona; $n = 5$). (B) Reprezentatywny obraz analizy obecności *NMU* w komórkach HMEC-1 z wykorzystaniem metody WB (analiza 4 niezależnych lizatów komórkowych).

4.2. Ocena ekspresji *NMURs*

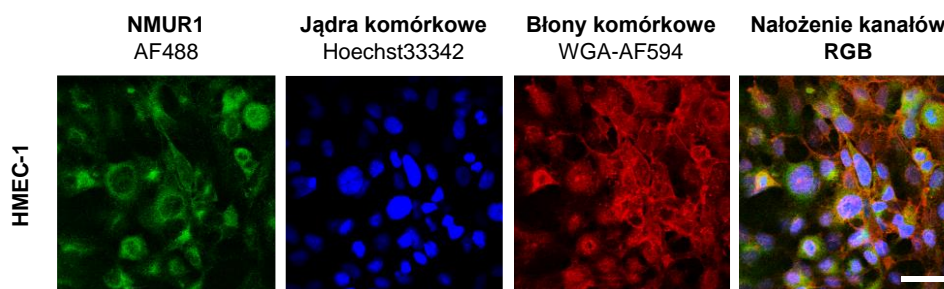
Ekspresję *NMUR1* i *NMUR2* oceniono w komórkach linii HMEC-1 z wykorzystaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Obecność receptora, dla którego wykryto mRNA oceniono następnie z wykorzystaniem metod WB oraz barwienia immunofluorescencyjnego i mikroskopii konfokalnej.

Na podstawie otrzymanych wyników zidentyfikowano ekspresję *NMUR1* w komórkach linii HMEC-1 na poziomie istotnie różnym od zera ($**p \leq 0,01$; Ryc. 25A). Potwierdzono również obecność *NMUR1* w lizatach z badanych komórek (Ryc. 25B). Na podstawie przeprowadzonej analizy nie stwierdzono ekspresji *NMUR2*.



Ryc. 25. Analiza ekspresji *NMUR1* w komórkach HMEC-1. (A) Poziom ekspresji *NMUR1* w odniesieniu do genu referencyjnego *GAPDH* ($2^{-\Delta Ct}$). Wyniki przedstawiono jako wartość średnią z odchyleniem standardowym (istotność statystyczną różnicy poziomu ekspresji *NMUR1* od zera oszacowano testem t-Studenta dla jednej próby; $**p \leq 0,01$; $n = 5$). (B) Reprezentatywny obraz analizy obecności *NMUR1* w komórkach HMEC-1 z wykorzystaniem metody WB (analiza 3 niezależnych lizatów komórkowych).

Obecność *NMUR1* zwizualizowano na powierzchni komórek linii HMEC-1 z wykorzystaniem bawienia immunofluorescencyjnego i mikroskopii konfokalnej (Ryc. 26).

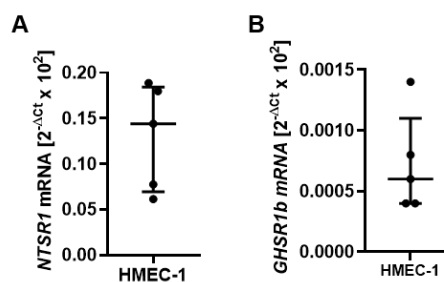


Ryc. 26. Wizualizacja *NMUR1* na powierzchni komórek linii HMEC-1. Do barwienia immunofluorescencyjnego *NMUR1* wykorzystano specyficzne przeciwciała oraz przeciwciała drugorzędowe sprzężone z fluoroforem AF488. Jądra i błony komórkowe zwizualizowano z wykorzystaniem odpowiednio barwnika Hoechst33342 i WGA sprzężonej z AF594. Skala na zdjęciach odpowiada 100 μm .

4.3. Ocena ekspresji *NTSR1* i *GHSR1b*

Ekspresję genów *NTSR1* i *GHSR1b*, których produkty tworzą w postaci dimeru alternatywny receptor dla NMU oceniono w komórkach linii HMEC-1 z wykorzystaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Na podstawie analizy otrzymanych wyników nie stwierdzono ekspresji *NTSR1* i *GHSR1b* na poziomie istotnie różnym od zera w komórkach linii HMEC-1 (Ryc. 27).



Ryc. 27. Analiza ekspresji *NTSR1* i *GHSR1b* w komórkach linii HMEC-1. Poziom ekspresji (A) *NTSR1* i (B) *GHSR1b* odniesiono do genu referencyjnego *GAPDH* ($2^{-\Delta Ct}$). Wyniki przedstawiono jako medianę z rozstępem międzykwartylowym (istotność statystyczną różnicy poziomu ekspresji od zera oszacowano testem Wilcoxon; $n = 5$).

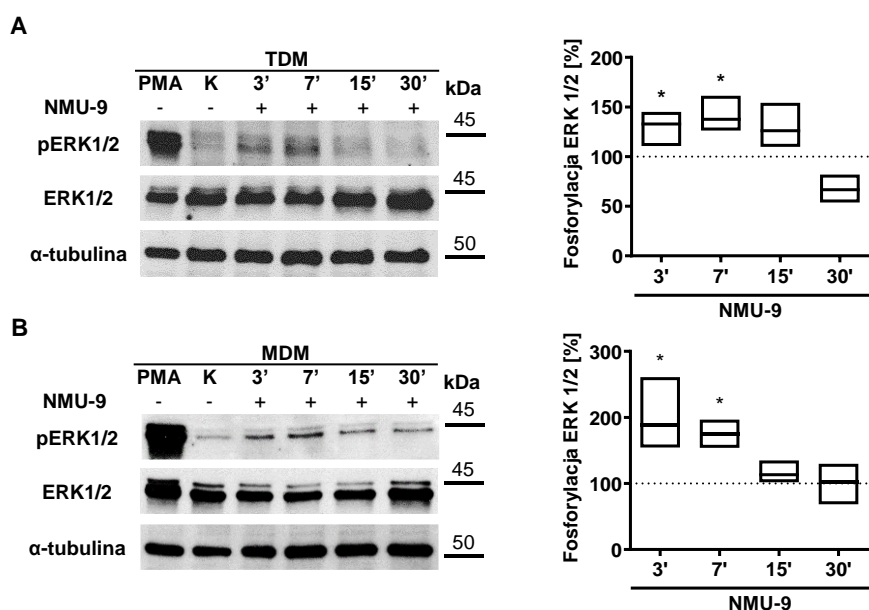
5. Ocena aktywności receptorów dla NMU w makrofagach i komórkach śródbłonna mikronaczyniowego

Charakterystyka makrofagów M0 oraz komórek linii HMEC-1 potwierdziła ekspresję wyłącznie receptora 1 dla NMU. W dalszej części rozprawy doktorskiej zbadano aktywność NMUR1 obecnego na powierzchni komórek modelowych poprzez analizę pobudzenia ścieżki sygnałowej MAPK przez NMU. Wzbudzony sygnał oceniono metodą WB poprzez analizę fosforylacji kinaz ERK 1/2 wywołaną traktowaniem komórek modelowych przez 3, 7, 15 i 30 min NMU-9 lub CM znad hodowli komórek wydzielających NMU (HT29 pcNMU). Za 100% fosforylacji ERK 1/2 uznano komórki nietraktowane NMU-9, ani CM (kontrola negatywna). Kontrolę pozytywną aktywacji ścieżki sygnałowej zależnej od MAPK stanowiły komórki traktowane przez 15 min PMA. W celu oszacowania wpływu innych składników wydzielonych przez komórki HT29 do medium na generowanie sygnału zależnego od kinaz MAPK komórki traktowano CM znad klonów kontrolnych (HT29 pcDNA).

Specyficzność działania NMU na NMUR1 zbadano stosując TDM z wyciszoną ekspresją receptora NMUR1. W tym przypadku porównano intensywność fosforylacji kinaz ERK 1/2 wywołanej NMU-9 w makrofagach z wyciszonym receptorem względem makrofagów z zachowaną ekspresją NMUR1.

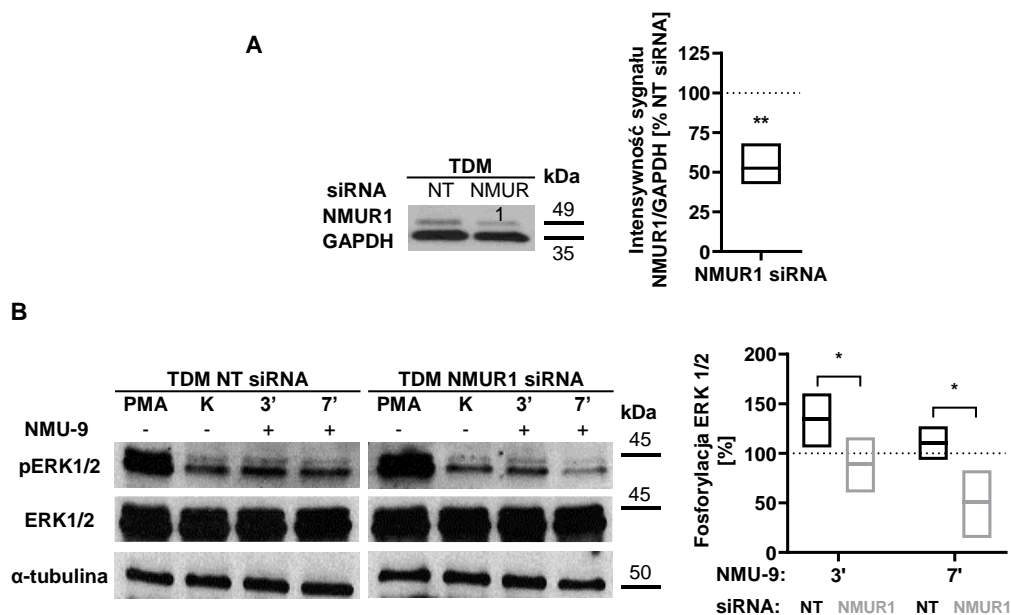
5.1. Fosforylacja kinaz ERK 1/2 w makrofagach pod wpływem NMU-9

Na podstawie analizy wyników otrzymanych po traktowaniu makrofagów NMU-9 stwierdzono aktywację ścieżki sygnałowej zależnej od kinaz MAPK wyrażoną zwiększeniem intensywności sygnału pochodzącego od prążków rozpoznawanych przez przeciwciała specyficzne dla fosforylowanych form ERK 1/2 (Ryc. 28). W wyniku analizy densytometrycznej stwierdzono istotnie podwyższony poziom fosforylacji po 3 oraz 7 min działania NMU-9 na TDM (* $p \leq 0,05$; Ryc. 28A) i MDM (* $p \leq 0,05$; Ryc. 28B) w stosunku do kontroli negatywnej.



Ryc. 28. Analiza poziomu fosforylacji ERK 1/2 w makrofagach (A) TDM oraz (B) MDM wywołanej traktowaniem NMU-9. Reprezentatywny obraz analizy WB oraz analiza densytometryczna intensywności sygnału wykonana w programie ImageJ. Intensywność sygnału pochodzącego od fosforylowanej formy ERK 1/2 przeliczono względem kontroli nałożenia białka (α -tubulina) oraz formy całkowitej kinaz. Wyniki przedstawiono jako procent fosforylacji ERK 1/2 względem kontroli negatywnej (K; 100%, linia przerywana na wykresie) jako wartość średnią z zakresem min-max (istotność statystyczną różnicy pomiędzy intensywnością fosforylacji ERK 1/2 w poszczególnych punktach czasowych traktowania NMU-9 a 100% kontroli negatywnej oszacowano testem t-Studenta dla jednej próby; * $p \leq 0,05$; $n \geq 3$).

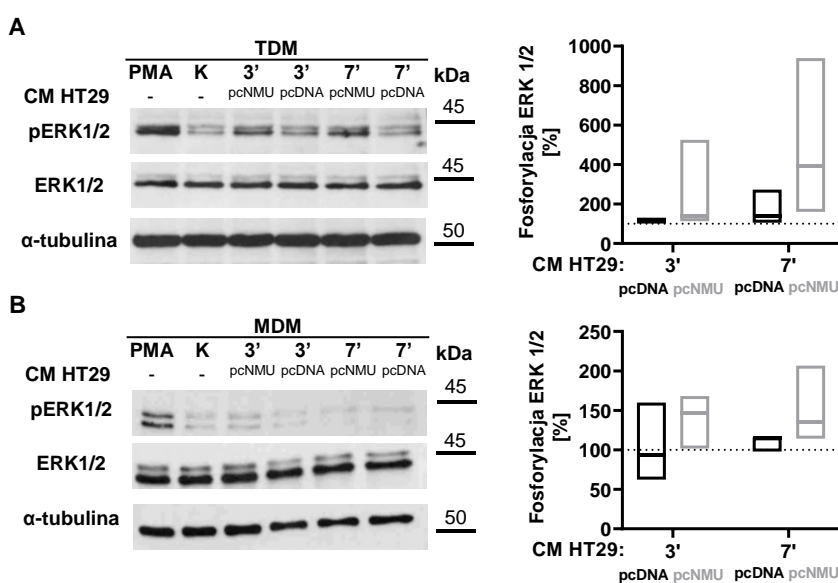
W celu potwierdzenia specyficzności sygnału wzbudzanego przez powstanie kompleksu NMU/NMUR1 wyciszono ekspresję receptora w makrofagach TDM za pomocą siRNA (Ryc. 29A), a następnie przeprowadzono analizę intensywności fosforylacji kinaz ERK 1/2. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że TDM z około 50% obniżeniem poziomu NMUR1 względem komórek kontrolnych (traktowanych NT siRNA; Ryc. 29A) wykazują istotnie niższą intensywność fosforylacji kinaz ERK 1/2 po traktowaniu NMU-9 (* $p \leq 0,05$; Ryc. 29B).



Ryc. 29. Analiza poziomu fosforylacji ERK 1/2 wywołanej NMU-9 w makrofagach TDM po wyciszeniu NMUR1. (A) Porównanie poziomu NMUR1 w komórkach traktowanych NT siRNA oraz NMUR1 siRNA. Reprezentatywny obraz analizy WB oraz analiza densytometryczna intensywności sygnału wykonana w programie ImageJ. Wyniki intensywności prążków pochodzących od NMUR1 znormalizowano względem kontroli nałożenia (GAPDH), przeliczono na procent wyciszenia względem próby traktowanej NT siRNA (100%, przerywana linia na wykresie) i przedstawiono jako wartość średnią z zakresem min-max (istotność statystyczną różnicy poziomu białka w próbce traktowanej NMUR1 siRNA od NT siRNA oszacowano testem t-Studenta; $**p \leq 0,01$; $n = 4$). (B) Ocena różnicy intensywności fosforylacji ERK 1/2 w komórkach traktowanych NT i NMUR1 siRNA. Intensywność sygnału pochodzącego od fosforylowanej formy ERK 1/2 przeliczono względem kontroli nałożenia białka (α -tubuliny) oraz formy całkowitej kinaz. Wyniki przedstawiono jako procent fosforylacji ERK 1/2 względem kontroli negatywnej (K; 100%, linia przerywana na wykresie) jako wartość średnią z zakresem min-max (istotność statystyczną różnicy pomiędzy intensywnością fosforylacji ERK 1/2 w poszczególnych punktach czasowych inkubacji z NMU-9 makrofagów traktowanych NMUR1 siRNA i NT siRNA oszacowano testem t-Studenta; $*p \leq 0,05$; $n = 4$).

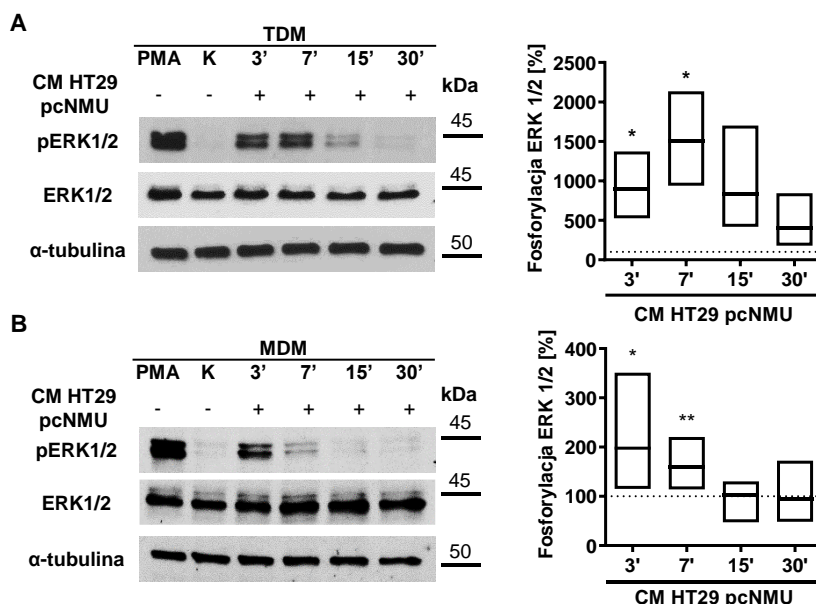
5.2. Analiza fosforylacji kinaz ERK 1/2 w makrofagach po inkubacji z medium pochodzonym z komórek RJG

Wstępne porównanie intensywności fosforylacji kinaz ERK 1/2 wywołanej CM z klonów HT29 niewydzielających (pcDNA) oraz wydzielających NMU (pcNMU) wykonano dla 3 i 7 min eksperymentu, dla których zaobserwowano istotny statystycznie wzrost intensywności fosforylacji kinaz podczas stosowania NMU-9. Na podstawie analizy otrzymanych wyników stwierdzono aktywację ścieżki sygnałowej zależnej od kinaz MAPK wyrażoną zwiększeniem intensywności sygnału pochodzącego od prążków rozpoznawanych przez przeciwciała specyficzne dla fosforylowanych form ERK 1/2 w przypadku obu stosowanych CM. Jednocześnie, w każdym z przeprowadzonych powtórzeń eksperymentu, intensywność fosforylacji kinaz ERK 1/2 wywołanej działaniem CM z klonu pcDNA była niższa niż w próbie traktowanej CM z klonu pcNMU (bez obserwowanej różnicy na poziomie istotnym statystycznie; Ryc. 30).



Ryc. 30. Analiza porównawcza poziomu fosforylacji ERK 1/2 w makrofagach (A) TDM oraz (B) MDM traktowanych CM z klonów niewydzielających (HT29 pcDNA) oraz wydzielających NMU (pcNMU). Reprezentatywny obraz analizy WB oraz analiza densytometryczna intensywności sygnału wykonana w programie ImageJ. Intensywność sygnału pochodzącego od fosforylowanej formy ERK 1/2 przeliczono względem kontroli nałożenia białka (α -tubuliny) oraz formy całkowitej kinaz. Wyniki przedstawiono jako procent fosforylacji ERK 1/2 względem kontroli negatywnej (K; 100%, linia przerywana na wykresie) jako medianę z rozstępem międzykwartylowym (istotność statystyczną różnicy pomiędzy intensywnością fosforylacji ERK 1/2 w poszczególnych punktach czasowych inkubacji z CM z klonów pcNMU w stosunku do CM kontrolnego oszacowano testem Wilcoxon; $n \geq 3$).

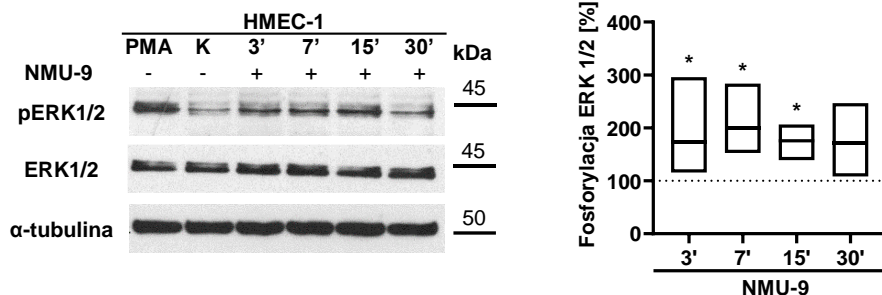
Dodatkowo przeprowadzono analizę zmian intensywności fosforylacji kinaz ERK 1/2 w czasie traktowania makrofagów CM zawierającym NMU. Na podstawie analizy densytometrycznej otrzymanych wyników stwierdzono istotnie podwyższony poziom fosforylacji kinaz ERK1/2 w stosunku do kontroli negatywnej w 3 i 7 min trwania eksperymentu w TDM (* $p \leq 0,05$; Ryc. 31A) i MDM (* $p \leq 0,05$ i ** $p \leq 0,01$; Ryc. 31B).



Ryc. 31. Analiza poziomu fosforylacji ERK 1/2 w makrofagach (A) TDM oraz (B) MDM traktowanych CM znad hodowli komórek wydzielających NMU (HT29 pcNMU). Reprezentatywny obraz analizy WB oraz analiza densytometryczna intensywności sygnału wykonana w programie ImageJ. Intensywność sygnału pochodzącego od fosforylowanej formy ERK 1/2 przeliczono względem kontroli nałożenia białka (α -tubuliny) oraz formy całkowitej kinaz. Wyniki przedstawiono jako procent fosforylacji ERK 1/2 względem kontroli negatywnej (K; 100%, linia przerywana na wykresie) jako wartość średnią z zakresem min-max (istotność statystyczną różnicy pomiędzy intensywnością fosforylacji ERK 1/2 w poszczególnych punktach czasowych traktowania CM a 100% kontroli negatywnej oszacowano testem t-Studenta dla jednej próby; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; $n \geq 4$).

5.3. Ocena fosforylacji kinaz ERK 1/2 w komórkach linii HMEC-1 pod wpływem NMU-9

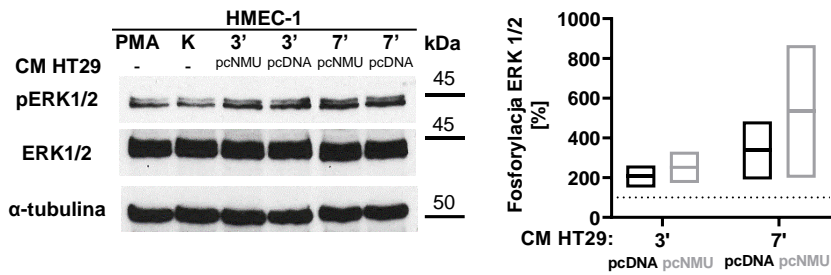
Na podstawie analizy wyników otrzymanych po traktowaniu komórek linii HMEC-1 NMU-9 stwierdzono aktywację ścieżki sygnałowej zależnej od kinaz MAPK wyrażoną zwiększeniem intensywności sygnału pochodzącego od prążków rozpoznawanych przez przeciwciała specyficzne dla fosforylowanych form ERK 1/2 (Ryc. 32). W wyniku analizy densytometrycznej stwierdzono istotnie podwyższony poziom fosforylacji ERK 1/2 po 3, 7 oraz 15 min działania NMU-9 w stosunku do kontroli negatywnej (* $p \leq 0,05$; Ryc. 32).



Ryc. 32. Analiza poziomu fosforylacji ERK 1/2 w komórkach linii HMEC-1 po inkubacji z NMU-9. Reprezentatywny obraz analizy WB oraz analiza densytometryczna intensywności sygnału wykonana w programie ImageJ. Intensywność sygnału pochodzącego od fosforylowanej formy ERK 1/2 przeliczono względem kontroli nałożenia białka (α -tubuliny) oraz formy całkowitej kinaz. Wyniki przedstawiono jako procent fosforylacji ERK 1/2 względem kontroli negatywnej (K; 100%, linia przerywana na wykresie) jako wartość średnią z zakresem min-max (istotność statystyczną różnicy pomiędzy intensywnością fosforylacji ERK 1/2 w poszczególnych punktach czasowych traktowania NMU-9 a 100% kontroli negatywnej oszacowano testem t-Studenta dla jednej próby; * $p \leq 0,05$; $n \geq 4$).

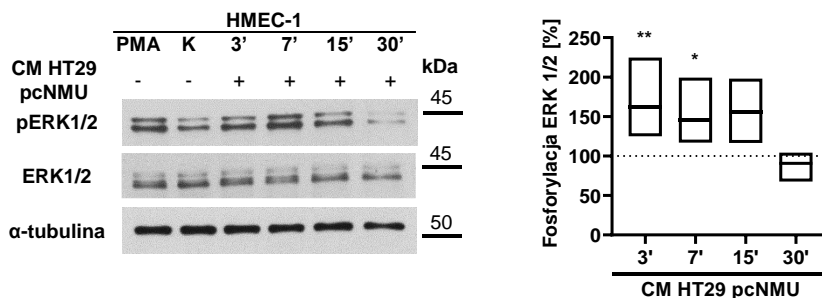
5.4. Analiza fosforylacji kinaz ERK 1/2 w komórkach linii HMEC-1 po inkubacji z medium pochodzącym z komórek RJG

Wstępne porównanie intensywności fosforylacji kinaz ERK 1/2 wywołanej CM z klonów HT29 niewydzielających (pcDNA) oraz wydzielających NMU (pcNMU) wykonano dla 3 i 7 min eksperymentu, dla których zaobserwowano istotny statystycznie wzrost intensywności fosforylacji kinaz podczas stosowania NMU-9. Na podstawie analizy otrzymanych wyników stwierdzono aktywację ścieżki sygnałowej zależnej od kinaz MAPK wyrażoną zwiększeniem intensywności sygnału pochodzącego od prążków rozpoznawanych przez przeciwciała specyficzne dla fosforylowanych form ERK 1/2 w przypadku obu stosowanych CM. Jednocześnie, w każdym z przeprowadzonych powtórzeń eksperymentu, intensywność fosforylacji kinaz ERK 1/2 wywołanej działaniem CM z klonu pcDNA była niższa niż w próbie traktowanej CM z klonu pcNMU (Ryc. 33).



Ryc. 33. Analiza porównawcza poziomu fosforylacji ERK 1/2 w komórkach linii HMEC-1 traktowanych CM znad hodowli klonów niewydzielających (HT29 pcDNA) oraz wydzielających NMU (pcNMU). Reprezentatywny obraz analizy WB oraz analiza densytometryczna intensywności sygnału wykonana w programie ImageJ. Intensywność sygnału pochodzącego od fosforylowanej formy ERK 1/2 przeliczono względem kontroli nałożenia białka (α -tubuliny) oraz formy całkowitej kinaz. Wyniki przedstawiono jako procent fosforylacji ERK 1/2 względem kontroli negatywnej (K; 100%, linia przerywana na wykresie) jako medianę z rozstępem międzykwartyłowym ($n = 2$).

Dodatkowo przeprowadzono analizę zmian intensywności fosforylacji kinaz ERK 1/2 w czasie traktowania komórek linii HMEC-1 CM zawierającym NMU. Na podstawie analizy densytometrycznej otrzymanych wyników stwierdzono istotnie podwyższony poziom fosforylacji kinaz ERK1/2 w stosunku do kontroli negatywnej w 3 i 7 min trwania eksperymentu (odpowiednio $**p \leq 0,01$ i $*p \leq 0,05$; Ryc. 34).



Ryc. 34. Analiza poziomu fosforylacji ERK 1/2 w komórkach linii HMEC-1 traktowanych CM znad hodowli komórek wydzielających NMU (HT29 pcNMU). Reprezentatywny obraz analizy WB oraz analiza densytometryczna intensywności sygnału wykonana w programie ImageJ. Intensywność sygnału pochodzącego od fosforylowanej formy ERK 1/2 przeliczono względem kontroli nałożenia białka (α -tubuliny) oraz formy całkowitej kinaz. Wyniki przedstawiono jako procent fosforylacji ERK 1/2 względem kontroli negatywnej (K; 100%, linia przerywana na wykresie) jako wartość średnią z zakresem min-max (istotność statystyczną różnicy pomiędzy intensywnością fosforylacji ERK 1/2 w poszczególnych punktach czasowych traktowania CM a 100% kontroli oszacowano testem t-Studenta dla jednej próby; $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$; $n \geq 4$).

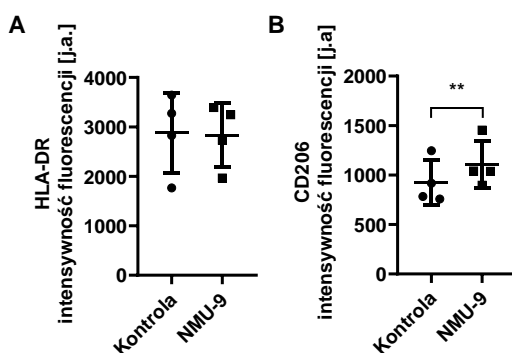
6. Ocena zmian fenotypowych i funkcjonalnych w komórkach mikrośrodowiska pod wpływem NMU

Identyfikacja NMUR1 na powierzchni komórek modelowych makrofagów i śródbłonka mikronaczyniowego oraz potwierdzenie ich aktywności poprzez obserwację aktywacji sygnału zależnego od kinaz MAPK pod wpływem NMU (syntetyzowanej chemicznie NMU-9 oraz NMU wydzielonej do CM przez komórki RJG) potwierdziło możliwość oddziaływania NMU na badane komórki. W kolejnych eksperymentach oceniono wpływ działania NMU na komórki modelowe makrofagów i śródbłonka mikronaczyniowego. W tym zakresie zbadano kluczowe procesy zachodzące w mikrośrodowisku nowotworu, jak zmiany fenotypu makrofagów i komórek śródbłonka mikronaczyniowego oraz wpływ na ich funkcje, w tym wydzielanie cytokin, chemotaksję, migrację czy angiogenezę.

6.1. Ocena zmian fenotypowych w makrofagach wywołanych działaniem NMU

Zmiany fenotypu makrofagów MDM traktowanych NMU-9 badano poprzez ocenę obecności powierzchniowych białek markerowych (HLA-DR dla fenotypu M1 i CD206 dla fenotypu M2) z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał oraz cytometrii przepływowej.

Na podstawie analizy otrzymanych wyników nie stwierdzono różnic w intensywności fluorescencji pochodzącej od markera HLA-DR (Ryc. 35A). Intensywność fluorescencji pochodząca od białka markerowego CD206 była istotnie wyższa po traktowaniu makrofagów NMU-9 w porównaniu do komórek nietraktowanych (** $p \leq 0,01$; Ryc. 35B).

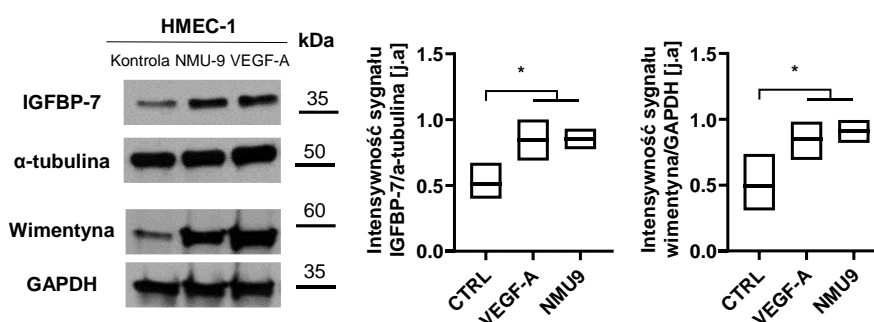


Ryc. 35. Analiza cytometryczna ekspresji markerów polaryzacji makrofagów. Zmiany intensywności fluorescencji (j.a.) pochodzącej od białka markerowego (A) HLA-DR lub (B) CD206 oceniono w MDM traktowanych NMU-9 lub nietraktowanych (Kontrola). Wyniki przedstawiono jako wartość średnią z odchyleniem standardowym (istotność statystyczną różnicy intensywności fluorescencji poszczególnych białek markerowych w MDM traktowanych NMU-9 w stosunku do kontroli oszacowano sparowanym testem t-Studenta; ** $p \leq 0,01$; $n = 4$).

6.2. Ocena wpływu NMU na ekspresję markerów śródbłonka nowotworowego

Obecność białek uznawanych za markery śródbłonka mikronaczyń obecnych w mikrośrodowisku RJG (IGFBP-7 i wimentyny) oceniono metodą WB w komórkach linii HMEC-1 traktowanych NMU-9 i VEGF-A (jako kontrola pozytywna).

Na podstawie analizy otrzymanych wyników stwierdzono spodziewany, istotnie wyższy poziom obu badanych markerów w komórkach traktowanych VEGF-A w stosunku do komórek nietraktowanych ($*p \leq 0,05$; Ryc. 36). Wzrost poziomu IGFBP-7 i wimentyny zaobserwowano również w wyniku inkubacji komórek linii HMEC-1 z NMU-9 ($*p \leq 0,05$; Ryc. 36).



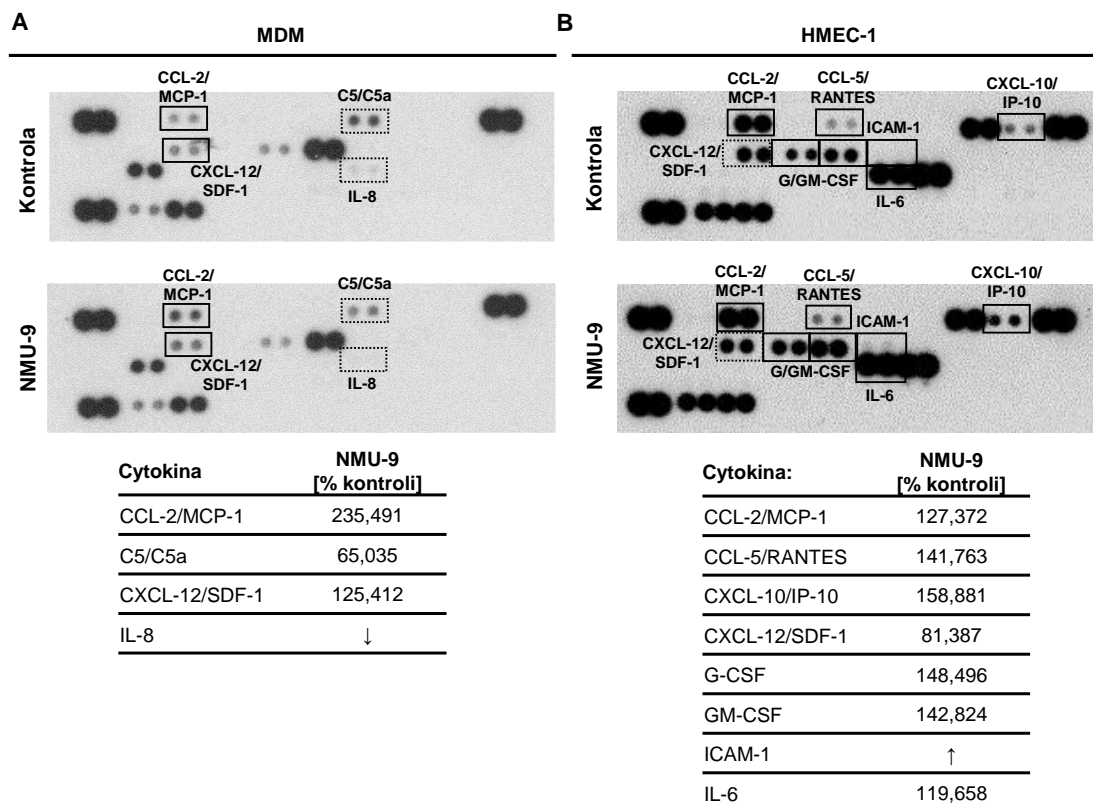
Ryc. 36. Analiza obecności markerów śródbłonka mikronaczyń nowotworowych RJG (IGFBP-7 oraz wimentyny) w komórkach HMEC-1 traktowanych VEGF-A (kontrola pozytywna) oraz NMU-9. Reprezentatywny obraz analizy WB oraz analiza densytometryczna intensywności sygnału wykonana w programie ImageJ. Wyniki intensywności prążków pochodzących od IGFBP-7 oraz wimentyny znormalizowano względem kontroli nałożenia (odpowiednio α -tubuliny i GAPDH) i przedstawiono w jednostkach arbitralnych (j.a.) jako wartość średnią z zakresem min-max (istotność statystyczną różnicy pomiędzy intensywnością sygnału pochodzącego od badanych markerów w komórkach traktowanych VEGF-A lub NMU-9 względem komórek nietraktowanych oszacowano testem ANOVA z testem post-hoc; $*p \leq 0,05$; $n \geq 3$).

6.3. Analiza wpływu NMU na profil cytokin wydzielanych przez makrofagi i komórki śródbłonka mikronaczińowego

Zmiany profilu cytokin wydzielanych przez makrofagi MDM oraz komórki linii HMEC-1 traktowane przez 24 godz. NMU-9 w stosunku do kontrolnych komórek nietraktowanych oceniono z wykorzystaniem testu Proteome Profiler Human Cytokine Array.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono zmiany w wydzielaniu cytokin przez oba rodzaje badanych komórek traktowanych NMU-9 w stosunku do nietraktowanych komórek kontrolnych. W przypadku MDM po 24 godz. inkubacji z NMU-9 zaobserwowano zwiększony poziom wydzielania cytokin CCL-2 i CXCL-12 oraz zmniejszony poziom wydzielania C5/C5a i IL-8 w stosunku do kontroli (Ryc. 37A). Komórki linii HMEC-1 po 24 godz. inkubacji z NMU-9 wykazywały podwyższony poziom wydzielania cytokin:

CCL-2, CCL-5, CXCL-10, G-CSF i GM-CSF, ICAM-1 oraz IL-6 w stosunku do komórek kontrolnych (Ryc. 37B).

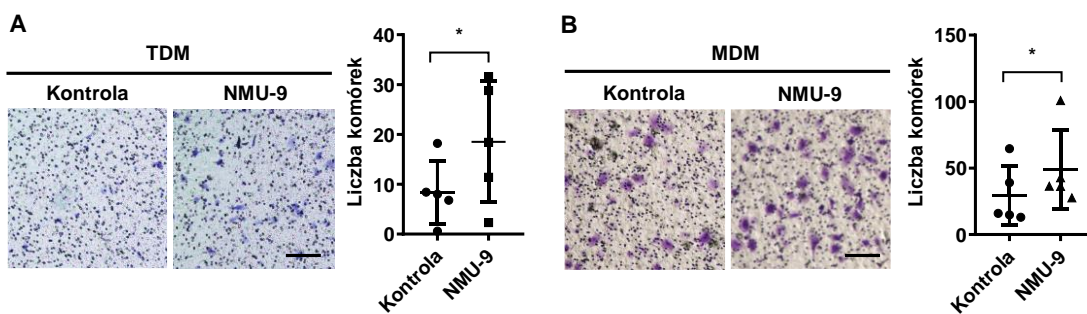


Ryc. 37. Zmiany profilu cytokin wydzielanych przez (A) makrofagi MDM i (B) komórki HMEC-1 traktowane NMU-9. Reprezentatywny obraz membran oraz analiza densytometryczna intensywności sygnału pochodzącego od cytokin wykonana w programie ImageJ (n = 1). Tendencję spadkową oraz wzrostową zmian intensywności wydzielania cytokin przez komórki traktowane NMU-9 w stosunku do komórek kontrolnych oznaczono na obrazach odpowiednio linią przerywaną oraz ciągłą. Wyniki analizy densytometrycznej przedstawiono w tabeli jako procent intensywności sygnału pochodzącego od cytokin wydzielonych po działaniu NMU-9 w odniesieniu do kontroli (100%; oznaczeniami ↓ lub ↑ wskazano cytokiny, dla których sygnał wykryto odpowiednio wyłącznie w medium znad komórek kontrolnych lub traktowanych NMU-9).

6.4. Ocena chemotaktycznego działania NMU na makrofagi

Chemotaktyczne działanie NMU na makrofagi oceniono z wykorzystaniem wkładów z półprzepuszczalną membraną z porami o średnicy 5 μm. Makrofagi migrujące zgodnie z gradientem stężeń NMU-9 barwiono na zewnętrznej stronie membrany 0,5% roztworem fioletu krystalicznego i liczone, a następnie porównano z liczbą komórek migrujących w kontrolnym układzie bez dodatku NMU-9.

Na podstawie analizy otrzymanych wyników, niezależnie od pochodzenia wykorzystanego modelu makrofagów, stwierdzono istotnie większą liczbę komórek migrujących w kierunku rosnącego stężenia NMU-9 wybarwionych na zewnętrznej stronie membrany w stosunku do próby kontrolnej (*p ≤ 0,05; Ryc. 38).

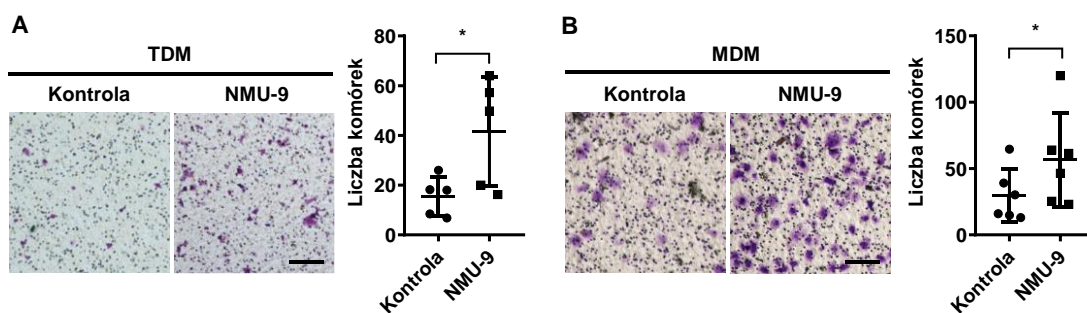


Ryc. 38. Analiza działania chemotaktycznego NMU na makrofagi (A) TDM oraz (B) MDM. Poglądowe obrazy przedstawiają makrofagi migrujące zgodnie z gradientem stężeń NMU-9 oraz bez dodatku NMU-9 (Kontrola), wybarwione 0,5% roztworem fioletu krystalicznego na zewnętrznej stronie membrany poliwęglanowej. Skala na zdjęciach odpowiada 100 μm . Na wykresach przedstawiono liczbę migrujących komórek. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią z odchyleniem standardowym (istotność statystyczną różnicy pomiędzy liczbą komórek migrujących w kierunku NMU-9 oraz w układzie bez dodatku NMU-9 oszacowano sparowanym testem t-Studenta; $*p \leq 0,05$; $n = 5$).

6.5. Ocena wpływu NMU na zdolności migracyjne makrofagów

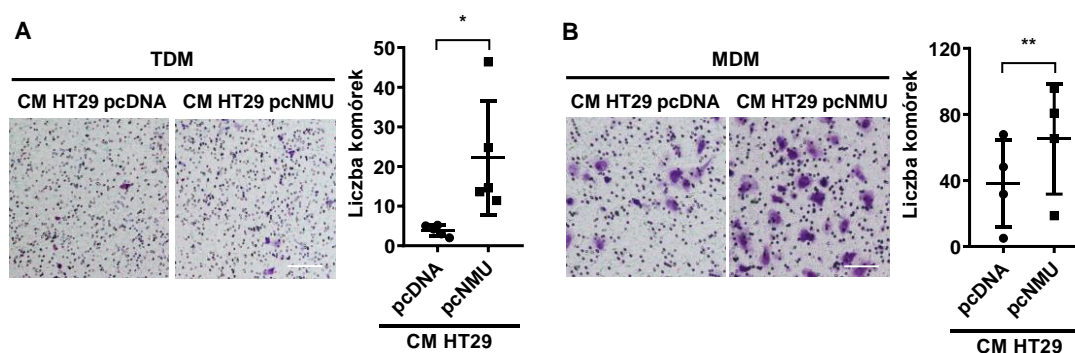
Zmianę tempa migracji makrofagów traktowanych przez 3,5 godz. NMU-9 lub CM znad hodowli HT29 pcDNA i pcNMU oceniono z wykorzystaniem wkładów z półprzepuszczalną membraną z porami o średnicy 5 μm . Tempo migracji komórek oceniono na podstawie liczby komórek wybarwionych 0,5% roztworem fioletu krystalicznego na zewnętrznej stronie membrany.

Na podstawie analizy otrzymanych wyników, niezależnie od pochodzenia wykorzystanego modelu makrofagów, po traktowaniu NMU-9 stwierdzono istotnie wyższą liczbę migrujących komórek w stosunku do próby kontrolnej ($*p \leq 0,05$; Ryc. 39).



Ryc. 39. Analiza wpływu NMU-9 na zdolności migracyjne makrofagów (A) TDM oraz (B) MDM. Poglądowe obrazy przedstawiają makrofagi nietraktowane (Kontrola) oraz traktowane NMU-9, wybarwione 0,5% roztworem fioletu krystalicznego na zewnętrznej stronie membrany poliwęglanowej. Skala na zdjęciach odpowiada 100 μm . Na wykresach przedstawiono liczbę migrujących komórek. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią z odchyleniem standardowym (istotność statystyczną różnicy pomiędzy liczbą migrujących komórek traktowanych NMU-9 a kontrolą oszacowano sparowanym testem t-Studenta; $*p \leq 0,05$; $n = 6$).

Podobny efekt zwiększenia tempa migracji zaobserwowano w przypadku działania NMU pochodzenia nowotworowego. Na podstawie analizy wyników otrzymanych po traktowaniu makrofagów CM znad hodowli komórek HT29 wydzielających NMU (pcNMU) zaobserwowano istotnie wyższą liczbę makrofagów wybarwionych na zewnętrznej stronie membrany w stosunku do medium znad hodowli komórek klonu kontrolnego (HT29 pcDNA) (* $p \leq 0,05$ dla TDM i ** $p \leq 0,01$ dla MDM; Ryc. 40A i B).

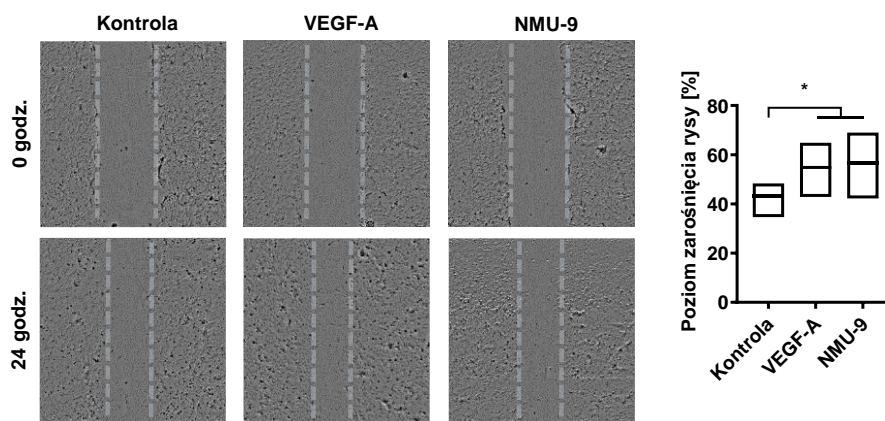


Ryc. 40. Analiza wpływu NMU pochodzenia nowotworowego na zdolności migracyjne makrofagów (A) TDM oraz (B) MDM. Poglądowe obrazy przedstawiają makrofagi traktowane medium kontrolnym (CM HT29 pcDNA) oraz zawierającym wydzieloną NMU (CM HT29 pcNMU), wybarwione 0,5% roztworem fioletu krystalicznego na zewnętrznej stronie membrany poliwęglanowej. Skala na zdjęciach odpowiada 100 μm . Na wykresach przedstawiono liczbę migrujących komórek. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią z odchyleniem standardowym (istotność statystyczną różnicy pomiędzy liczbą migrujących komórek traktowanych medium zawierającym NMU a kontrolnym oszacowano sparowanym testem t-Studenta; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; $n = 4$).

6.6. Ocena wpływu NMU na zdolności migracyjne komórek linii HMEC-1

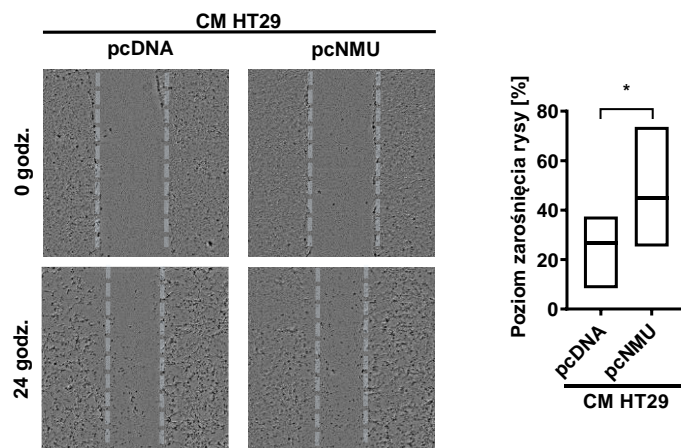
Zmiany tempa migracji komórek linii HMEC-1 pod wpływem NMU oceniono metodą zarastania rysy. Rysę wykonano na monowarstwie komórek traktowanych VEGF-A (kontrola pozytywna), NMU-9 lub CM znad klonów HT29 (pcDNA i pcNMU). Postęp zarastania rysy dokumentowano przyżyciowo w komorze do hodowli komórkowych co 2 godz. rozpoczynając bezpośrednio po wykonaniu rysy przez kolejne 24 godz. Spodziewaną, istotną statystycznie stymulację migracji komórek HMEC-1 z kontroli pozytywnej (traktowanych VEGF-A) w stosunku do komórek nietraktowanych stwierdzono po upływie 24 godz. eksperymentu (* $p \leq 0,05$; Ryc. 41). Stopień zarastania rysy w pozostałych próbach (traktowanych NMU-9 lub CM) oceniono poprzez porównanie pola powierzchni rysy w tych samych punktach czasowych.

Na podstawie analizy danych otrzymanych w wyniku 24-godz. traktowania komórek linii HMEC-1 NMU-9 stwierdzono istotnie większą powierzchnię zajęcia rysy w stosunku do komórek nietraktowanych (* $p \leq 0,05$; Ryc. 41).



Ryc. 41. Intensywność migracji komórek linii HMEC-1 nietraktowanych (Kontrola), traktowanych VEGF-A lub NMU-9 mierzona bezpośrednio po wykonaniu rysy (0 godz.) oraz po 24 godz. trwania eksperymentu. Reprezentatywne obrazy przedstawiają migrujące komórki HEMC-1 zarastające rysę. Na wykresie przedstawiono wyniki analizy intensywności zajmowania rysy przez komórki. Powierzchnię rysy zajęłą przez komórki po zakończeniu eksperymentu przeliczono jako procent początkowej powierzchni i przedstawiono jako wartość średnią z zakresem min-max (istotność statystyczną różnic pomiędzy stopniem zarośnięcia rysy w próbie z VEGF-A lub NMU-9 w stosunku do próby kontrolnej oszacowano z wykorzystaniem testu ANOVA dla powtórzonych pomiarów z testem post-hoc; * $p \leq 0,05$; $n = 4$).

Na podstawie analizy wyników otrzymanych po traktowaniu komórek linii HMEC-1 CM zawierającym wydzieloną NMU (znad hodowli klonu HT29 pcNMU) przez 24 godz. stwierdzono istotnie większą powierzchnię zarastania rysy w stosunku do CM kontrolnego (znad hodowli klonu pcDNA; * $p \leq 0,05$; Ryc. 42).

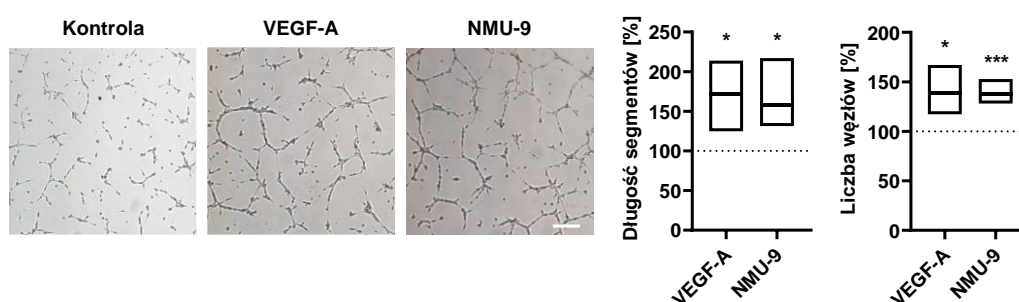


Ryc. 42. Intensywność migracji komórek linii HMEC-1 traktowanych CM kontrolnym (CM HT29 pcDNA) lub zawierającym NMU (CM HT29 pcNMU) mierzona bezpośrednio po wykonaniu rysy (0 godz.) oraz po 24 godz. trwania eksperymentu. Reprezentatywne obrazy przedstawiają migrujące komórki HEMC-1 zarastające rysę. Na wykresie przedstawiono wyniki analizy intensywności zajmowania rysy przez komórki. Powierzchnię rysy zajęłą przez komórki po zakończeniu eksperymentu przeliczono jako procent początkowej powierzchni i przedstawiono jako wartość średnią z zakresem min-max (istotność statystyczną różnic pomiędzy stopniem zarośnięcia rysy w próbie traktowanej CM zawierającym NMU w stosunku do CM kontrolnego oszacowano z wykorzystaniem sparowanego testu t-Studenta; * $p \leq 0,05$; $n = 7$).

6.7. Ocena wpływu NMU na zdolność tworzenia struktur pseudokapilarnych przez komórki HMEC-1

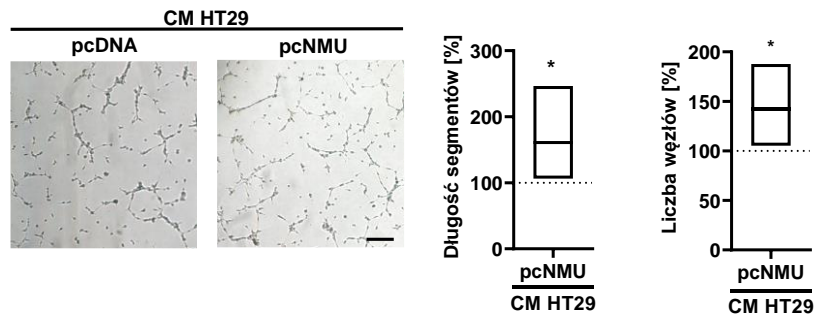
W celu oceny wpływu NMU na właściwości proangiogenne komórek śródbłonka mikronaczyniowego zbadano proces tworzenia pseudokapilar z wykorzystaniem trójwymiarowego podłoża Matrigel. Wysiane na Matrigel komórki linii HMEC-1 traktowano przez 6 godz. VEGF-A (kontrola pozytywna), NMU-9 lub CM znad klonów HT29 (pcDNA i pcNMU). Wyniki dokumentowano z wykorzystaniem mikroskopii świetlnej (Ryc. 43 i 44). Ocenę procesu tworzenia pseudokapilar przeprowadzono zgodnie z szeroko stosowanym podejściem wykorzystującym oprogramowanie Image J i narzędzie „Angiogenesis analyzer” automatycznie wykonujące pomiar ilości połączeń tworzonych przez grupę węzłów i stanowiących struktury rozgałęzione oraz długości segmentów tworzących strukturę zamkniętą z obu stron połączeniami. Otrzymane wyniki przeliczono uznając komórki nietraktowane jako próbę odniesienia przyjętą za 100%.

Na podstawie analizy wyników otrzymanych po traktowaniu komórek linii HMEC-1 czynnikiem stymulującym angiogenezę (VEGF-A) przez 6 godz. zaobserwowano spodziewaną, istotnie większą liczbę zgrupowanych węzłów oraz długość segmentów w stosunku do komórek nietraktowanych ($*p \leq 0,05$; Ryc. 43). Podobny efekt stymulacji tworzenia struktur pseudokapilarnych w postaci istotnie wyższej długości segmentów oraz liczby zgrupowanych węzłów (odpowiednio $*p \leq 0,05$ i $***p \leq 0,001$; Ryc. 43) zaobserwowano w wyniku inkubacji komórek HMEC-1 z NMU-9 w stosunku do komórek nietraktowanych.



Ryc. 43. Tworzenie struktur pseudokapilarnych przez komórki HMEC-1 po 6 godz. trwania eksperymentu. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiają komórki inkubowane z medium bez dodatków (Kontrola) lub zawierającym VEGF-A lub NMU-9. Skala na zdjęciach odpowiada 100 μ m. Intensywność procesu oceniono na podstawie analizy długości segmentów oraz liczby węzłów tworzonych przez badane komórki. Otrzymane wyniki przeliczono względem próby kontrolnej (100%, przerywana linia na wykresie). Wyniki przedstawiono jako wartość średnią z zakresem min-max (istotność statystyczną różnic pomiędzy wyznaczonymi parametrami od 100% kontroli oszacowano z wykorzystaniem testu t-Studenta dla jednej próby; $*p \leq 0,05$; $***p \leq 0,001$; $n \geq 4$).

Na podstawie analizy wyników otrzymanych po inkubacji komórek linii HMEC-1 z CM znad komórek wydzielających NMU (HT29 pcNMU) zaobserwowano istotnie większą długość segmentów oraz liczbę tworzonych węzłów (* $p \leq 0,05$; Ryc. 44) w stosunku do komórek traktowanych CM znad klonu kontrolnego (HT29 pcDNA).



Ryc. 44. Tworzenie struktur pseudokapilarnych przez komórki HMEC-1 po 6 godz. trwania eksperymentu. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiają komórki inkubowane z CM znad komórek kontrolnych (HT29 pcDNA) oraz wydzielających NMU (HT29 pcNMU). Skala na zdjęciach odpowiada 100 μm . Intensywność procesu oceniono na podstawie analizy długości segmentów oraz liczby węzłów tworzonych przez badane komórki. Długość segmentów oraz liczbę węzłów tworzonych przez komórki traktowane CM znad klonu pcNMU przeliczono względem efektu wywołanego działaniem klonu pcDNA (100%, przerywana linia na wykresie). Wyniki przedstawiono jako wartość średnią z zakresem min-max (istotność statystyczną różnic pomiędzy wyznaczonymi parametrami od 100% kontroli oszacowano z wykorzystaniem testu t-Studenta dla jednej próby; * $p \leq 0,05$; $n = 6$).

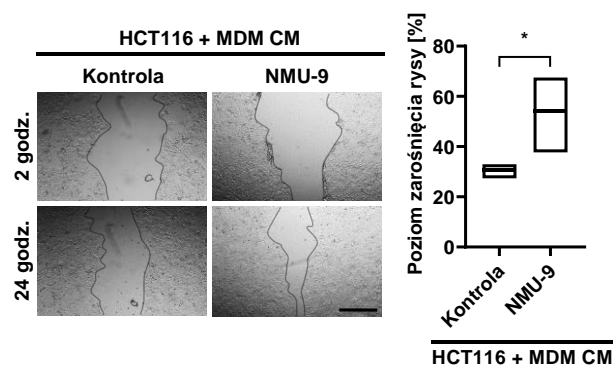
7. Udział NMU w oddziaływaniach składników mikrośrodowiska nowotworu

Mikrośrodowisko nowotworu stanowi złożoną sieć wzajemnie oddziałujących na siebie składników, w której komórki nowotworowe nie są jedynym elementem promującym rozwój guza. Wiedząc, że czynniki wydzielane przez komórki obecne w mikrośrodowisku mogą indukować zmiany funkcjonalne komórek nowotworowych, w kolejnej części pracy zbadano wpływ NMU potencjalnie obecnej w niszy nowotworu na wzajemne interakcje makrofagów i komórek nowotworowych. W tym zakresie oceniono wpływ czynników wydzielanych przez makrofagi traktowane NMU na zdolności migracyjne komórek RJG.

7.1. Ocena zdolności migracyjnych komórek RJG w obecności czynników wydzielanych przez komórki mikrośrodowiska guza pod wpływem NMU

Zdolności migracyjne komórek RJG w obecności czynników wydzielanych przez makrofagi pod wpływem NMU oceniono metodą zarastania rysy z wykorzystaniem komórek HCT116 oraz medium kondycjonowanego z nad MDM traktowanych NMU-9. Postęp zarastania rysy dokumentowano z wykorzystaniem mikroskopii świetlnej po 2 oraz 24 godz. po wykonaniu rysy (Ryc. 45). Stopień zarastania rysy oceniono poprzez porównanie szerokości rysy (mierzonej w 5 losowych miejscach) po zakończeniu eksperymentu odniesiony do punktu jego rozpoczęcia.

Na podstawie analizy otrzymanych wyników stwierdzono istotną statystycznie stymulację migracji komórek linii HCT116 po CM z nad MDM traktowanych NMU-9 w stosunku do próby kontrolnej (CM z nad nietraktowanych MDM; * $p \leq 0,05$; Ryc. 45).



Ryc. 45. Wpływ czynników wydzielanych przez MDM traktowane NMU-9 na zdolności migracyjne komórek linii RJG. Reprezentatywne obrazy przedstawiają migrujące komórki HCT116 inkubowane z kondycjonowanym medium z nad MDM traktowanych NMU-9 (CM MDM NMU-9) oraz nietraktowanych (CM MDM Kontrola) w 2 oraz 24 godz. po wykonaniu rysy. Na wykresie przedstawiono wyniki analizy intensywności zajmowania rysy przez komórki. Szerokość rysy zajmowanej przez komórki po zakończeniu eksperymentu przeliczono jako procent początkowej szerokości i przedstawiono jako wartość średnią z zakresem min-max (istotność statystyczną różnic pomiędzy szerokością zarośnięcia rysy w próbie z CM z nad MDM NMU-9 do próby kontrolnej oszacowano z wykorzystaniem sparowanego testu t-Studenta; * $p \leq 0,05$; $n = 4$).

Dyskusja

Rak jelita grubego jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów zarówno w Polsce, jak i na świecie. Według statystyk prowadzonych przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (IARC, ang. *International Agency for Research on Cancer*) w 2020 roku na świecie odnotowano 1,9 miliona przypadków, w tym 935 000 zgonów z powodu zachorowania na RJG. Trudności w leczeniu RJG wynikają przede wszystkim z braku efektywnych metod diagnostycznych, które pozwoliłyby na wczesne zidentyfikowanie zmian nowotworowych w obrębie jelita grubego. Dodatkowo, nowotwory tego rodzaju są często diagnozowane w momencie, kiedy u pacjenta doszło do rozwoju przerzutów, co znacząco obniża prawdopodobieństwo skutecznej terapii [9]. Utrudnienia w walce z RJG wynikają również z wysokiego zróżnicowania mechanizmów powstawania i rozwoju nowotworu oraz cech molekularnych i fenotypowych komórek nowotworowych [9]. Powyższe statystyki dowodzą, że, pomimo wielu lat badań RJG, poszukiwanie czynników, które stanowiłyby markery rokowania, ułatwiły decyzję o wprowadzanej terapii lub same w sobie stanowiły cele terapeutyczne, nadal pozostaje ważnym zagadnieniem badawczym. Ważne jest jednak w tym przypadku, aby nie ograniczać badań do samych komórek nowotworowych, a zastosować szersze podejście obejmujące całościowo mikrośrodowisko nowotworu i oddziaływania w nim zachodzące [11]. Prowadzone obecnie coraz częściej badania wskazują na zdolność komórek nowotworowych do modyfikacji własnego mikrośrodowiska tak, aby sprzyjało rozwojowi i rozprzestrzenianiu nowotworu [11]. Szczególnie ciekawe wydaje się być w tym przypadku oddziaływanie zaobserwowane w raku piersi, w którym komórki nowotworowe wraz z makrofagami oraz komórkami śródbłonna naczyń stanowią mikrośrodowisko sprzyjające przerzutom nowotworowym (TMEM). W tym przypadku zwiększenie zagęszczenia obszarów TMEM w nowotworze wiązało się z częstszymi przerzutami. Co więcej, wykazano, że makrofagi obecne w TMEM stymulują właściwości migracyjne oraz inwazyjne komórek nowotworowych [26]. Podobna zależność polegająca na jednoczesnej większej ilości makrofagów w TME i zwiększeniem zagęszczenia sieci mikronaczyń nowotworowych została zaobserwowana w RJG i skorelowana z wyższym stopniem zaawansowania nowotworu [7]. Biorąc pod uwagę duże znaczenie przerzutowania RJG w pogorszeniu rokowania, zasadne jest badanie czynników i mechanizmów mogących przyczyniać się do tego zjawiska.

Neuromedyna U jest znanym białkiem wydzielniczym związanym z rozwojem licznych nowotworów. W badaniach *in vitro* znaczenie NMU w procesie nowotworzenia zależy od

rodzaju badanego nowotworu, a najczęściej opisywane efekty wiążą się ze zwiększeniem zdolności komórek nowotworowych do proliferacji, adhezji, migracji i inwazji, co ma miejsce m.in. w raku płuc [38], piersi [43, 45, 46] czy endometrium [44, 47]. Dodatkowo, w przypadku komórek raka piersi z podwyższoną ekspresją *NMU* zaobserwowano wyższą ekspresję markerów charakterystycznych dla EMT [45, 46]. W odniesieniu do obserwacji klinicznych, podwyższona ekspresja *NMU* uznawana jest najczęściej za marker prognostyczny gorszego rokowania. W przypadku raka tarczycy wiąże się z krótszym okresem przeżycia bez wystąpienia nawrotów [68], zaś w nowotworach piersi i płuc z opornością na leczenie chemioterapeutyczne [43, 69]. Potencjalne znaczenie *NMU* wykazano również w RJG. Na podstawie analizy transkryptomicznej stwierdzono podwyższoną ekspresję *NMU* w komórkach linii HT29, które nabyły fenotyp mezenchymalny na skutek nadekspresji czynnika transkrypcyjnego Snail [48]. Dodatkowo, na podstawie analiz bioinformatycznych profilu ekspresji genów w tkankach RJG, wykorzystujących dane z bazy TCGA, wskazano *NMU* jako jeden z genów o podwyższonej ekspresji w tym nowotworze [49, 50, 51, 52].

Próby zastosowania oceny ekspresji *NMU* oraz jej receptorów do prognozowania rokowań u pacjentów z różnymi nowotworami oraz doniesienia o potencjalnym znaczeniu tego białka w progresji RJG stały się podstawą do opracowania niniejszej pracy doktorskiej. Badania dotyczące znaczenia *NMU* w niszy nowotworowej wpisują się w trend poszukiwania czynników, które wydzielane przez komórki nowotworowe, promują pronowotworowe mechanizmy mikrośrodowiska guza.

Weryfikując hipotetyczny wpływ *NMU* na makrofagi i komórki śródbłonna zastosowano dostępną komercyjnie, chemicznie syntetyzowaną *NMU*-9. Sekwencja zastosowanego peptydu odpowiada *NMU*-9 pochodzącej z myszy lub kawii domowej oraz 9 ostatnim aminokwasom ludzkiej *NMU* i posiada grupę amidową w C-końcowym fragmencie niezbędną do uzyskania aktywności biologicznej. Jak wykazały wcześniejsze badania, biologicznie aktywne formy *NMU* pochodzące z różnych gatunków ssaków wykazują porównywalne powinowactwo względem ludzkich receptorów *NMURs* [29]. Powyższa funkcjonalność może mieć związek z wysoką konserwatywnością sekwencji aminokwasowej *NMU* pomiędzy organizmami ssaków i umożliwia zastosowanie *NMU*-9 w badaniach prowadzonych w ramach niniejszej pracy. Układ badawczy z wprowadzoną chemicznie syntetyzowaną *NMU* pozwolił na zbadanie jej bezpośredniego wpływu na komórki potencjalnie obecne w mikrośrodowisku nowotworu. Niemniej jednak, nie odzwierciedla on rzeczywistych warunków, jakie powstają w niszy nowotworowej

w wyniku interakcji różnego rodzaju komórek oraz w wyniku zmian wydzielania aktywnych biologicznie czynników, w tym np. cytokin. W celu zbadania działania NMU w warunkach *in vitro* odwzorowujących charakter mikrośrodowiska nowotworu wykorzystano komórki RJG wydzielające badane białko. W warunkach zastosowanych w niniejszej pracy, najlepszym modelem stały się komórki linii RJG transfekowane wektorem ekspresyjnym zawierającym sekwencję kodującą NMU. Jako komórki kontrolne zastosowano komórki wywodzące się z tej samej linii transfekowane wektorem pcDNA. Stabilny układ z określonym, wysokim poziomem ekspresji i wydzielania NMU wydaje się bardziej odpowiedni i specyficzny w przypadku badań nad parakrynnym działaniem NMU niż zastosowanie dwóch lub kilku linii RJG z różnym poziomem ekspresji i wydzielania NMU, ale dodatkowo odmiennych pod względem cech molekularnych i fenotypowych oraz składników sekretomu.

W ramach badań wstępnych do niniejszej pracy potwierdzono ekspresję NMU na zróżnicowanym poziomie w panelu 6 linii komórkowych wywodzących się z RJG o różnym podtypie molekularnym [60], o fenotypie od nabłonkowego po silnie mezenchymalny [59]. Dodatkowo zaobserwowano brak ekspresji *NMU* i obecności białka w komórkach prawidłowego nabłonka jelita grubego. Obserwowana różnica pomiędzy ekspresją badanego białka w komórkach prawidłowych oraz nowotworowych wskazuje na związek NMU z rozwojem RJG. Dodatkowo, podwyższona ekspresja *NMU* w komórkach linii RJG o fenotypie wyłącznie mezenchymalnym może świadczyć o znaczeniu badanego białka w procesie EMT. Zależność ta została zaobserwowana wcześniej w nowotworze piersi [45, 46].

Na podstawie wyników otrzymanych w części wstępnej niniejszej pracy, do wyprowadzenia klonów ze stabilną nadekspresją NMU, wybrano komórki linii HT29 o niskiej ekspresji *NMU*, w których nie zidentyfikowano białka wewnątrzkomórkowego i wydzielonego. Ostatnio opublikowane badania dotyczące roli NMU w RJG potwierdziły jej pronowotworowe działanie w warunkach *in vitro*. NMU oddziaływała na komórki nowotworowe głównie poprzez receptor NMUR2, obecny również w linii HT29 wykorzystanej w niniejszej pracy. Otrzymane wyniki dowiodły obecności aktywnych receptorów dla NMU w komórkach linii RJG, a podwyższoną ekspresję NMU skorelowano ze wzrostem ekspresji podjednostek integrynowych związanych z metastazą oraz zwiększeniem zdolności migracyjnych i inwazyjnych komórek RJG [52]. Potwierdzona aktywność NMU/NMUR2 w RJG przejawiająca się zmianą fenotypu oraz funkcji komórek nowotworowych była powodem do rozszerzenia badań charakteryzujących NMU

w kontekście oddziaływania komórek nowotworowych z ich mikrośrodowiskiem. Ciekawym aspektem stało się określenie zmian w profilu wydzielanych cytokin. Jak wykazano w niniejszej pracy, nadekspresja NMU w klonach linii HT29 wiązała się ze zwiększoną intensywnością wydzielania: CCL-5, CXCL-1, CXCL-10, ICAM-1, IL-1ra i IL-8. Otrzymane wyniki świadczą więc, że samo pojawienie się w niszy guza komórek, które wydzielają NMU może wywoływać zmiany charakteru mikrośrodowiska poprzez modyfikację profilu cytokin w nim obecnych, a wydzielanych przez komórki RJG. Co ciekawe, część z wydzielonych cytokin może zostać wykorzystana przez same komórki nowotworowe w celu stymulacji własnych zdolności inwazyjnych i metastatycznych. W tym przypadku znaczenie będą miały np. CCL-5, IL-8 czy CXCL-10, które mogą regulować takie właściwości komórek nowotworowych jak proliferacja, migracja czy oporność na anoikis (rodzaj programowanej śmierci komórkowej wywołanej brakiem powiązania komórki z macierzą zewnątrzkomórkową) [53, 55, 70, 71]. Dodatkowo, IL-8 i CXCL-10 mogą stymulować komórki nowotworowe do wydzielania enzymów proteolitycznych (MMPs) odpowiedzialnych za przekształcanie macierzy zewnątrzkomórkowej w trakcie metastazy [55, 70]. Cytokiny wydzielone przez badane komórki RJG mogą pośredniczyć również w interakcjach z mikrośrodowiskiem, np. CXCL-10 może oddziaływać chemotaktycznie na makrofagi [53], a CXCL-1, IL-8 i ICAM-1 mogą sprzyjać angiogenezie [55, 72, 73, 74].

Bezpośrednie oddziaływanie NMU na składniki TME, w tym makrofagi oraz komórki śródbłonka mikronaczyń nowotworowych, nadal pozostaje niezbadanym tematem nie tylko w przypadku RJG. W związku z powyższym, badania funkcji NMU regulującej aktywność mikrośrodowiska nowotworowego przeprowadzone w ramach niniejszej pracy miały charakter podstawowy i rozpoczynały się od opracowania charakterystyki wykorzystanych komórek modelowych makrofagów i śródbłonka mikronaczyniowego, potencjalnie obecnych w mikrośrodowisku nowotworu, pod względem ekspresji oraz obecności zarówno NMU, jak i jej receptorów.

Jedynie publikowane do tej pory informacje dotyczące możliwego oddziaływania NMU na makrofagi potwierdzały ekspresję NMU i jednego receptora dla tego białka (NMUR1) w makrofagach izolowanych z jamy otrzewnej myszy oraz wskazały na potencjalną stymulację makrofagów do wydzielania IL-6 pod wpływem NMU [57]. Wyniki te pochodzą z badań *in vivo* udziału NMU w przebiegu szoku septycznego wywołanego u myszy po zastosowaniu LPS i dodatkowo nie uwzględniają zróżnicowania fenotypów makrofagów, co ma istotne znaczenie w przypadku mikrośrodowiska nowotworu. Badania przeprowadzone

w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej pozwoliły na opracowanie charakterystyki dwóch modeli makrofagów, wywodzących się z linii komórkowej THP-1 oraz z monocytów izolowanych z krwi zdrowych dawców, pod względem ekspresji NMU i jej klasycznych oraz alternatywnych receptorów. Podobnie jak w przypadku wcześniej opublikowanych wyników, w niniejszej pracy również wykazano ekspresję *NMUR1* w makrofagach. Jednocześnie nie stwierdzono ekspresji *NMUR2* ani możliwości utworzenia alternatywnego receptora dla NMU (stanowiącego dimer receptorów NTSR1 i GHSR1b). Z przeprowadzonych badań wynika więc, że *NMUR1* jest jedynym receptorem mogącym przekazywać sygnał od NMU w makrofagach. Co ciekawe, ekspresja *NMUR1* wzrasta w trakcie procesu różnicowania monocytów w makrofagi oraz spada w trakcie ich polaryzacji. Zależność ta świadczy o potencjalnej najwyższej wrażliwości niespolaryzowanych makrofagów na działanie NMU i była powodem do ich wykorzystania w dalszych badaniach. Co więcej, pomimo wcześniejszych doniesień wskazujących na ekspresję *NMU* w makrofagach [57], nie została ona potwierdzona w żadnym z badanych modeli tych komórek. Jednocześnie obserwacja ta wyklucza możliwość autokrynnego działania NMU w przypadku makrofagów.

Receptory dla NMU, a w tym *NMUR1* obecny na makrofagach i komórkach śródbłonna mikronaczyniowego, należą do receptorów GPCRs. Aktywność *NMUR1* i *NMUR2* została przebadana z wykorzystaniem linii komórkowych (HEK-293, COS-7 lub CHO) z heterologiczną nadekspresją jednego z receptorów. Z opublikowanych do tej pory badań wynika, że szlaki sygnałowe pobudzone przez NMU obejmują m.in. szlak kinaz MAPK [40, 41]. W niniejszej pracy podstawą do potwierdzenia aktywności *NMUR1* obecnego w makrofagach stała się analiza fosforylacji kinaz ERK 1/2, która stanowi jedną z częściej stosowanych metod oceny aktywacji receptorów dla NMU [40, 41]. Otrzymane wyniki po raz pierwszy pozwoliły na potwierdzenie wzbudzenia sygnału przez oddziaływanie NMU/*NMUR1* w makrofagach oraz dowiodły specyficzności sygnału generowanego przez NMU poprzez *NMUR1* w badanych komórkach. Działanie takie obserwowano w wyniku zastosowania chemicznie syntetyzowanej aktywnej formy NMU (NMU-9). Efekt fosforylacji kinaz ERK 1/2 potwierdzono również w przypadku NMU pochodzenia nowotworowego, wydzielanej przez komórki linii HT29 ze stabilną nadekspresją badanego białka. Jednocześnie zaobserwowano, że efekt zwiększonej fosforylacji kinaz ERK 1/2 ma miejsce już w przypadku zastosowania samego medium z nad komórek kontrolnych niewydzielających NMU. Intensywność obserwowanego sygnału była jednak niższa niż po zastosowaniu medium zawierającego badane białko. Powodem obserwowanej zależności

mogło być w tym przypadku działanie innych czynników wydzielonych przez komórki nowotworowe, w tym wspomnianych wyżej cytokin, których receptory również należą do rodziny GPCRs [75].

Potwierdzenie obecności i aktywności NMUR1 w makrofagach umożliwiło prowadzenie dalszych badań, w których oceniono wpływ NMU na zmiany fenotypowe i funkcjonalne tych komórek. W tym zakresie stwierdzono, że NMU może działać chemotaktycznie na makrofagi, wywoływać ich polaryzację w kierunku pronowotworowego fenotypu M2, zmieniać profil wydzielanych przez nie cytokin oraz stymulować ich zdolności migracyjne.

Makrofagi stanowią istotny składnik mikrośrodowiska RJG. Zależnie od obszaru guza w którym występują oraz fenotypu jaki prezentują mogą one przejawiać zarówno pro-, jak i antynowotworowe działanie [20]. Niektóre z opublikowanych prac wskazują również na prognostyczne znaczenie ogólnej ilości makrofagów obecnych w mikrośrodowisku RJG [14, 17, 18, 19]. Jak wiadomo, komórki wielu nowotworów wydzielają czynniki przyciągające w okolice guza monocyty będące prekursorami makrofagów [12]. Działanie NMU jako czynnika chemotaktycznego względem makrofagów zostało wykazane w nowotworze wątroby [76]. W niniejszej pracy zaobserwowano migrację makrofagów w kierunku zwiększającego się stężenia NMU-9. Badane białko działało również stymulująco na zdolności migracyjne makrofagów (zarówno jego syntetyczna forma, jak i wydzielona przez komórki RJG). Uzyskane wyniki potwierdzają więc potencjalny bezpośredni udział NMU w zwiększaniu populacji makrofagów w mikrośrodowisku nowotworowym. Niemniej jednak, należy pamiętać, że, ze względu na zróżnicowane znaczenie TAMs w RJG, sama obecność tych komórek nie świadczy o ich wpływie na progresję nowotworu. Większość publikowanych do tej pory prac zwraca uwagę na wpływ TME na kształtowanie fenotypu i w efekcie funkcji obecnych w nim makrofagów. Polaryzacja makrofagów wywołana działaniem komórek RJG nie jest jednak jednoznaczna i przejawia się występowaniem cech markerowych zarówno fenotypu M1, jak i M2 [77, 78, 79]. W niniejszej pracy stwierdzono zwiększenie ekspresji białek markerowych charakterystycznych dla fenotypu M2 pod wpływem działania syntetycznej aktywnej formy NMU. Jak dowiedziono we wcześniej publikowanych pracach, to właśnie polaryzacja TAMs w fenotyp M2 korelowana jest z gorszymi prognozami dla pacjentów z RJG. Za przyczynę takiej zależności uznaje się zdolność makrofagów M2 do wyciszenia odpowiedzi immunologicznej mającej na celu zwalczanie nowotworu, a także działanie stymulujące progresję nowotworu poprzez bezpośrednie oddziaływanie na komórki nowotworowe [79, 80, 81]. Otrzymane wyniki świadczą więc o potencjalnej możliwości

wykorzystania NMU przez komórki nowotworowe do regulowania fenotypu makrofagów sąsiadujących z nimi w niszy guza na potrzeby rozwoju nowotworu. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy dowiodły regulacyjnego działania NMU na funkcje makrofagów. Poza stymulacją zdolności migracyjnych tych komórek, efektem działania tego białka była zmiana profilu cytokin wydzielanych przez makrofagi. Co ważne, zarówno CCL-2, jak i CXCL-12, wydzielane przez makrofagi w większej ilości po stymulacji NMU, mają udokumentowane działanie pronowotworowe [74]. Obie z przedstawionych cytokin są korelowane w RJG z progresją nowotworu oraz występowaniem przerzutów. CCL-2 wykazuje przy tym działanie chemotaktyczne i stymulujące migrację makrofagów [79], zaś CXCL-12 jest znanym czynnikiem wpływającym na migrację i inwazyjność komórek RJG [82]. Komórki RJG wydzielające NMU do mikrośrodowiska mogą zatem promować jego pronowotworowy charakter nie tylko na drodze autokrynnej, ale także w wyniku parakrynnego działania na makrofagi. Biorąc pod uwagę fakt, że makrofagi obecne w środowisku nowotworu mogą stymulować komórki nowotworowe do migracji [79], a także mogą wspomagać proces intrawazacji komórek nowotworowych [26], zbadano wpływ medium zebranego z makrofagów stymulowanych NMU na migrację komórek HCT116. Jak wykazano w części wstępnej niniejszej pracy charakteryzującej linię RJG, komórki linii HCT116 wykazują wysoką ekspresję *NMU* oraz wydzielają znaczne ilości NMU do środowiska. Z opublikowanych wyników wiadomo również, że komórki te wykazują ekspresję *NMUR1* [52]. Pomimo spodziewanej wysokiej autokrynnej stymulacji komórek linii HCT116 przez wydzieloną NMU, badania przeprowadzone w niniejszej pracy wykazały, że makrofagi poddane działaniu NMU mogą dodatkowo stymulować migrację komórek nowotworowych, a zatem mogą w pośredni sposób przyczyniać się do ich rozprzestrzeniania się. Za przyczynę takiego działania można uznać działanie wydzielonej przez makrofagi pod wpływem NMU CXCL-12.

Poza makrofagami, w mikrośrodowisku RJG znaczącą rolę odgrywają również komórki śródbłonna mikronaczyniowego. Jak wspomniano we wstępie, komórki te pośredniczą w wymianie substancji odżywczych pomiędzy układem krwionośnym a niszą nowotworu. Co najważniejsze, śródbłonek mikronaczyń nowotworowych odpowiada za proces angiogenezy, a także bierze udział w intrawazacji będącej procesem przedostawania się komórek nowotworowych do naczyń krwionośnych [22, 23, 25]. Jak dowiedziono, przypadki RJG, w których stwierdzono zwiększone zagęszczenie naczyń krwionośnych

w okolicy guza, wykazują znacznie większe prawdopodobieństwo wystąpienia przerzutów, a zatem i dużo gorsze rokowania [22, 24, 25].

Podobnie jak w przypadku makrofagów, dotychczasowe badania dotyczące działania NMU na komórki śródbłonna mikronaczyniowego nie były prowadzone w kontekście chorób nowotworowych. Opublikowane dane dotyczące obecności NMU i jej receptorów w tkankach budujących naczynia krwionośne wykazały ekspresję wyłącznie NMUR1 w komórkach śródbłonna jednocześnie nie stwierdzając aktywności tego receptora [58]. W niniejszej pracy, jako komórki modelowe śródbłonna mikronaczyniowego, wykorzystano komórki linii HMEC-1 szeroko stosowane w badaniach nad angiogenezą, także towarzyszącą nowotworom [83]. Przedstawione wyniki dotyczące ekspresji NMU i jej receptorów w komórkach śródbłonna wykazały ekspresję wyłącznie jednego receptora dla NMU (*NMUR1*) i nie pozwoliły na stwierdzenie ekspresji NMU. Obserwowana zależność nie wskazuje zatem na możliwość wystąpienia autokrynnej aktywności NMU również w przypadku tych komórek. Aktywność zidentyfikowanego receptora dla NMU potwierdzono na drodze analizy fosforylacji kinaz ERK 1/2 wywołanej NMU-9. Zastosowanie medium znad hodowli komórek RJG z nadekspresją NMU nie pozwoliło na jednoznaczne potwierdzenie aktywacji kinaz ERK 1/2 w komórkach modelowych śródbłonna mikronaczyniowego pod wpływem NMU pochodzenia nowotworowego. Podobnie jak w przypadku makrofagów, zbliżony efekt fosforylacji kinaz ERK 1/2 obserwowano zarówno w przypadku medium kontrolnego, jak i zawierającego NMU, co mogło być związane z działaniem innych czynników wydzielanych przez komórki nowotworowe.

Zaobserwowany w niniejszej pracy wpływ NMU na komórki śródbłonna mikronaczyń potencjalnie obecnych w mikrośrodoisku RJG obejmował także analizę zmian fenotypu, jak i funkcji tych komórek. Śródbłonek mikronaczyń związanych z RJG określany jest jako tzw. śródbłonek dysfunkcyjny. Co ciekawe, z opublikowanych informacji wynika, że tzw. śródbłonek dysfunkcyjny może sprzyjać rozwojowi RJG poprzez bezpośrednie interakcje z komórkami nowotworowymi w przeciwieństwie do śródbłonna zdrowego, który hamuje zdolności proliferacyjne i inwazyjne komórek nowotworowych [84, 85]. Odróżnienie śródbłonna mikronaczyń towarzyszących RJG od śródbłonna zdrowego umożliwia stwierdzenie obecności białek markerowych, w tym IGBP-7 oraz wimentyny [86]. O zmianie fenotypu komórek śródbłonna może świadczyć również profil cytokin wydzielanych przez te komórki [85]. W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy zaobserwowano, że NMU w sposób istotny powoduje zwiększenie poziomu ekspresji

obu białek markerowych śródbłonna dysfunkcyjnego (IGBP-7 oraz wimentyny). Stwierdzono również, że działanie NMU na komórki modelowe śródbłonna mikronaczyniowego powoduje zwiększenie poziomu wydzielania CCL-2, CCL-5, CXCL-10, G-CSF i GM-CSF, ICAM-1 oraz IL-6. Jak wykazano wcześniej, wydzielanie większych ilości IL-6, CCL-5, G-CSF, GM-CSF, CCL-2 może być również cechą charakterystyczną fenotypu dysfunkcyjnego śródbłonna [85]. Wyniki te świadczą o udziale NMU w zmianie fenotypu komórek śródbłonna mikronaczyniowego na charakterystyczny dla tzw. śródbłonna dysfunkcyjnego. Jest to kolejny dowód na możliwość wykorzystania NMU przez komórki RJG do regulacji ich mikrośrodowiska na sprzyjające rozwojowi nowotworu. Zmiana profilu cytokin wydzielanych przez komórki modelowe śródbłonna mikronaczyniowego potwierdza również tezę o złożoności interakcji pomiędzy składnikami mikrośrodowiska wywołanych obecnością NMU. Cytokiny wydzielane przez komórki śródbłonna mikronaczyniowego pod wpływem NMU mogą mieć znaczenie nie tylko proangiogenne (ICAM-1) [72], ale również będą świadczyć o możliwych interakcjach z makrofagami (CCL-2) [54] i komórkami nowotworowymi (CCL-2, CCL-5) [74].

W niniejszej pracy potwierdzono działanie proangiogenne NMU. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono zwiększenie intensywności migracji komórek modelowych śródbłonna mikronaczyniowego pod wpływem NMU, jak i zdolności komórek do tworzenia struktur pseudokapilarnych poprzez obserwację tworzenia większej ilości węzłów oraz dłuższych segmentów przez komórki hodowane na sztucznej macierzy zewnątrzkomórkowej. Wyniki te świadczą o możliwości stymulacji angiogenezy przez komórki nowotworowe za pośrednictwem wydzielonej NMU. Dodatkowo, poza bezpośrednim proangiogennym działaniem NMU, powyższy efekt może być dodatkowo pośrednio stymulowany przez zmianę profilu cytokin obecnych w mikrośrodowisku nowotworu. Znaczenie będą miały w tym przypadku zarówno cytokiny wydzielane przez komórki RJG pod wpływem autokrynej stymulacji NMUR2 przez NMU oraz komórki śródbłonna mikronaczyniowego pod wpływem parakrynej stymulacji NMU.

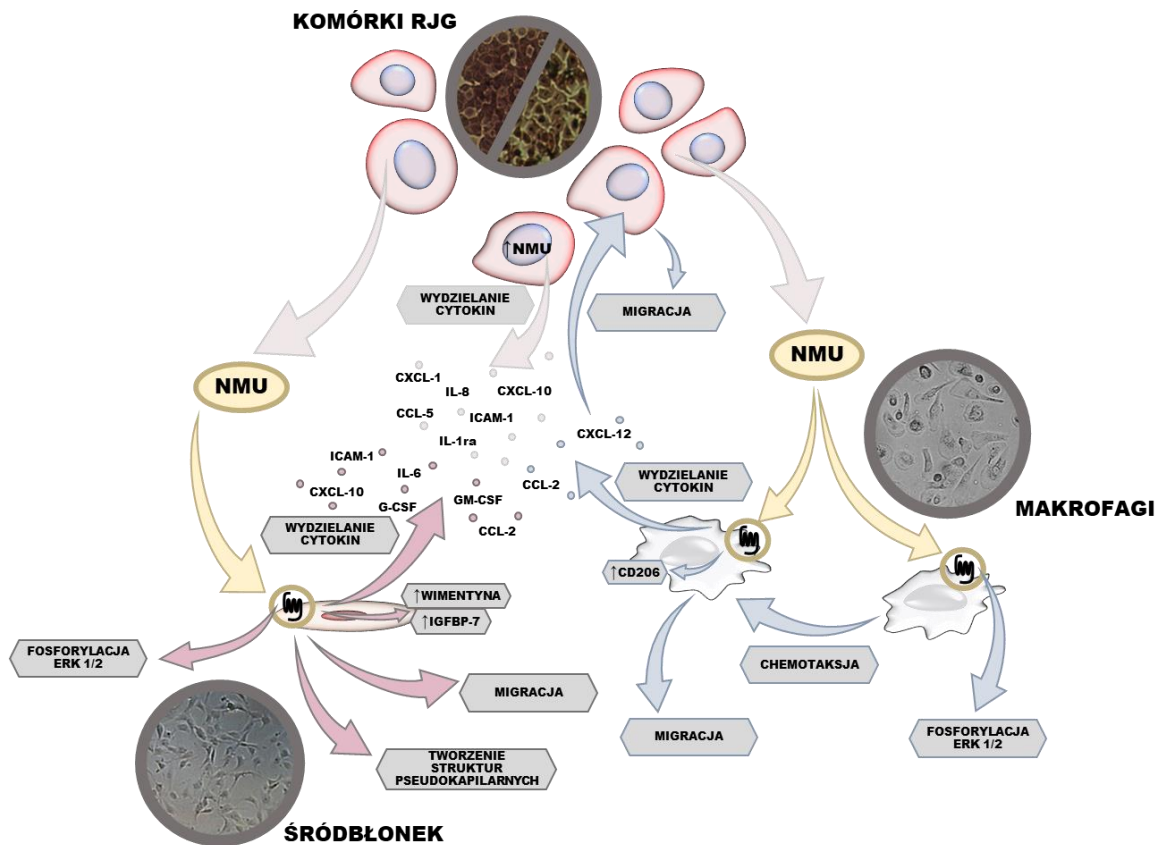
Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują na istotne działanie NMU w RJG, szczególnie w kontekście regulacji pronowotworowej aktywności mikrośrodowiska przez komórki nowotworowe. Wyniki wskazujące na brak możliwości autokrynego działania NMU w przypadku makrofagów i komórek śródbłonna mikronaczyniowego pozwalają zakładać, że podstawą działania NMU w RJG może być parakryna aktywność tego białka wydzielonego przez komórki nowotworowe oddziałująca na komórki mikrośrodowiska głównie przez NMUR1. NMU obecna w mikrośrodowisku nowotworu może wpływać na



interakcje pomiędzy jego składnikami poprzez zmianę profilu cytokin wydzielanych przez m.in. badane w niniejszej pracy komórki nowotworowe, makrofagi i komórki śródbłonna mikronaczyniowego. Dodatkowo NMU obecna w mikrośrodkowisku nowotworu może działać chemotaktycznie na makrofagi, a względem tych już obecnych w niszy guza działać jako czynnik wywołujący polaryzację makrofagów w kierunku pronowotworowego fenotypu M2 oraz stymulujący ich migrację. Wpływ NMU na komórki śródbłonna mikronaczyń nowotworowych może przejawiać się w zmianie ich fenotypu, a także stymulacji właściwości proangiogennych. Działanie NMU proangiogenne oraz stymulujące zdolności migracyjne komórek mikrośrodkowiska może wskazywać na udział tego białka we wczesnych etapach metastazy RJG. Powyższe informacje mogą stać się podstawą do rozpoczęcia dalszych badań udziału tego białka w procesie intrawazacji, jednego z kluczowych procesów podczas powstawania przerzutów. Co więcej, rozszerzenie badań udziału NMU i jej receptorów w rozwoju RJG o model badań *in vivo* może ostatecznie pozwolić na ocenę potencjalnej użyteczności NMU w terapii blokującej pronowotworową aktywność mikrośrodkowiska i skutecznej w walce z RJG na etapie rozwoju guza pierwotnego przed rozsianiem komórek nowotworowych w organizmie chorego.

Wnioski

- Komórki linii wywodzących się z RJG wykazują ekspresję NMU na zróżnicowanym poziomie i mogą wydzielać NMU do otaczającego je środowiska.
- Nadekspresja NMU w klonach linii HT29 wywodzącej się z RJG wiąże się ze zmianą profilu wydzielanych cytokin, w tym zwiększeniem wydzielania: CCL-5, CXCL-1, CXCL-10, ICAM-1, IL-1ra i IL-8, dzięki którym komórki nowotworowe mogą wpływać na zmianę charakteru mikrośrodowiska w jakim się znajdują.
- Brak ekspresji *NMU* w makrofagach i komórkach śródbłonna mikronaczyń wskazuje na brak możliwości oddziaływania autokrynnego NMU w przypadku tych komórek (jedynie działanie parakrynnie wywołane NMU wydzieloną przez komórki nowotworowe).
- Makrofagi oraz komórki śródbłonna mikronaczyniowego potencjalnie obecne w mikrośrodowisku RJG wykazują ekspresję jednego z receptorów dla NMU – NMUR1. Ekspresja NMUR1 wzrasta w trakcie różnicowania monocytów do makrofagów. Spośród makrofagów o różnym fenotypie, niespolaryzowane makrofagi wykazują najwyższą ekspresję NMUR1, zatem są najbardziej podatne na działanie NMU.
- Zwiększenie intensywności fosforylacji kinaz ERK 1/2 zaangażowanych w szlak sygnałowy MAPK obserwowane w komórkach modelowych mikrośrodowiska traktowanych NMU świadczy o aktywności receptora NMUR1. Dodatkowo, obniżenie fosforylacji ERK 1/2 w komórkach z wyciszoną ekspresją receptora dowodzi specyficznego działania NMUR1 w generowaniu sygnałów komórkowych zależnych od NMU.
- NMU obecna w mikrośrodowisku RJG może działać chemotaktycznie na makrofagi przyciągając je do niszy nowotworu. NMU promuje pronowotworowy fenotyp M2, zmianę profilu wydzielanych przez makrofagi cytokin (zwiększenie intensywności wydzielania CCL-2 i CXCL-12) oraz zwiększa zdolności migracyjne makrofagów. Komórki RJG mogą więc zmieniać fenotyp oraz funkcje makrofagów obecnych w niszy nowotworu poprzez wydzielanie NMU tym samym promując rozwój nowotworu.
- Makrofagi traktowane NMU działają stymulująco na migrację komórek RJG, co może być związane z wydzielaniem m.in. CXCL-12 o potwierdzonym działaniu promującym migrację komórek RJG.

- NMU w mikrośrodowisku RJG może działać proangiogenicznie, co obserwowane jest poprzez zmianę fenotypu komórek śródbłonna mikronaczyniowego na charakterystyczny dla śródbłonna nowotworowego, zwiększenie zdolności komórek śródbłonna mikronaczyniowego do migracji oraz tworzenia struktur pseudokapilarnych.



Ryc. 46. Schemat działania NMU w mikrośrodowisku RJG. Symbolami oznaczono:  – białko neuromedyny U oraz  – receptory dla NMU.

Streszczenie

Rak jelita grubego (RJG) jest trzecim najczęściej diagnozowanym i drugim najczęściej występującym powodem zgonów spośród wszystkich rejestrowanych rodzajów nowotworów występujących na świecie. Wysoka śmiertelność RJG zwykle powiązana jest z późną diagnozą oraz przerzutowaniem nowotworu do odległych organów.

Proces powstawania i rozwoju nowotworu w znacznej mierze zależy od charakterystyki niszy, w jakiej znajdują się komórki nowotworowe, w tym wzajemnych interakcji pomiędzy komórkami nowotworowymi i m.in. makrofagami oraz komórkami śródbłonna mikronaczyń. Z tego powodu badanie czynników wydzielanych przez komórki nowotworowe, które mogą regulować funkcje mikrośrodowiska RJG, wydaje się być niezbędnym elementem w walce z tą chorobą dostarczającym informacji m.in. do opracowania nowych, bardziej skutecznych terapii spersonalizowanych.

Prowadzone w ostatnich latach badania wskazują na udział małego białka wydzielniczego neuromedyny U (NMU) oraz jej receptorów (NMUR1 i NMUR2) w rozwoju wielu nowotworów. Obecność receptorów dla NMU stwierdzono w makrofagach i komórkach śródbłonna naczyń oraz wykazano, że NMU stymuluje makrofagi do wydzielania IL-6 (cytokiny o działaniu pronowotworowym). Potencjalna możliwość oddziaływania komórek nowotworowych na komórki mikrośrodowiska za pośrednictwem NMU została wykorzystana jako podstawa rozprawy doktorskiej pt. „*Neuromedyna U (NMU) jako regulator aktywności komórek mikrośrodowiska raka jelita grubego*”. W ramach niniejszej pracy założono hipotezę, iż NMU wydzielona przez komórki nowotworowe reguluje aktywność wybranych komórek niszy w taki sposób, aby sprzyjały rozwojowi nowotworu. Materiał wykorzystany w badaniach, jako modele komórek mikrośrodowiska nowotworu, stanowiły komórki linii THP-1 i monocyty izolowane z krwi obwodowej zdrowych dawców oraz komórki śródbłonna mikronaczyniowego linii HMEC-1. Dodatkowo, w badaniach wstępnych, wykorzystano komórki 6 linii wywodzących się z RJG: HT29, Caco-2, HCT116, SW480, SW620, HCT15 i linię komórek nabłonka CCD 841 CoN.

Założoną hipotezę zweryfikowano poprzez realizację kolejnych badań przeprowadzonych z wykorzystaniem:

- metody reakcji PCR w czasie rzeczywistym do oceny ekspresji genów;
- metod Western Immunoblotting do oceny poziomu wewnątrzkomórkowych białek, barwienia immunofluorescencyjnego do wizualizacji receptorów oraz

immunoprecypitacji i Western Immuboblotting do oceny poziomu białek wydzielonych;

- nukleofekcji oraz selekcji klonalnej do otrzymania klonów HT29 ze stabilną nadekspresją NMU;
- komercyjnego zestawu Proteome Profiler do oceny poziomu wydzielonych cytokin;
- cytometrii przepływowej do oceny poziomu markerów różnicowania i polaryzacji makrofagów;
- testu migracji przez membranę lub testu zarastania rysy do oceny szybkości migracji komórek;
- testu tworzenia struktur pseudokapilarnych przez komórki śródbłonka na sztucznej macierzy zewnątrzkomórkowej Matrigel.

Wpływ NMU na komórki modelowe makrofagów oraz śródbłonka mikronaczyniowego zbadano z wykorzystaniem syntetyzowanej chemicznie aktywnej formy NMU-9 oraz NMU wydzielonej przez komórki nowotworowe. Model komórek linii RJG stanowiących źródło badanego białka przygotowano w części badań wstępnych wykonanych w ramach niniejszej pracy. Do opracowania klonów ze stabilną nadekspresją *NMU*, które charakteryzowały się określonym, wysokim poziomem wydzielania NMU do medium wykorzystano komórki linii HT29. Wyprowadzone klony scharakteryzowano pod względem zmian w profilu cytokin wydzielanych do mikrośrodowiska przez komórki z nadekspresją *NMU*. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono wyższy poziom sekrecji: CCL-5, CXCL-1, CXCL-10, ICAM-1, IL-1ra i IL-8 oraz niższy poziom CXCL-12 w stosunku do klonów kontrolnych.

Badania możliwości oddziaływania NMU na komórki modelowe makrofagów potencjalnie obecnych w mikrośrodowisku RJG pozwoliły na stwierdzenie braku ekspresji *NMU* oraz obecności jednego rodzaju receptora dla NMU (*NMURI*), którego ekspresję na najwyższym poziomie obserwowano w niespolaryzowanych makrofagach. Obserwacja aktywacji ścieżki sygnałowej MAPK wyrażonej przez zwiększenie fosforylacji kinaz ERK 1/2 potwierdziła również aktywność receptorów w tych komórkach. Na podstawie analizy efektów działania NMU na makrofagi stwierdzono, że promuje ona zmianę fenotypu makrofagów w pronowotworowy fenotyp M2. NMU działała również chemotaktycznie względem makrofagów, a także zwiększała ich zdolności migracyjne i wpływała na profil cytokin wydzielanych przez te komórki (poprzez zwiększenie wydzielania CCL-2 i CXCL-12). Dodatkowo stwierdzono stymulujący wpływ medium znad makrofagów traktowanych NMU na migrację komórek RJG.

W przypadku komórek modelowych śródbłonna mikronaczyniowego również stwierdzono obecność receptora NMUR1 o potwierdzonej aktywności, przy jednoczesnym braku ekspresji *NMU*. W badaniach działania *NMU* na komórki śródbłonna mikronaczyniowego wykazano zmianę ich fenotypu na charakterystyczny dla mikronaczyń nowotworowych. Zaobserwowano również zmiany funkcjonalne wywołane działaniem *NMU* przejawiające się zwiększeniem intensywności migracji oraz intensywności tworzenia struktur pseudokapilarnych przez komórki śródbłonna mikronaczyniowego, a także zmianą profilu wydzielanych cytokin (poprzez zwiększenie wydzielania: CCL-2, CCL-5, CXCL-10, G-CSF i GM-CSF, ICAM-1 i IL-6).

Wyniki otrzymane w ramach niniejszej pracy wskazują na działanie *NMU* promujące rozwój RJG, szczególnie w odniesieniu oddziaływania pomiędzy komórkami nowotworowymi a wybranymi składnikami ich mikrośrodowiska. Działanie *NMU* proangiogenne oraz stymulujące zdolności migracyjne komórek mikrośrodowiska może być wskazaniem do dalszych badań udziału tego białka w procesie intrawazacji, jednego z kluczowych procesów podczas powstawania przerzutów. Rozszerzenie badań udziału *NMU* w rozwoju RJG o model *in vivo* może dodatkowo dostarczyć informacji do opracowania nowej terapii RJG, działającej jeszcze na etapie rozwoju guza pierwotnego przed rozsianiem komórek nowotworowych w organizmie chorego.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the third most frequently diagnosed and the second most common cause of death among all cancer types globally. High CRC mortality is often associated with late diagnosis and the presence of metastasis.

The process of tumour formation and development depends mainly on the characteristics of the niche in which cancer cells are located, including interactions between cancer cells and, e.g., macrophages or microvascular endothelial cells. Hence, the searching for factors secreted by cancer cells that modulate the function of the CRC microenvironment seems to be an essential element in the fight against this disease that may provide information for the new, more effective personalized therapies.

The recent studies indicate the participation of the small secretory protein neuromedin U (NMU) and its receptors (NMUR1 and NMUR2) in the development of many cancers. NMU receptors have been found in macrophages and vascular endothelial cells, and NMU has been shown to stimulate macrophages to secrete IL-6 (cytokines with pro-tumour activity). The presented work entitled "*Neuromedin U (NMU) as a regulator of the activity of colon cancer microenvironment cells*" examined the possible impact of cancer cells on the other cells present in their microenvironment via NMU secretion. Specifically, this study hypothesized that NMU secreted by CRC regulates the activity of selected cells present in the tumour niche and promotes the development of cancer. The material used in the research as a model of the cells present in the tumour microenvironment includes THP-1 cell line, monocytes isolated from the peripheral blood of healthy donors and HMEC-1 endothelial cell line. Additionally, six CRC-derived cell lines: HT29, Caco-2, HCT116, SW480, SW620, HCT15 and CCD 841 CoN epithelial cell line were used in preliminary studies.

The abovementioned hypothesis was verified by the following methods:

- real-time PCR for assessing gene expression;
- Western Immunoblotting to assess the level of intracellular proteins, immunofluorescence staining for the visualization of receptors and immunoprecipitation and Western Immunoblotting to assess the level of secreted proteins;
- nucleofection and clonal selection to obtain HT29 clones with stable NMU overexpression;
- a Proteome Profiler analysis for the assessment of the secreted cytokines levels;

- flow cytometry to assess the level macrophage differentiation and polarization markers;
- a transmembrane migration test or a wound-healing assay to evaluate the cell migration rate;
- endothelial tube formation assay on an artificial extracellular matrix, Matrigel.

The effect of NMU action on the macrophages and microvascular endothelium was investigated with NMU-9 (a synthesized chemically active form of NMU) and NMU secreted by cancer cells. The HT29 line with stable NMU overexpression, with the high level of NMU secreted to their culture medium, developed in the preliminary part of this study, was used in further studies as a source of the NMU. The HT29 clones were characterized by changes in the cytokines secreted profile by NMU overexpressing cells. Based on the obtained results, the autocrine effect of NMU in CRC cells may be exerted by a higher secretion level of CCL-5, CXCL-1, CXCL-10, ICAM-1, IL-1ra and IL-8, and a lower level of CXCL-12.

Studies of the possibility of NMU influencing macrophages potentially present in the CRC microenvironment revealed the lack of NMU expression and the presence of one type of NMU receptor (NMUR1) in these cells. Moreover, the highest level of NMUR1 expression was observed in unpolarized macrophages. The activation of the MAPK signalling pathway and the observed increased phosphorylation of ERK 1/2 kinases confirmed the activity of the NMU receptor. Further analysis of the NMU effects on macrophages showed the change in the macrophage phenotype into the pro tumour M2 phenotype. NMU also acted as a chemotactic agent on macrophages, promoted their migratory abilities and changed the profile of cytokines secreted by these cells (observed as the increased level of secreted CCL-2 and CXCL-12). Additionally, a stimulating effect of the medium from NMU-treated macrophages on the migration of CRC cells was found.

NMUR1 receptor with confirmed activity was also determined in microvascular endothelial cells, while no expression of NMU was found. In further studies, the phenotype shift into a characteristic for dysfunctional endothelium related to CRC was confirmed. The observed functional changes induced by NMU manifested by an increase in the migration rate and pseudo capillary structures formation abilities as well as a change in the profile of secreted cytokines (increased secretion of CCL-2, CCL-5, CXCL-10, G-CSF, GM-CSF, ICAM-1 and IL-6).

The presented results indicate the pro tumour activity of NMU, specifically concerning the interaction between cancer cells and selected components of their microenvironment.

The possibility of NMU to promote angiogenesis and migration abilities of microenvironment cells demonstrate the necessity for further research on the function of this protein in the intravasation process, one of the critical events in the formation of metastases. Extending the research on the participation of NMU in the expansion of CRC with an in vivo model may additionally provide information for the development of a new therapy against CRC, effective at the stage of primary tumour development before the spread of cancer cells in the patient's body.

Literatura

1. Colorectal Cancer Facts & Figures 2020-2022; 2020, American Cancer Society
2. Hisamuddin IM, Yang VW. Molecular Genetics of Colorectal Cancer: An Overview. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2006 Apr;2(2):53-59. doi: 10.1007/s11888-006-0002-2
3. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res.* 2012 Jan;5(1):19-27.
4. Koveitypour Z, Panahi F, Vakilian M, Peymani M, Seyed Forootan F, Nasr Esfahani MH, Ghaedi K. Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. *Cell Biosci.* 2019 Dec 2;9:97. doi: 10.1186/s13578-019-0361-4
5. Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol.* 2015;21(1):84-93. doi:10.3748/wjg.v21.i1.84
6. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa E Melo F, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernards R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015 Nov;21(11):1350-6. doi: 10.1038/nm.3967
7. Fessler E, Medema JP. Colorectal Cancer Subtypes: Developmental Origin and Microenvironmental Regulation. *Trends Cancer.* 2016 Sep;2(9):505-518. doi: 10.1016/j.trecan.2016.07.008
8. Sawayama H, Miyamoto Y, Ogawa K, Yoshida N, Baba H. Investigation of colorectal cancer in accordance with consensus molecular subtype classification. *Ann Gastroenterol Surg.* 2020 Jul 21;4(5):528-539. doi: 10.1002/ags3.12362
9. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660
10. Colangelo T, Polcaro G, Muccillo L, D'Agostino G, Rosato V, Ziccardi P, Lupo A, Mazzoccoli G, Sabatino L, Colantuoni V. Friend or foe? The tumour microenvironment

- dilemma in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2017 Jan;1867(1):1-18. doi: 10.1016/j.bbcan.2016.11.001
11. Giraldo NA, Sanchez-Salas R, Peske JD, Vano Y, Becht E, Petitprez F, Validire P, Ingels A, Cathelineau X, Fridman WH, Sautès-Fridman C. The clinical role of the TME in solid cancer. *Br J Cancer*. 2019 Jan;120(1):45-53. doi: 10.1038/s41416-018-0327-z
 12. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008 Apr;66(1):1-9. doi: 10.1016/j.critrevonc.2007.07.004
 13. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Genderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014 Jul 17;41(1):14-20. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008
 14. Edin S, Wikberg ML, Dahlin AM, Rutegård J, Öberg Å, Oldenborg PA, Palmqvist R. The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer. *PLoS One*. 2012;7(10):e47045. doi: 10.1371/journal.pone.0047045
 15. Braster R, Bögels M, Beelen RH, van Egmond M. The delicate balance of macrophages in colorectal cancer; their role in tumour development and therapeutic potential. *Immunobiology*. 2017 Jan;222(1):21-30. doi: 10.1016/j.imbio.2015.08.011
 16. Funada Y, Noguchi T, Kikuchi R, Takeno S, Uchida Y, Gabbert HE. Prognostic significance of CD8+ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2003 Mar-Apr;10(2):309-13
 17. Erreni M, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated Macrophages (TAM) and Inflammation in Colorectal Cancer. *Cancer Microenviron*. 2011 Aug;4(2):141-54. doi: 10.1007/s12307-010-0052-5
 18. Norton SE, Dunn ET, McCall JL, Munro F, Kemp RA. Gut macrophage phenotype is dependent on the tumor microenvironment in colorectal cancer. *Clin Transl Immunology*. 2016 Apr 29;5(4):e76. doi: 10.1038/cti.2016.21. PMID: 27195119; PMCID: PMC4855270.
 19. Feng Q, Chang W, Mao Y, He G, Zheng P, Tang W, Wei Y, Ren L, Zhu D, Ji M, Tu Y, Qin X, Xu J. Tumor-associated Macrophages as Prognostic and Predictive Biomarkers

- for Postoperative Adjuvant Chemotherapy in Patients with Stage II Colon Cancer. *Clin Cancer Res.* 2019 Jul 1;25(13):3896-3907. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2076
20. Pinto ML, Rios E, Durães C, Ribeiro R, Machado JC, Mantovani A, Barbosa MA, Carneiro F, Oliveira MJ. The Two Faces of Tumor-Associated Macrophages and Their Clinical Significance in Colorectal Cancer. *Front Immunol.* 2019 Aug 20;10:1875. doi: 10.3389/fimmu.2019.01875
21. Inagaki K, Kunisho S, Takigawa H, Yuge R, Oka S, Tanaka S, Shimamoto F, Chayama K, Kitadai Y. Role of tumor-associated macrophages at the invasive front in human colorectal cancer progression. *Cancer Sci.* 2021 Jul;112(7):2692-2704. doi: 10.1111/cas.14940
22. Annan DA, Kikuchi H, Maishi N, Hida Y, Hida K. Tumor Endothelial Cell-A Biological Tool for Translational Cancer Research. *Int J Mol Sci.* 2020 May 3;21(9):3238. doi: 10.3390/ijms21093238
23. Pietrzyk Ł. Biomarkers Discovery for Colorectal Cancer: A Review on Tumor Endothelial Markers as Perspective Candidates. *Dis Markers.* 2016;2016:4912405. doi: 10.1155/2016/4912405
24. Yamamura T, Tsukikawa S, Yamada K, Yamaguchi S. Morphologic analysis of microvessels in colorectal tumors with respect to the formation of liver metastases. *J Surg Oncol.* 2001 Dec;78(4):259-64. doi: 10.1002/jso.1164
25. Chiang SP, Cabrera RM, Segall JE. Tumor cell intravasation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016 Jul 1;311(1):C1-C14. doi: 10.1152/ajpcell.00238.2015
26. Roh-Johnson M, Bravo-Cordero JJ, Patsialou A, Sharma VP, Guo P, Liu H, Hodgson L, Condeelis J. Macrophage contact induces RhoA GTPase signaling to trigger tumor cell intravasation. *Oncogene.* 2014 Aug 14;33(33):4203-12. doi: 10.1038/onc.2013.377
27. Marech I, Ammendola M, Sacco R, Sammarco G, Zuccalà V, Zizzo N, Leporini C, Luposella M, Patruno R, Filippelli G, Russo E, Porcelli M, Gadaleta CD, De Sarro G, Ranieri G. Tumour-associated macrophages correlate with microvascular bed extension in colorectal cancer patients. *J Cell Mol Med.* 2016 Jul;20(7):1373-80. doi: 10.1111/jcmm.12826
28. Brighton PJ, Szekeres PG, Willars GB. Neuromedin U and its receptors: structure, function, and physiological roles. *Pharmacol Rev.* 2004 Jun;56(2):231-48. doi: 10.1124/pr.56.2.3

29. Mitchell JD, Maguire JJ, Davenport AP. Emerging pharmacology and physiology of neuromedin U and the structurally related peptide neuromedin S. *Br J Pharmacol*. 2009 Sep;158(1):87-103. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00252.x
30. Przygodzka P, Soboska K, Sochacka E, Boncela J. Neuromedin U: A Small Peptide in the Big World of Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019 Sep 5;11(9):1312. doi: 10.3390/cancers11091312.
31. Malendowicz LK, Rucinski M. Neuromedins NMU and NMS: An Updated Overview of Their Functions. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Jul 1;12:713961. doi: 10.3389/fendo.2021.713961
32. Szekeres PG, Muir AI, Spinage LD, Miller JE, Butler SI, Smith A, Rennie GI, Murdock PR, Fitzgerald LR, Wu Hl, McMillan LJ, Guerrero S, Vawter L, Elshourbagy NA, Mooney JL, Bergsma DJ, Wilson S, Chambers JK. Neuromedin U is a potent agonist at the orphan G protein-coupled receptor FM3. *J Biol Chem*. 2000 Jul 7;275(27):20247-50. doi: 10.1074/jbc.C000244200
33. Fujii R, Hosoya M, Fukusumi S, Kawamata Y, Habata Y, Hinuma S, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Identification of neuromedin U as the cognate ligand of the orphan G protein-coupled receptor FM-3. *J Biol Chem*. 2000 Jul 14;275(28):21068-74. doi: 10.1074/jbc.M001546200.
34. Hosoya M, Moriya T, Kawamata Y, Ohkubo S, Fujii R, Matsui H, Shintani Y, Fukusumi S, Habata Y, Hinuma S, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Identification and functional characterization of a novel subtype of neuromedin U receptor. *J Biol Chem*. 2000 Sep 22;275(38):29528-32. doi: 10.1074/jbc.M004261200
35. Kojima M, Haruno R, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Hanada R, Matsuo H, Kangawa K. Purification and identification of neuromedin U as an endogenous ligand for an orphan receptor GPR66 (FM3). *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Sep 24;276(2):435-8. doi: 10.1006/bbrc.2000.3502
36. Raddatz R, Wilson AE, Artymyshyn R, Bonini JA, Borowsky B, Boteju LW, Zhou S, Kouranova EV, Nagorny R, Guevarra MS, Dai M, Lerman GS, Vaysse PJ, Branchek TA, Gerald C, Forray C, Adham N. Identification and characterization of two neuromedin U receptors differentially expressed in peripheral tissues and the central nervous system. *J Biol Chem*. 2000 Oct 20;275(42):32452-9. doi: 10.1074/jbc.M004613200
37. Shan L, Qiao X, Crona JH, Behan J, Wang S, Laz T, Bayne M, Gustafson EL, Monsma FJ Jr, Hedrick JA. Identification of a novel neuromedin U receptor subtype expressed

- in the central nervous system. *J Biol Chem.* 2000 Dec 15;275(50):39482-6. doi: 10.1074/jbc.C000522200
38. Takahashi K, Furukawa C, Takano A, Ishikawa N, Kato T, Hayama S, Suzuki C, Yasui W, Inai K, Sone S, Ito T, Nishimura H, Tsuchiya E, Nakamura Y, Daigo Y. The neuromedin U-growth hormone secretagogue receptor 1b/neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway as a therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res.* 2006 Oct 1;66(19):9408-19. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1349
39. Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, Hamm HE. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev.* 2003 Dec;24(6):765-81. doi: 10.1210/er.2000-0026
40. Brighton PJ, Szekeres PG, Wise A, Willars GB. Signaling and ligand binding by recombinant neuromedin U receptors: evidence for dual coupling to Galphaq/11 and Galphai and an irreversible ligand-receptor interaction. *Mol Pharmacol.* 2004 Dec;66(6):1544-56. doi: 10.1124/mol.104.002337
41. Alhosaini K, Bahattab O, Qassam H, Challiss RAJ, Willars GB. Ligand-Specific Signaling Profiles and Resensitization Mechanisms of the Neuromedin U2 Receptor. *Mol Pharmacol.* 2018 Jul;94(1):674-688. doi: 10.1124/mol.117.111070
42. Teranishi H, Hanada R. Neuromedin U, a Key Molecule in Metabolic Disorders. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 19;22(8):4238. doi: 10.3390/ijms22084238
43. Rani S, Corcoran C, Shiels L, Germano S, Breslin S, Madden S, McDermott MS, Browne BC, O'Donovan N, Crown J, Gogarty M, Byrne AT, O'Driscoll L. Neuromedin U: a candidate biomarker and therapeutic target to predict and overcome resistance to HER-tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res.* 2014 Jul 15;74(14):3821-33. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2053
44. Lin TY, Wu FJ, Chang CL, Li Z, Luo CW. NMU signaling promotes endometrial cancer cell progression by modulating adhesion signaling. *Oncotarget.* 2016 Mar 1;7(9):10228-42. doi: 10.18632/oncotarget.7169
45. Garczyk S, Klotz N, Szczepanski S, Denecke B, Antonopoulos W, von Stillfried S, Knüchel R, Rose M, Dahl E. Oncogenic features of neuromedin U in breast cancer are associated with NMUR2 expression involving crosstalk with members of the WNT signaling pathway. *Oncotarget.* 2017 May 30;8(22):36246-36265. doi: 10.18632/oncotarget.16121

46. Martinez VG, Crown J, Porter RK, O'Driscoll L. Neuromedin U alters bioenergetics and expands the cancer stem cell phenotype in HER2-positive breast cancer. *Int J Cancer*. 2017 Jun 15;140(12):2771-2784. doi: 10.1002/ijc.30705
47. Yang X, Wang CC, Lee WYW, Trovik J, Chung TKH, Kwong J. Long non-coding RNA HAND2-AS1 inhibits invasion and metastasis in endometrioid endometrial carcinoma through inactivating neuromedin U. *Cancer Lett*. 2018 Jan 28;413:23-34. doi: 10.1016/j.canlet.2017.10.028
48. Przygodzka P, Papiewska-Pajak I, Bogusz H, Kryczka J, Sobierajska K, Kowalska MA, Boncela J. Neuromedin U is upregulated by Snail at early stages of EMT in HT29 colon cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Nov;1860(11 Pt A):2445-2453. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.07.012
49. Liang B, Li C, Zhao J. Identification of key pathways and genes in colorectal cancer using bioinformatics analysis. *Med Oncol*. 2016 Oct;33(10):111. doi: 10.1007/s12032-016-0829-6
50. Chen L, Lu D, Sun K, Xu Y, Hu P, Li X, Xu F. Identification of biomarkers associated with diagnosis and prognosis of colorectal cancer patients based on integrated bioinformatics analysis. *Gene*. 2019 Apr 15;692:119-125. doi: 10.1016/j.gene.2019.01.001
51. Gong B, Kao Y, Zhang C, Sun F, Gong Z, Chen J. Identification of Hub Genes Related to Carcinogenesis and Prognosis in Colorectal Cancer Based on Integrated Bioinformatics. *Mediators Inflamm*. 2020 Apr 9;2020:5934821. doi: 10.1155/2020/5934821
52. Przygodzka P, Sochacka E, Soboska K, Pacholczyk M, Papiewska-Pajak I, Przygodzki T, Płociński P, Ballet S, De Prins A, Boncela J. Neuromedin U induces an invasive phenotype in CRC cells expressing the NMUR2 receptor. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021 Sep 7;40(1):283. doi: 10.1186/s13046-021-02073-8
53. Chen Y, Zheng X, Wu C. The Role of the Tumor Microenvironment and Treatment Strategies in Colorectal Cancer. *Front Immunol*. 2021 Dec 2;12:792691. doi: 10.3389/fimmu.2021.792691
54. De la Fuente López M, Landskron G, Parada D, Dubois-Camacho K, Simian D, Martinez M, Romero D, Roa JC, Chahuán I, Gutiérrez R, Lopez-K F, Alvarez K, Kronberg U, López S, Sanguinetti A, Moreno N, Abedrapo M, González MJ, Quera R, Hermoso-R MA. The relationship between chemokines CCL2, CCL3, and CCL4 with the tumor microenvironment and tumor-associated macrophage markers in colorectal

- cancer. *Tumour Biol.* 2018 Nov;40(11):1010428318810059. doi: 10.1177/1010428318810059
55. Liu Q, Li A, Tian Y, Wu JD, Liu Y, Li T, Chen Y, Han X, Wu K. The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016 Oct;31:61-71. doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.08.002
56. Xu H, Lai W, Zhang Y, Liu L, Luo X, Zeng Y, Wu H, Lan Q, Chu Z. Tumor-associated macrophage-derived IL-6 and IL-8 enhance invasive activity of LoVo cells induced by PRL-3 in a KCNN4 channel-dependent manner. *BMC Cancer.* 2014 May 10;14:330. doi: 10.1186/1471-2407-14-330
57. Moriyama M, Matsukawa A, Kudoh S, Takahashi T, Sato T, Kano T, Yoshimura A, Kojima M. The neuropeptide neuromedin U promotes IL-6 production from macrophages and endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Mar 24;341(4):1149-54. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.01.075
58. Mitchell JD, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Expression and vasoconstrictor function of anorexigenic peptides neuromedin U-25 and S in the human cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 2009 Feb 1;81(2):353-61. doi: 10.1093/cvr/cvn302
59. Schlicker A, Beran G, Chresta CM, McWalter G, Pritchard A, Weston S, Runswick S, Davenport S, Heathcote K, Castro DA, Orphanides G, French T, Wessels LF. Subtypes of primary colorectal tumors correlate with response to targeted treatment in colorectal cell lines. *BMC Med Genomics.* 2012 Dec 31;5:66. doi: 10.1186/1755-8794-5-66
60. Berg KCG, Eide PW, Eilertsen IA, Johannessen B, Bruun J, Danielsen SA, Bjørnslett M, Meza-Zepeda LA, Eknæs M, Lind GE, Myklebost O, Skotheim RI, Sveen A, Lothe RA. Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. *Mol Cancer.* 2017 Jul 6;16(1):116. doi: 10.1186/s12943-017-0691-y
61. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol.* 1992 Dec;99(6):683-90. doi: 10.1111/1523-1747.ep12613748
62. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer.* 1980 Aug;26(2):171-6. doi: 10.1002/ijc.2910260208
63. Wu Y, McRoberts K, Berr SS, Frierson HF Jr, Conaway M, Theodorescu D. Neuromedin U is regulated by the metastasis suppressor RhoGDI2 and is a novel promoter of tumor formation, lung metastasis and cancer cachexia. *Oncogene.* 2007 Feb 1;26(5):765-73. doi: 10.1038/sj.onc.1209835

64. Lin TY, Huang WL, Lee WY, Luo CW. Identifying a Neuromedin U Receptor 2 Splice Variant and Determining Its Roles in the Regulation of Signaling and Tumorigenesis In Vitro. *PLoS One*. 2015 Aug 28;10(8):e0136836. doi: 10.1371/journal.pone.0136836
65. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jul;9(7):671-5. doi: 10.1038/nmeth.2089. PMID: 22930834; PMCID: PMC5554542
66. Carpentier G, Berndt S, Ferratge S, Rasband W, Cuendet M, Uzan G, Albanese P. Angiogenesis Analyzer for ImageJ - A comparative morphometric analysis of "Endothelial Tube Formation Assay" and "Fibrin Bead Assay". *Sci Rep*. 2020 Jul 14;10(1):11568. doi: 10.1038/s41598-020-67289-8
67. Marech I, Ammendola M, Sacco R, Sammarco G, Zuccalà V, Zizzo N, Leporini C, Luposella M, Patruno R, Filippelli G, Russo E, Porcelli M, Gadaleta CD, De Sarro G, Ranieri G. Tumour-associated macrophages correlate with microvascular bed extension in colorectal cancer patients. *J Cell Mol Med*. 2016 Jul;20(7):1373-80. doi: 10.1111/jcmm.12826
68. Zhang S, Wang Q, Han Q, Han H, Lu P. Identification and analysis of genes associated with papillary thyroid carcinoma by bioinformatics methods. *Biosci Rep*. 2019 Apr 2;39(4):BSR20190083. doi: 10.1042/BSR20190083
69. You S, Gao L. Identification of NMU as a potential gene conferring alectinib resistance in non-small cell lung cancer based on bioinformatics analyses. *Gene*. 2018 Dec 15;678:137-142. doi: 10.1016/j.gene.2018.08.032
70. Zipin-Roitman A, Meshel T, Sagi-Assif O, Shalmon B, Avivi C, Pfeffer RM, Witz IP, Ben-Baruch A. CXCL10 promotes invasion-related properties in human colorectal carcinoma cells. *Cancer Res*. 2007 Apr 1;67(7):3396-405. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3087
71. Cambien B, Richard-Fiardo P, Karimjee BF, Martini V, Ferrua B, Pitard B, Schmid-Antomarchi H, Schmid-Alliana A. CCL5 neutralization restricts cancer growth and potentiates the targeting of PDGFR β in colorectal carcinoma. *PLoS One*. 2011;6(12):e28842. doi: 10.1371/journal.pone.0028842
72. Gho YS, Kim PN, Li HC, Elkin M, Kleinman HK. Stimulation of tumor growth by human soluble intercellular adhesion molecule-1. *Cancer Res*. 2001 May 15;61(10):4253-7
73. Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases. *Adv Cancer Res*. 2010;106:91-111. doi: 10.1016/S0065-230X(10)06003-3

74. Itatani Y, Kawada K, Inamoto S, Yamamoto T, Ogawa R, Taketo MM, Sakai Y. The Role of Chemokines in Promoting Colorectal Cancer Invasion/Metastasis. *Int J Mol Sci.* 2016 Apr 28;17(5):643. doi: 10.3390/ijms17050643
75. Bar-Shavit R, Maoz M, Kancharla A, Nag JK, Agranovich D, Grisaru-Granovsky S, Uziely B. G Protein-Coupled Receptors in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2016 Aug 12;17(8):1320. doi: 10.3390/ijms17081320
76. Li Q, Han L, Ruan S, Shen S, Cao Q, Cai X, Yan Y, Peng B, Hua Y. The prognostic value of neuromedin U in patients with hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer.* 2020 Feb 3;20(1):95. doi: 10.1186/s12885-020-6532-1
77. Wu TH, Li YY, Wu TL, Chang JW, Chou WC, Hsieh LL, Chen JR, Yeh KY. Culture supernatants of different colon cancer cell lines induce specific phenotype switching and functional alteration of THP-1 cells. *Cell Immunol.* 2014 Jul;290(1):107-15. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.05.015
78. Sawa-Wejksza K, Dudek A, Lemieszek M, Kaławaj K, Kandefer-Szerszeń M. Colon cancer-derived conditioned medium induces differentiation of THP-1 monocytes into a mixed population of M1/M2 cells. *Tumour Biol.* 2018 Sep;40(9):1010428318797880. doi: 10.1177/1010428318797880
79. Wei C, Yang C, Wang S, Shi D, Zhang C, Lin X, Liu Q, Dou R, Xiong B. Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis. *Mol Cancer.* 2019 Mar 30;18(1):64. doi: 10.1186/s12943-019-0976-4
80. Xiao P, Long X, Zhang L, Ye Y, Guo J, Liu P, Zhang R, Ning J, Yu W, Wei F, Yu J. Neurotensin/IL-8 pathway orchestrates local inflammatory response and tumor invasion by inducing M2 polarization of Tumor-Associated macrophages and epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells. *Oncoimmunology.* 2018 Mar 13;7(7):e1440166. doi: 10.1080/2162402X.2018.1440166
81. Zhong X, Chen B, Yang Z. The Role of Tumor-Associated Macrophages in Colorectal Carcinoma Progression. *Cell Physiol Biochem.* 2018;45(1):356-365. doi: 10.1159/000486816
82. Brand S, Dambacher J, Beigel F, Olszak T, Diebold J, Otte JM, Göke B, Eichhorst ST. CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation. *Exp Cell Res.* 2005 Oct 15;310(1):117-30. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.07.006

83. Majewska A, Wilkus K, Brodaczewska K, Kieda C. Endothelial Cells as Tools to Model Tissue Microenvironment in Hypoxia-Dependent Pathologies. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 7;22(2):520. doi: 10.3390/ijms22020520
84. Franses JW, Baker AB, Chitalia VC, Edelman ER. Stromal endothelial cells directly influence cancer progression. *Sci Transl Med.* 2011 Jan 19;3(66):66ra5. doi: 10.1126/scitranslmed.3001542
85. Franses JW, Drosu NC, Gibson WJ, Chitalia VC, Edelman ER. Dysfunctional endothelial cells directly stimulate cancer inflammation and metastasis. *Int J Cancer.* 2013 Sep 15;133(6):1334-44. doi: 10.1002/ijc.28146
86. van Beijnum JR, Dings RP, van der Linden E, Zwaans BM, Ramaekers FC, Mayo KH, Griffioen AW. Gene expression of tumor angiogenesis dissected: specific targeting of colon cancer angiogenic vasculature. *Blood.* 2006 Oct 1;108(7):2339-48. doi: 10.1182/blood-2006-02-004291