

Stacjonarne Studia Doktoranckie Genetyki
Molekularnej, Cytogenetyki i Biofizyki Medycznej

Ewelina Sochacka

**Rola neuromedyny U (NMU)
w regulacji potencjału
migracyjnego komórek raka jelita
grubego**

The role of neuromedin U (NMU) in the regulation
of the migratory potential of colorectal cancer cells

Praca doktorska
wykonana w Pracowni Sygnalizacji Komórkowej
Instytutu Biologii Medycznej
Polskiej Akademii Nauk

promotor
dr. hab. Joanna Boncela, prof. IBM PAN
promotor pomocniczy
dr Patrycja Przygodzka

Podziękowania

Prezentowana rozprawa doktorska przygotowana została pod opieką promotora, **Pani dr hab. Joanny Bonceli**, której dziękuję za okazaną pomoc, cenne uwagi i sugestie, które wpłynęły na ostateczny kształt tej pracy. Dziękuję za zaangażowanie okazane mi podczas kilkuletniej opieki naukowej w trakcie studiów doktoranckich.

Serdeczne podziękowania pragnę złożyć także **dr Patrycji Przygodzkiej**, która wspierała i motywowała mnie przez cały okres trwania projektu. Okazane zaufanie oraz zaangażowanie pozwoliło mi rozwinąć swoje umiejętności naukowe, które stanowią silne fundamenty mojej przyszłej kariery naukowej.

Dziękuję również wszystkim Pracownikom Pracowni Sygnalizacji Komórkowej IBM PAN za przyjacielską atmosferę pracy, wsparcie naukowe oraz kreatywne rozmowy, które dawały inspirację do tworzenia i realizacji nowych pomysłów.

Praca w Waszym gronie była zaszczytem i przyjemnością.

Specjalne podziękowania kieruję do moich Rodziców wspierających mnie podczas całej edukacji, szczególnie tej akademickiej. Wasza pomoc i zrozumienie nieustannie pozwalają mi znaleźć chęć do dalszego rozwoju i realizacji marzeń.

Dodatkowo dziękuję moim Przyjaciołom, którzy zawsze potrafili pokazać mi, że nie ma sytuacji bez wyjścia, a jedynie chwilowy zastój kreatywności. Każdego dnia sprawiacie, że jestem lepszym naukowcem, a przede wszystkim człowiekiem.

Źródła finansowania badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej

Badania stanowiące podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej zostały przeprowadzone w Instytucie Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk (PAN) w Łodzi i były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki, w ramach projektu Sonata Bis pt. „Neuromedyna U jako nowy potencjalny regulator przerzutowania w raku jelita grubego i odbytnicy” (2016/22/E/NZ3/00341), kierownik dr Patrycja Przygodzka.



Spis treści

	str.
1. Wstęp	1
1.1. Molekularne podstawy RJG	1
1.1.1. Niestabilność chromosomowa, CIN.....	2
1.1.2. Niestabilność mikrosatelitarna, MSI	3
1.1.3. Fenotyp metylatora wysp CpG, CIMP	4
1.2. Proces nowotworzenia.....	5
1.3. Komórkowe szlaki sygnalizacyjne zaangażowane w powstawanie i rozwój RJG	6
1.4. Migracja/inwazja komórek nowotworowych RJG	8
1.4.1. Ruch ameboidalny	8
1.4.2. Ruch mezenchymalny	9
1.4.3. Ruch kolektywny	9
1.5. Przejście epitelialno-mezenchymalne w procesie progresji RJG	10
1.6. Diagnostyka i klasyfikacja RJG	13
1.7. Terapie przeciwnowotworowe w RJG.....	18
1.8. Neuromedyna U	24
1.9. Receptory dla NMU.....	26
1.9.1. Przekazywanie sygnału za pomocą receptorów dla NMU.....	27
1.10. Rola NMU w chorobach nowotworowych.....	29
2. Cele pracy	32
3. Materiały i metody	33
3.1. Materiały.....	33
3.1.1. Linie komórkowe.....	33
3.1.2. Odczynniki.....	34
3.1.2.1. Odczynniki do hodowli komórek.....	34
3.1.2.2. Antybiotyki.....	34
3.1.2.3. Enzymy proteolityczne.....	34
3.1.2.4. Komercyjne zestawy odczynników.....	35
3.1.2.5. Barwniki i sondy fluorescencyjne.....	35
3.1.2.6. Peptydy.....	35
3.1.3. Przeciwciała.....	36
3.1.3.1. Przeciwciała I-rzędowe.....	36

3.1.3.2. Przeciwciała II-rzędowe.....	36
3.1.4. Bufory.....	36
3.1.5. Pozostałe odczynniki.....	37
3.2. Metody.....	38
3.2.1. Hodowla komórkowa.....	38
3.2.2. Trypsynizacja i pasażowanie komórek.....	39
3.2.3. Transfekcja i selekcja klonalna.....	39
3.2.4. Izolacja RNA.....	41
3.2.5. Odwrotna transkrypcja	41
3.2.6. Real-Time PCR.....	42
3.2.7. Izolacja białka.....	45
3.2.8. Ocena stężenia białka.....	45
3.2.9. Elektroforeza.....	46
3.2.10. Western immunoblotting.....	46
3.2.11. Immunoprecypitacja.....	47
3.2.12. Demetylacja DNA.....	48
3.2.13. Aktywacja kinaz białkowych ERK _{1/2}	48
3.2.14. Test formowania kolonii.....	49
3.2.15. Test migracji i inwazyjności z wykorzystaniem filtrów poliwęglanowych.....	49
3.2.16. Ocena zawartości NMU w mikropęcherzykach pochodzenia komórkowego.....	50
3.2.17. Mobilizacja wapnia.....	50
3.2.18. Cytometria przepływowa.....	51
3.2.19. Analiza statystyczna.....	52
4. Wyniki.....	53
4.1. Ocena poziomu ekspresji <i>NMU</i> w liniach komórkowych RJG.....	53
4.2. Ocena poziomu białka NMU w lizatach białkowych linii komórkowych RJG....	54
4.3. Identyfikacja białka NMU w medium pochodzonym z linii komórkowych RJG.....	55
4.4. Ocena poziomu białka NMU w mikropęcherzykach pochodzenia komórkowego izolowanych z medium pochodzającego z linii komórkowej HCT116.....	56
4.5. Ocena poziomu ekspresji receptorów dla NMU w liniach komórkowych RJG....	57

4.6. Analiza poziomu mRNA kodujących NMUR1 oraz NMUR2 w liniach komórkowych RJG poddanych działaniu inhibitora metylacji DNA.....	59
4.7. Wpływ NMU na aktywację receptorów NMUR1 oraz NMUR2 i uruchomienie ścieżek sygnałowych – mobilizacja wapnia wewnątrzkomórkowego.....	61
4.8. Wpływ NMU na aktywację receptora NMUR2 i uruchomienie ścieżek sygnałowych – aktywacja kinaz białkowych ERK _{1/2}	63
4.9. Charakterystyka sublinii - ocena poziomu białka NMU wlizatach komórkowych sublinii HT29 oraz Caco-2 z nadekspresją <i>NMU</i>	64
4.10. Charakterystyka sublinii - ocena poziomu białka NMU w medium pohodowlanym znad sublinii HT29 oraz Caco-2 z nadekspresją <i>NMU</i>	66
4.11. Analiza zdolności sublinii HT29 oraz Caco-2 z nadekspresją <i>NMU</i> do formowania kolonii.....	67
4.12. Analiza zdolności migracyjnych sublinii HT29 oraz Caco-2 z nadekspresją <i>NMU</i>	69
4.13. Analiza zdolności inwazyjnych sublinii HT29 oraz Caco-2 z nadekspresją <i>NMU</i>	70
4.14. Ocena wpływu inhibitora PD98059 na aktywację ścieżki sygnałowej kinaz białkowych ERK _{1/2} w komórkach sublinii Caco-2.....	71
4.15. Ocena wpływu inhibitora PD98059 na zdolności migracyjne komórek sublinii Caco-2	72
4.16. Analiza obecności powierzchniowych podjednostek integrynowych zaangażowanych w proces migracji w subliniach HT29 oraz Caco-2 z nadekspresją <i>NMU</i>	73
5. Dyskusja.....	74
6. Wnioski.....	83
7. Streszczenie.....	84
8. Abstract.....	86
9. Bibliografia.....	88
10. Alfabetyczny wykaz skrótów umieszczony w pracy.....	102
11. Chronologiczny wykaz rycin umieszczonych w pracy.....	108
12. Chronologiczny wykaz tabel umieszczonych w pracy.....	109

1. Wstęp

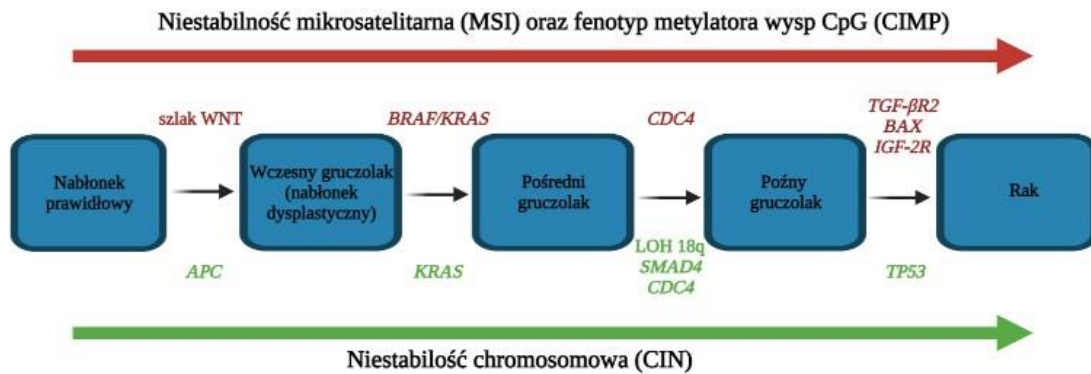
Dysfunkcje układu krążenia i oddechowego, a ponadto cukrzyca i nowotwory, są obecnie przyczyną większości zgonów na świecie. W 2020 roku zanotowano ponad 19 milionów nowych przypadków zachorowań oraz 10 milionów zgonów z powodu różnego typu nowotworów. Wśród nich 1,9 miliona zachorowań oraz 930 tysięcy zgonów stanowiły nowotwory jelita grubego. Wynika z tego, że 1 na 10 osób, u której zdiagnozowano chorobę nowotworową, umiera z powodu raka jelita grubego (RJG) (Sung i wsp. 2021, Ferlay i wsp. 2018).

Zapadalność na RJG jest związana z wieloma czynnikami etiologicznymi, definiowanymi przez tryb i styl życia pacjenta. Do najważniejszych zalicza się palenie papierosów, otyłość i nadwagę, cukrzycę, brak aktywności fizycznej, dietę bogatą w dużą ilość czerwonego mięsa oraz wysoce przetworzone produkty mięsne (wysoka zawartość związków N-nitrozowych), ale ubogą w błonnik. Zwraca się także uwagę na spożywanie nadmiernej ilości alkoholu. Najwyższy wskaźnik zachorowalności na RJG odnotowywany jest w krajach szybko rozwijających się (Zyśk i wsp. 2014). Około 80% zdiagnozowanych to przypadki sporadyczne, podczas gdy jedynie 20% przypadków ma podłoże genetyczne. Ryzyko zachorowania wzrasta wraz z wiekiem – około 90% przypadków jest diagnozowanych wśród pacjentów, którzy ukończyli 50 rok życia. Grupę podwyższonego ryzyka stanowią pacjenci z obciążającym wywiadem rodzinnym. Osoby stanowiące grupę szczególnej uwagi to te, których krewni cierpią, np. z powodu rodzinnej polipowatości gruczolakowatej (FAP, ang. *Familial Adenomatous Polyposis*) lub przewlekłego nieswoistego zapalenia jelit (IBD, ang. *Inflammatory Bowel Disease*). Ponadto częstość zachorowań jest dwukrotnie wyższa wśród mężczyzn niż wśród kobiet (Fischer i wsp. 2018, de Matos i wsp. 2020).

1.1. Molekularne podstawy powstawania RJG

Przekształcenie komórek nabłonka jelita grubego w gruczolakoraki o charakterze inwazyjnym spowodowane jest nagromadzeniem zmian genetycznych oraz epigenetycznych (Ryc. 1). Najlepiej poznanymi i opisanymi w tym aspekcie są geny supresorowe: *APC* (ang. *Adenomatous Polyposis Coli*), *TP53* (ang. *Tumor Protein P53*), *SMAD4* (ang. *SMAD Family Member 4*), oraz onkogeny: *KRAS* (ang. *Kirsten Rat Sarcoma Viral Proto-Oncogene*), *BRAF* (ang. *B-Raf Proto-Oncogene*), podjednostka katalityczna α *PI3K* (*PIK3CA*, ang. *PI3K Catalytic Subunit- α*). Akumulacja mutacji genów inicjuje progresję RJG poprzez deregulację szlaków modulujących różnicowanie,

proliferaację i apoptozę komórek. W RJG można wyróżnić trzy molekularne ścieżki rozwoju choroby: CIN (ang. *Chromosomal Instability*), MSI (ang. *MicroSatelite Instability*), oraz fenotyp metylatora wysp CpG (CIMP, ang. *CpG Island Methylator Phenotype*) (Pino i Chung 2010, Dienstmann i wsp. 2017, Harada i Morlote 2020).



Rycina 1. Model powstawania RJG (na rycinie skrótami oznaczono: *BRAF* - B-Raf Proto-Oncogene; *KRAS* - Kirsten Rat Sarcoma Viral Proto-Oncogene; *CDC4* - Cell division control protein 4; *TGF-βR2* - Transforming Growth Factor β Receptor II; *BAX* - BCL2 Associated X Protein; *IGF-2R* - Insulin Like Growth Factor 2 Receptor; *APC* - Adenomatous Polyposis Coli; *LOH 18q* - loss of heterozygosity at chromosome 18; *SMAD4* - SMAD Family Member 4; *TP53* - Tumor Protein P53) (na podstawie: Malki i wsp. 2020).

1.1.1. Niestabilność chromosomowa, CIN

Niestabilność chromosomowa nazywana jest także klasyczną ścieżką rozwoju RJG. Szacuje się, że około 85% wszystkich przypadków tego typu nowotworu wywołana jest właśnie poprzez CIN. Charakterystyczne w przypadku CIN są zmiany liczby i struktury chromosomów, a w konsekwencji brak równowagi w liczbie chromosomów (aneuploidia) i wysoka częstotliwość utraty heterozygotyczności. Po raz pierwszy ten typ rozwoju RJG został opisany przez Erica Fearona oraz Berta Vogelsteina w 1990 roku (Fearon i Vogelstwin 1990, Harada i Morlote 2020). Typowymi nieprawidłowościami kariotypu obserwowanym w guzach z CIN towarzyszy akumulacja charakterystycznego zestawu mutacji w określonych genach supresorowych oraz onkogenach. W przypadku braku prawidłowo funkcjonującego białka APC dochodzi do, konstytutywnie aktywowanej sygnalizacji szlaku Wnt. Mutacje germinalne w genie *APC* powodują rodzinną polipowatość gruczolakowatą, czyli główną przyczynę dziedzicznych predyspozycji prowadzących do rozwoju RJG. Z kolei mutacje somatyczne *APC* stwierdza się w ponad 80% sporadycznych guzów jelita grubego. Utratę

heterozygotyczności (LOH, ang. *Loss Of Heterozygosity*) chromosomu 5q potwierdza się w 30% – 40% przypadków RJG. APC kontroluje proliferację, utrzymuje stabilność chromosomów, różnicowanie, migrację komórek i apoptozę. Zgodnie z przyjętym modelem Vogelsteina, po wystąpieniu mutacji prowadzących do zmiany funkcji APC, następują najczęściej mutacje w onkogenach *KRAS* i *PIK3CA*, a następnie mutacje genów supresorowych *TP53* oraz *SMAD4* (Ryc. 1). W 2005 roku powstała idea stworzenia międzynarodowego projektu, którego głównym celem była analiza molekularna 20 różnych typów nowotworów. Dotychczas w ramach projektu TCGA (ang. *The Cancer Genome Atlas*) przeanalizowano ponad 20 tysięcy tkanek pochodzących z nowotworów pierwotnych oraz ich tkanek sąsiadujących pochodzących z 33 różnych typów nowotworów, w tym z RJG. W ramach tego projektu wskazano zmiany w liczbie chromosomów istotnych dla CIN, odnotowano utratę chromosomów: 1p, 4q, 5q, 8q, 14q, 20p i 22q oraz zwiększenie liczby chromosomów: 1q, 7p, 7q, 8p, 8q, 12q, 13q, 19q, 20p i 20q. Wytypowano również 24 geny, które uległy mutacji. I tak oprócz powszechnie znanych genów, jak *APC*, *KRAS*, *SMAD4*, *TP53*, zmiany zaobserwowano również w genach *ARID1A* (ang. *AT-rich Interaction Domain 1A*), *SOX9* (ang. *SRY-Box Transcription Factor 9*) i *AMER1* (ang. *APC Membrane Recruitment Protein 1*) (Pino i Chung 2010, Fearon i Vogelstein 1990, The Cancer Genome Atlas Network 2012, Harada i Morlote 2020).

1.1.2. Niestabilność mikrosatelitarna, MSI

Niestabilność mikrosatelitarna dotyczy krótkich powtarzających się tandemowo fragmentów DNA, które znajdują się w sekwencjach flankujących i intronach. W przeciwieństwie do CIN aneuploidia pojawia się sporadycznie, a uruchomienie ścieżki MSI, związane jest z mutacją jednego z genów systemu MMR (ang. *DNA Mismatch Repair*): *MLH1* (ang. *MutL Homolog 1*), *MLH3* (ang. *MutL Homolog 3*), *MSH2* (ang. *MutS Homolog 2*), *MSH3* (ang. *MutS Homolog 3*), *MSH6* (ang. *MutS Homolog 6*), *PMS1* (ang. *PMS Homolog 1*), *PMS2* (ang. *PMS Homolog 2*), a także *EXO1* (ang. *Exonuclease 1*) lub wyciszeniem promotora *MLH1* przez hipermetylację. Na początku lat 90-tych Lynch i wsp. (1991) prowadzili badania molekularne nad dziedzicznym RJG, niezwiązanym z tworzeniem polipów, tzw. zespołem Lyncha, gdzie zaobserwowali mutacje w wymienionych genach odpowiedzialnych za naprawę DNA. Szacuje się, że ścieżka MSI odpowiedzialna jest za około 15% wszystkich przypadków RJG, w tym od 3 do 5% stanowi zespół Lyncha, a pozostałe 10-12% związane jest z metylacją sekwencji promotorowej *MLH1*. W przypadku MSI często obserwuje się

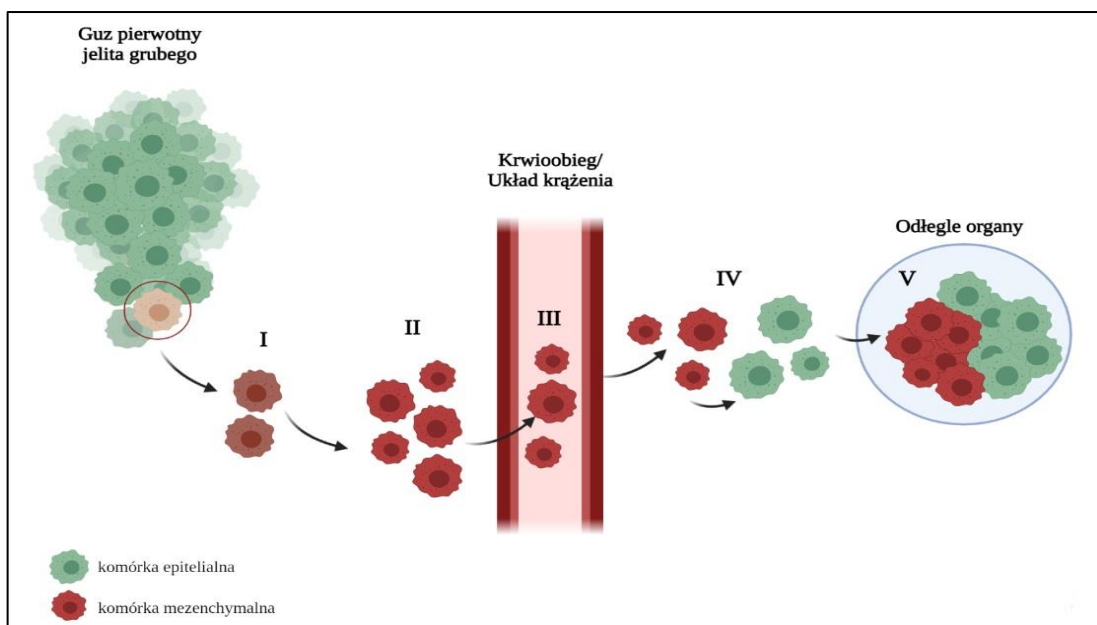
również mutacje genów: *BRAF* (*V600E*, walina w pozycji 600 została zamieniona na kwas glutaminowy), *TGFβ II* (ang. *Transforming Growth Factor-βII*) oraz *BAX* (ang. *BCL2 Associated X Protein*) (Boland i Goel 2010, Harada i Morlote 2020, de'Angelis i wsp. 2018).

1.1.3. Fenotyp metylatora wysp CpG, CIMP

Ostatni model ścieżki prowadzącej do powstawania RJG, zaproponowany w 1999 roku, opiera się na hipermetylacji regionów promotorowych bogatych w wyspy CpG (Toyota i wsp. 1999). Na skutek tego procesu dochodzi do wyciszenia ekspresji puli genów, których produkty są głównie odpowiedzialne za kontrolowanie prawidłowych podziałów komórek. Najnowsze dane sugerują, że jedynie 17% wszystkich przypadków RJG stanowi CIMP (Harada i Morlote 2020). Obecnie trudno jest jednoznacznie przedstawić przyczyny oraz konsekwencje związane z CIMP. Udowodniono natomiast, że wraz z fenotypem metylatora wysp CpG, w komórkach nowotworowych występuje również mutacja *BRAF V600E*, oraz hipermetylacja w regionu promotorowego genów: *MLH1*, *MGMT* (ang. *O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase*), *CDKN2A* (ang. *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*), a więc szlaki CIMP oraz MSI w pewnym stopniu się pokrywają, podczas gdy jednoczesne występowanie mutacji genów szlaku CIMP oraz CIN jest rzadko spotykane. Na podstawie badań metylacji powstało kilka klasyfikacji CIMP, z czego najbardziej powszechny jest podział na nowotwory CIMP-dodatnie oraz CIMP-ujemne. Warto podkreślić, że nie istnieje jeden ogólnie przyjęty sposób podziału. Różnice dotyczą ilości genów, których region promotorowy uległ hipermetylacji (Toyota i wsp. 1999, Mojarad i wsp. 2013, Harada i Morlote 2020). Zazwyczaj, jeśli region promotorowy jest hipermetylowany w więcej niż trzech genach, uznaje się, że nowotwór jest CIMP-dodatni, jednak jeśli hipermetylację regionu promotorowego zaobserwowano w jednym lub dwóch genach, takie nowotwory uznaje się za CIMP-ujemne (Weisenberger i wsp. 2006, Ogino i wsp. 2006, 2007). Najnowszy zaprezentowany panel składa się z 8 genów, z czego hipermetylacja regionu promotorowego w pięciu genach oznacza nowotwory CIMP-dodatnie (Tapial i wsp. 2019).

1.2. Proces nowotworzenia

Na poziomie komórkowym proces nowotworzenia jest procesem wieloetapowym, obejmującym szereg mutacji genetycznych, prowadzących do zwiększenia proliferacji, przeżywalności oraz inwazyjności komórek. Pierwszym etapem tego procesu jest inicjacja, która prowadzi do mutacji DNA pojedynczej komórki, w efekcie czego dochodzi do jej wzmożonych podziałów oraz przekazania nieprawidłowych informacji genetycznych komórkom potomnym. Kolejnym etapem jest promocja, polegająca na aktywacji onkogenów oraz pojawieniu się nowych mutacji, głównie w tych genach, które odpowiadają za zahamowanie procesu apoptozy. Skutkiem promocji jest powstanie heterogennego guza, zbudowanego z komórek zdolnych do migracji i inwazji, co prowadzi do progresji choroby. Około 90% zgonów związanych z nowotworem jelita grubego jest spowodowanych przerzutami do odległych narządów. Na Rycinie 2 przedstawiono etapy prowadzące do powstania przerzutów nowotworowych, na które składają się: (I) utrata właściwości nabłonkowych i inwazja komórek do okolicznej macierzy; (II) przejście komórek do układu krążenia; (III) transport ogólnoustrojowy; (IV) przedostanie się komórek guza do mięszu odległych tkanek; (V) kolonizacja odległych organów i tworzenie nowych guzów (Scott i wsp. 1984, Cao i wsp. 2015, Pretzsch i wsp. 2019).



Rycina 2. Schemat powstania przerzutów w RJG (Cao i wsp. 2015, Pretzsch i wsp. 2019).

1.3. Komórkowe szlaki sygnalizacyjne zaangażowane w powstawanie i rozwój RJG

Dotychczasowe badania pokazują, że progresji RJG towarzyszy rozregulowanie wielu szlaków sygnałowych (Tabela 1). Szlaki Wnt, PI3K/AKT, Hedgehog, EGFR, Notch, NF- κ B i MAPK/ERK promują progresję nowotworu, natomiast szlaki BMP/SMAD, AMPK i Hippo ją hamują. Szlaki zależne od poziomu białka RhoA (ang. *Ras Homolog Family Member A*) zaangażowane są w metastazę. Z kolei szlaki sygnałowe związane z białkiem JNK (ang. *c-Jun N-terminal Kinases*) mogą wpływać na metastazę poprzez promowanie lub hamowanie tego procesu. Wszystkie wymienione powyżej szlaki sygnałowe oddziałują między sobą, a skomplikowane interakcje pomiędzy nimi są tematem intensywnych badań naukowych. Obecna wiedza na ten temat zebrana na podstawie prac przeglądowych została przedstawiona w Tabeli 1 (Wan i wsp. 2020, Koveitypour i wsp. 2019).

Tabela 1. Szlaki sygnałowe zaangażowanych w rozwój i progresję RJG (na podstawie: Wan i wsp. 2020; Koveitypour i wsp. 2019).

Nazwa szlaku	Mechanizm/funkcja
Wnt	<ul style="list-style-type: none"> • promowanie proliferacji i metastazy • przyspieszanie podziałów komórkowych • hamowanie apoptozy i różnicowania
PI3K/AKT	<ul style="list-style-type: none"> • promowanie proliferacji, migracji, inwazji, angiogenezy • hamowanie apoptozy i różnicowania
Hedgehog	<ul style="list-style-type: none"> • promowanie proliferacji, przeżycia komórek, migracji oraz inwazji • hamowanie apoptozy oraz różnicowania
EGFR	<ul style="list-style-type: none"> • promowanie proliferacji, angiogenezy oraz różnicowania komórek • hamowanie apoptozy
Notch	<ul style="list-style-type: none"> • promowanie proliferacji, EMT, angiogenezy oraz przeżycia komórek
NF-κB	<ul style="list-style-type: none"> • regulacja odpowiedzi zapalnej • promowanie proliferacji, metastazy, angiogenezy
MAPK/ERK	<ul style="list-style-type: none"> • przyspieszanie proliferacji i podziałów komórkowych
BMP/SMAD	<ul style="list-style-type: none"> • promowanie apoptozy komórek i różnicowania • hamowanie proliferacji
AMPK	<ul style="list-style-type: none"> • regulowanie szlaków metabolicznych • hamowanie proliferacji, różnicowania i migracji
Hippo	<ul style="list-style-type: none"> • hamowanie proliferacji, migracji, samoodnowy
RhoA	<ul style="list-style-type: none"> • promowanie proliferacji, apoptozy, metastazy i odróżnicowania
JNK	<ul style="list-style-type: none"> • hamowanie amplifikacji centrosomów oraz promowanie apoptozy komórek • promowanie proliferacji

1.4. Migracja/inwazja komórek nowotworowych RJG

Komórki nowotworowe, w celu kolonizacji nowych tkanek i organów, muszą przedostać się przez błonę podstawną, następnie przechodzą przez macierz zewnątrzkomórkową i przedostają się dalej przez ścianę naczyń krwionośnych do krwioobegu. Powstawanie przerzutów nowotworowych jest długotrwałym i skomplikowanym procesem, na który w pierwszym etapie składają się zmiany fenotypowe komórek związane z produkcją określonych enzymów, nabyciem specyficznych receptorów inwazyjnych, zdolności do aktywnego ruchu, a także wyciszenia aktywności komórek układu odpornościowego. Plastyczność komórek nowotworowych jest kluczową cechą umożliwiającą zmianę fenotypu, a także nabywanie przez nie cech inwazyjnych, czego skutkiem może być ich zdolność do przechodzenia przez złożone i różnorodne środowiska. Komórki mogą wędrować pojedynczo (migracja typu ameboidalnego lub migracja typu mezenchymalnego) oraz zbiorowo (migracja kolektywna). Zależnie od typu migracji, komórki nowotworowe będą wykazywały charakterystyczne cechy połączeń międzykomórkowych, aktywności proteaz oraz budowy cytoszkieletu (Krakhmal i wsp. 2015, Wu i wsp. 2020).

1.4.1. Ruch ameboidalny

Za najbardziej podstawowy i jednocześnie najbardziej prymitywny typ migracji pojedynczej komórki uznaje się ruch ameboidalny. Dotyczy on głównie komórek krwi i układu immunologicznego (np. neutrofile). W ten sposób migruje także wiele typów komórek nowotworowych (np. niedrobnokomórkowego raka płuc lub czerniaka). Charakterystyczne dla migracji za pomocą ruchu ameboidalnego jest poruszanie się komórek z dużą prędkością, zmiana morfologii spowodowana ich silnym odkształcaniem się, słabe oddziaływania pomiędzy komórką a macierzą zewnątrzkomórkową, zanik adhezji, a także utrata polarności komórek. Komórki przemieszczające się za pomocą ruchu ameboidalnego zazwyczaj są okrągłe lub owalne. Powstałe zmiany kształtu generowane są przez cytoszkielet aktynowy i zależą od pobudzenia białka RhoA oraz jego efektora – kinazy ROCK (ang. *Rho-associated Protein Kinase*). Do przemieszczania się za pomocą ruchu ameboidalnego komórki wykorzystują powstałe pęcherzykowate wypustki i/lub pseudopodia, które umożliwiają im swobodne przemieszczanie się przez macierz zewnątrzkomórkową (Krakhmal i wsp. 2015, Wu i wsp. 2020, Shatkin i wsp. 2020). Najnowsze badania pokazują, że inwazyjne komórki RJG są zdolne modyfikować proces migracji w komórkach RJG o słabym potencjale

inwazyjnym. Wykazano, że komórki linii SW620 są w stanie indukować ameboidalny fenotyp w mniej agresywnych komórkach linii SW480. Wykorzystują do tego celu czynniki transportowane przez egzosomy. Są to m.in. białka związane z cytoszkieletem, w tym te aktywujące szlak RhoA/ROCK (Schillaci i wsp. 2017).

1.4.2. Ruch mezenchymalny

Drugi typ migracji pojedynczej komórki to ruch mezenchymalny. Ten typ jest charakterystyczny dla fibroblastów, komórek śródbłonna i komórek mięśni gładkich, a także komórek nowotworowych pochodzenia epitelialnego. Typową cechą takiej migracji jest utrata polarność oraz nabywanie bardziej wydłużonego, wrzecionowatego kształtu przez te komórki. W porównaniu z komórkami poruszającymi się ruchem ameboidalnym, komórki wykazujące ruch mezenchymalny są znacznie wolniejsze i wymagają zaangażowania bardziej złożonych procesów oraz pobudzenia białek: RhoA, CDC42 (ang. *Cell Division Control Protein 42*), Rac1 (ang. *Rac1 Family Small GTPase 1*). Sygnał pobudzający migrację w ruchu mezenchymalnym powoduje polimeryzację aktyny oraz tworzenie wypustek, tzw. lamelipodiów oraz filopodiów na krawędzi komórki. Udowodniono, że podczas mezenchymalnego typu migracji komórki nowotworowe przechodzą przez kilka etapów, na które składają się:

- tworzenie wypustek (polaryzacja i protruzja),
- tworzenie płytek przylegania (ang. *focal adhesions*),
- proteoliza macierzy zewnątrzkomórkowej,
- kurczenie się włókien aktynomiozynowych,
- retrakcja krawędzi opóźnionej i przemieszczenie uropodu (Krakhmal i wsp. 2015, Wu i wsp. 2020, Shatkin i wsp. 2020).

1.4.3. Ruch kolektywny

Ruch kolektywny jest typem migracji zbiorowej komórek. Najczęściej obserwuje się go podczas gojenia ran, morfogenezy oraz inwazji komórek nowotworowych (np. raka jelita grubego, raka piersi, raka endometrium). Ruch kolektywny polega na migracji całych skupisk komórek, które nie tracąc połączeń międzykomórkowych i zachowując prawidłową polaryzację, mogą ze sobą współpracować na zasadzie hierarchii. Połączenia międzykomórkowe, stabilizowane są między innymi przez kadheryny (głównie N, VE, E), immunoglobulinowe receptory adhezyjne (NCAM, ALCAM) lub integryny (głównie

β 1). W procesie migracji kolektywnej powstaje funkcjonalna jednostka o asymetrycznym układzie przód-tył. Komórki znajdujące się z przodu układu (krawędź wiodąca) są aktywne i odpowiadają za przemieszczanie. Z kolei komórki znajdujące się z tyłu (krawędź spływu) pozostają bierne, a ich ruch odbywa się za pośrednictwem komórek znajdujących się w części frontальной. Udowodniono, że komórki w części frontальной różnią się profilem ekspresji genów, jak i morfologią w porównaniu do komórek znajdujących się z tyłu. Komórki frontальные są rozproszone oraz wydłużone, a ich wygląd jest zbliżony do komórek poruszających się ruchem mezenchymalnym. Komórki znajdujące się z tyłu są bardziej zbite i owalne (Kawauchi 2012, Krakhmal i wsp. 2015, Mayor i Etienne-Manneville 2016, Janaszewska i wsp. 2020, Wu i wsp. 2020). W przypadku RJG pokazano, że komórki gruczolakoraka odbyticy linii RCM-1 wykazujące wysokie zdolności do tworzenia przerzutów do wątroby, migrują zbiorowo i wykazują ekspresję genu *MT1-MMP* (ang. *Membrane-type 1 Matrix Metalloproteinase*) tylko w komórkach frontálních (Nabeshima i wsp. 2000). Z kolei, Ghosh i wsp. (2021) udowodnili, że PLP2 (ang. *Proteolipid Protein 2*) odgrywa istotną rolę w migracji kolektywnej komórek linii SW480, poprzez modulowanie ich właściwości promigracyjnych w układzie 2D. PLP2 związane jest z białkiem ZO-1 (ang. *Zonula Occludens-1*), które odpowiedzialne jest za zmianę organizacji cytoszkieletu aktywny wskutek aktywacji Rac1. Podwyższony poziom białka Rab11, promuje również zbiorową migrację komórek linii HT29 poprzez zwiększenie poziomu E-kadheryny oraz aktywację Rac1 (Chung i wsp. 2016).

1.5. Przejście epitelialno-mezenchymalne w procesie progresji RJG

Zjawisko przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT, ang. *Epithelial-to-Mesenchymal Transition*) po raz pierwszy zostało zaobserwowane w 1968 roku, podczas badań nad procesem embriogenezy, gdzie zidentyfikowano różne fenotypy komórkowe. W latach 70-tych potwierdzono powyższe obserwacje w badaniach nad nowotworami, wskazując, że komórki nabłonkowe oraz mezenchymalne współistnieją w guzach macicy. W kolejnych latach udowodniono, że komórki nabłonkowe mogą zmienić swój fenotyp na mezenchymalny (Hay 1995). Obecnie wiadomo, że EMT towarzyszy zarówno prawidłowym, jak i patologicznym procesom komórkowym. W przypadku raka uważa się, że jednym z procesów determinujących plastyczność komórek nowotworowych jest proces EMT, wskutek czego zwiększają one swoje zdolności migracyjne i/lub inwazyjne. Podczas EMT komórki tracą połączenia komórka-komórka,

biegunowość wierzchołkowo-podstawną i markery nabłonkowe, nabywając przy tym wrzecionowaty kształt i markery mezenchymalne. Proces EMT regulowany jest na różnych poziomach, m.in. poprzez czynniki transkrypcyjne, modyfikacje potranslacyjne białek oraz szlaki sygnałowe (Georgakopoulos-Soares i wsp. 2020, Vu i Datta 2017, Zhang i wsp. 2021b, Morgado-Diaz i wsp. 2022). Co ciekawe, komórki nowotworowe, które wskutek EMT przedostały się do innych tkanek, są zdolne do przejścia mezenchymalno-epitelianego (MET, ang. *Mesenchymal-to-Epithelial Transition*). MET jest procesem przeciwnym do EMT, którego rola w rozwoju nowotworów nie jest do końca poznana. Uważa się, że MET towarzyszy tworzeniu i stabilizacji przerzutów odległych poprzez umożliwienie komórkom rakowym odzyskania właściwości nabłonkowych i zajęcie nowej niszy (Georgakopoulos-Soares i wsp. 2020, Vu i Datta 2017, Zhang i wsp. 2021b, Morgado-Diaz i wsp. 2022).

Najczęściej badanymi czynnikami transkrypcyjnymi indukującymi EMT w komórkach, w tym także w RJG są: SNAI1 (ang. *Snail Family Transcriptional Repressor 1*), SNAI2 (ang. *Snail Family Transcriptional Repressor 2*), TWIST1 (ang. *Twist Family BHLH Transcription Factor 1*), TWIST2 (ang. *Twist Family BHLH Transcription Factor 2*), ZEB1 (ang. *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*) i ZEB2 (ang. *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2*), które hamują głównie ekspresję genu dla E-kadheryny, głównego białka adhezyjnego odpowiadającego za utrzymanie połączeń międzykomórkowych i stabilizację polaryzacji komórek nabłonka (Pretzsch i wsp. 2019, Cao i wsp. 2015, Vu i Datta 2017, Zhang i wsp. 2021b, Morgado-Diaz i wsp. 2022). SNAI1 oraz SNAI2 należą do rodziny czynników transkrypcyjnych z motywem palca cynkowego, których zwiększenie ekspresji odgrywa istotną rolę w promowaniu inwazyjności oraz powstawania przerzutów w RJG. SNAI1 wiąże się do sekwencji E-box (ang. *Enhancer box*) znajdującej się w promotorze genu dla E-kadheryny, do którego następnie przyłączają się deacetylazy histonów, HDACs (ang. *Histone Deacetylases*), LSD1 (ang. *Lysine-Specific Demethylase 1*), G9a oraz SUV39H (ang. *SUV39H1 Histone Lysine Methyltransferase*). Kompleks ten prowadzi do modyfikacji histonów H3K4, H3K9, H3K27, skutkiem czego jest zahamowanie ekspresji genu kodującego E-kadherynę. Udowodniono, że SNAI1 może też indukować ekspresję genów kodujących białka związane z fenotypem mezenchymalnym, takie jak fibronektyna, N-kadheryna i kolagen (Pretzsch i wsp. 2019, Cao i wsp. 2015, Vu i Datta 2017, Zhang i wsp. 2021b). Zaobserwowano, że tkanki pobrane od pacjentów z RJG, charakteryzują się zwiększonym poziomem N-kadheryny oraz zmniejszonym poziomem

E-kadheryny w porównaniu do prawidłowego nabłonka jelit. Zmiany te korelują z powstawaniem przerzutów w węzłach chłonnych oraz inwazją do naczyń krwionośnych i/lub limfatycznych (Yan i wsp. 2015). Natomiast zwiększona ekspresja czynnika transkrypcyjnego *SNAI2* koreluje z podwyższeniem poziomu wimentyny w tkankach pobranych od pacjentów z RJG w stadium od I do IV. Otrzymane wyniki sugerują, że zwiększony poziom wimentyny związany jest z progresją nowotworu oraz tworzeniem przerzutów do węzłów chłonnych oraz wątroby (Toiyama i wsp. 2013).

Czynniki transkrypcyjne ZEB1 oraz ZEB2 tworzą kompleks wiążący sekwencję E-box i funkcjonują zarówno jako czynniki hamujące transkrypcję genów charakterystycznych dla nabłonka, jak i aktywatory transkrypcji genów mezenchymalnych. Udowodniono, że obniżenie ekspresji *ZEB1* powoduje redukcję migracji komórek RJG oraz wzrost ekspresji genów, takich jak: *CRB3* (ang. *Crumbs Homolog 3*) lub *LGL2* (ang. *Lethal Giant Larvae 2*), odpowiedzialnych za polarność komórek. Ekspresja *LGL2*, jest bezpośrednio regulowana przez ZEB1, obniżenie ekspresji *LGL2* jest związane z indukcją EMT oraz promowaniem przerzutów w RJG (Spaderna i wsp. 2008, Vu i Datta 2017, Cao i wsp. 2015, Zhang i wsp. 2021b, Morgado-Diaz i wsp. 2022).

W RJG zwiększona ekspresja *TWIST1* oraz *TWIST2* ograniczona jest głównie do tkanek zrębu nowotworu. Podobnie jak inne czynniki, TWIST reguluje EMT zarówno poprzez represję, jak i aktywację transkrypcji. Udowodniono, że TWIST1 hamuje ekspresję genu dla E-kadheryny, jednocześnie indukując ekspresję genu dla N-kadheryny. Dodatkowo zwiększona ekspresja *TWIST1* w komórkach zrębu RJG koreluje z przerzutami do węzłów chłonnych, inwazją naczyń limfatycznych, inwazją okołonerkową oraz gorszymi rokowaniami (Galvan i wsp. 2014, Vu i Datta 2017, Cao i wsp. 2015, Zhang i wsp. 2021b).

Na przebieg procesu EMT w komórkach RJG ma także wpływ nieprawidłowe funkcjonowanie szlaków sygnałowych, takich jak TGF- β /SMAD oraz Wnt/ β -katenina. Utrata funkcji białka SMAD4 związana jest ze zmniejszeniem poziomu E-kadheryny oraz wzrostem poziomu β -kateniny. Komórki RJG pozbawione białka SMAD4 oraz traktowane TGF- β zwiększyły swoje zdolności migracyjne, inwazyjne, a także metastatyczne (Itatani i wsp. 2019). Białko SMAD4 istotne jest również dla prawidłowego funkcjonowania STAT3 (ang. *Signal Transducer And Activator Of Transcription 3*), odpowiedzialnego za proliferację, migrację i apoptozę komórek. Brak białka SMAD4 prowadzi do nieprawidłowego funkcjonowania STAT3, czego efektem

jest indukcja procesu EMT oraz ekspresji czynnika transkrypcyjnego ZEB1 (Cao i wsp. 2015). Dodatkowo brak białka SMAD4 powoduje zmiany sygnalizacji zależnej od szlaku BMP (ang. *Bone Morphogenetic Protein*) z hamującego na promujący metastazę, aktywując białka Rho oraz ROCK, a tym samym promując proces EMT (Jung i wsp. 2017, Cao i wsp. 2015, Vu i Datta 2017, Tzavlaki i Moustakas 2020). W przypadku zmian w aktywności szlaku Wnt/ β -katenina udowodniono, że zwiększanie poziomu cytozolowej β -kateniny jest charakterystyczne dla fenotypu mezenchymalnego komórek RJG. Dodatkowo kompleks β -katenina/TCF4 bezpośrednio aktywuje czynnik transkrypcyjny ZEB1, a także zwiększa poziom MMP9 (ang. *Matrix MetalloPeptidase 9*) oraz LAMC2 (ang. *Laminin Subunit Gamma 2*), których rola w progresji RJG jest udokumentowana (Cao i wsp. 2015, Vu i Datta 2017, Bian i wsp. 2020, Nie i wsp. 2020).

Występowanie wymienionych powyżej zmian prowadzących do powstania RJG, nadawania komórkom RJG cech bardziej migracyjnych oraz inwazyjnych, a w efekcie tworzenie przerzutów, potwierdza, że ten typ nowotworu jest skomplikowaną na poziomie zmian molekularnych chorobą, której rozwój wiąże się także z trudnym do określenia przebiegiem oraz niepomyślnym rokowaniem. Aby zapobiegać rozwojowi RJG, istotne jest prowadzenie odpowiednich działań profilaktycznych. Zwraca się także uwagę na potrzebę stałego opracowywania nowych metod diagnostycznych, które pozwolą przede wszystkim na podwyższenie stopnia wykrywalności wczesnych, nieinwazyjnych stadiów RJG (Fischer i wsp. 2018).

1.6. Diagnostyka i klasyfikacja RJG

Lokalizacja oraz stopień zaawansowania guza pierwotnego mają kluczowe znaczenie dla obrazu klinicznego RJG. Aby zmniejszyć ryzyko późnego rozpoznania choroby, istotne jest prowadzenie badań przesiewowych, które mają na celu wczesne wykrycie nowotworu lub nawet stanu przednowotworowego. Najczęściej stosowanym testem w badaniach przesiewowych jest badanie kału na krew utajoną (FOBT, ang. *Fecal Occult Blood Test*). Test ten umożliwia wykrycie niewielkich ilości krwi w próbkach kału, co może świadczyć o zmianach przednowotworowych. Podobnym testem do FOBT jest immunochemiczne badanie kału (FIT, ang. *Fecal Immunochemical Test*), które jest nowszą i bardziej czułą wersją FOBT. FOBT polega na wykorzystaniu wskaźnika chemicznego, który pokazuje zmianę koloru w przypadku obecności krwi. Z kolei metoda FIT wykorzystuje przeciwciała skierowane przeciwko ludzkiej hemoglobinie do wykrywania krwi w kale. Najnowszą techniką jest FIT-DNA

(ang. *Multitarget Stool DNA Testing*), czyli połączenie immunochemicznego badania kału (FIT) oraz analizy wyizolowanego DNA. Test FIT-DNA obejmuje detekcję 21 mutacji występujących w genach charakterystycznych dla zmian towarzyszących RJG, w tym:

- trzech w genie *KRAS*,
- dziesięć w genie *APC*,
- ośmiu w genie *TP53* (Simon 2016, Keum i Giovannucc 2019).

W ramach badań przesiewowych coraz częściej stosuje się bardziej inwazyjne metody, jak endoskopia odcinka dystalnego (sigmoidoskopia) lub całej okrężnicy (kolonoskopia). Uznaje się jednak, że wykonanie pełnej kolonoskopii w połączeniu z biopsją do badania histopatologicznego to złoty standard w diagnostyce wykrywania zmian RJG. Jednocześnie duża część pacjentów ma wykonywaną niepełną kolonoskopię, np.: z powodu nieodpowiedniego przygotowania jelit do zabiegu, złej tolerancji badania, niedrożności jelit lub powodu innych problemów technicznych. W takich przypadkach stosuje się pomocnicze metody diagnostyki, takie jak kolonografia (kolonoskopia wirtualna), która przeprowadzana jest za pomocą tomografu komputerowego. Dodatkowo wykonywana jest tomografia komputerowa klatki piersiowej i jamy brzusznej oraz badania biochemiczne, m.in. pełna morfologia krwi, ocena parametrów wydolności wątroby i czynności nerek czy oznaczenie antygenu rakowo-śródowego (CAE, ang. *Serum Carcinoembryonic Antigen*) w surowicy. Wykonanie pełnej diagnostyki umożliwia wykrycie, a także dokładną ocenę zmian nowotworowych oraz pozwala stwierdzić obecność lub brak przerzutów (Simon 2016, Buccafusca i wsp. 2019).

Stopień zaawansowania RJG oceniany jest m.in. na podstawie zmian histopatologicznych, czyli inwazji ściany jelita przez komórki nowotworowe, pojawienia się przerzutów do węzłów chłonnych oraz przerzutów do narządów odległych. Obecnie stosowaną przez lekarzy klasyfikacją zaawansowania RJG jest klasyfikacja TNM (ang. *Tumor-Node-Metastases Classification*), która zastąpiła mniej precyzyjne i obecnie uznawane za historyczne – systemy klasyfikacji Dukes’a i Astler-Coller. Klasyfikacja TNM, opiera się na ocenie trzech najistotniejszych czynników podczas rozwoju choroby nowotworowej:

- T (ang. *Tumor*) – wielkości guza pierwotnego,
- N (ang. *Nodal*) – obecności (lub braku) przerzutów w węzłach chłonnych,
- M (ang. *Metastases*) – obecności (lub braku) przerzutów odległych.

Po określeniu powyższych parametrów, RJG zostaje sklasyfikowany pod względem stopnia zaawansowania klinicznego, do jednego z pięciu stopni:

- Stopień 0 – rak przedinwazyjny, *in situ*,
- Stopień I – komórki nowotworowe przemieściły się do błony podśluzówkowej,
- Stopień II – komórki nowotworowe obecne w najbardziej zewnętrznych warstwach okrężnicy lub odbytnicy,
- Stopień III – komórki nowotworowe obecne w regionalnych węzłach chłonnych,
- Stopień IV – występują przerzuty odległe do narządów odległych.

Postęp technologiczny i rozwój metod badawczych pozwolił na przedstawienie nowych klasyfikacji służących do oceny stopnia zaawansowania RJG. Jak wspomniano wcześniej, w ramach projektu TCGA przeanalizowano 20 różnych typów nowotworów, z czego dane opublikowane w 2012 roku dotyczyły analizy 224 próbek pobranych od pacjentów z RJG. Wyniki zaprezentowane przez TCGA wskazały potencjalne geny zaangażowane w powstawanie oraz rozwój RJG. Zaobserwowano, że ponad 90% tkanek charakteryzujących się obecnością lub brakiem mutacji wykazywało nieprawidłowo funkcjonujący szlak Wnt. Nieprawidłowości w szlaku Wnt były zapoczątkowywane najczęściej mutacją w genie *APC*. Dodatkowo udowodniono, że równie często występują mutacje w genach: *FAM123B* (ang. *APC Membrane Recruitment Protein 1*), *ARID1A* oraz *SOX9*, a także zaobserwowano zwiększoną ekspresję genu *FZD10* (ang. *Frizzled Class Receptor 10*). Dodatkowo na podstawie otrzymanych danych, zasugerowano, że białka regulujące proliferację, takie jak: *IGF2* (ang. *Insulin-like Growth Factor 2*), *IGFR* (ang. *Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*), *HER2* (ang. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), *HER3* (ang. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 3*), *MEK* (ang. *Mitogen-activated Protein Kinase Kinase*), *AKT* (ang. PKB, *Protein Kinase B*) oraz *mTOR* (ang. *Mammalian Target of Rapamycin*), będące częścią szlaku sygnałowego MAPK/ERK lub PI3K, pełnią istotną rolę w progresji RJG i mogą być potencjalnymi celami terapeutycznymi. Kolejną interesującą obserwacją był fakt, że próbki pochodzące z prawej strony okrężnicy charakteryzowały się znacznie częstszym występowaniem hipermetylacji, niż próbki wyizolowane z pozostałych miejsc. Dodatkowo, ponad 75% próbek wyizolowanych z tego miejsca posiadała wysoki stopień mutacji, jednocześnie nie wykazując MSI (The Cancer Genome Atlas Network 2012).

Oprócz wyżej wymienionych typów klasyfikacji, w latach 2012–2014 przedstawiono 6 różnych podziałów RJG opierających się na zmianach molekularnych.

Jednocześnie brak ujednoczenia dotyczący charakterystyki typów guzów RJG, skutkowało potrzebą stworzenia ustandaryzowanej klasyfikacji, która mogłaby skutecznie służyć do rozpoznawania oraz doboru odpowiedniego leczenia tego typu nowotworu. W 2015 roku Guinney i wsp., na podstawie analizy próbek od 4151 pacjentów w II oraz III stadium RJG, przedstawili klasyfikację CMS (ang. *Consensus Molecular Subtypes*), w ramach której zaproponowali cztery podstawowe podtypy RJG:

- CMS1 – immunologiczny,
- CMS2 – kanoniczny,
- CMS3 – metaboliczny,
- CMS4 – mezenchymalny.

Głównym celem klasyfikacji CMS jest ocena różnorodności fenotypowej na podstawie charakterystycznych dla RJG cech molekularnych, między innymi mutacji w genach *BRAF*, *KRAS* oraz obecności MSI. Grupy CMS są zróżnicowane pod względem sygnatury genowej, cech molekularnych oraz klinicznych. Podtyp CMS1 (immunologiczny) stanowi 13% wszystkich przypadków RJG i charakteryzuje się wysoką immunogennością, a także jednoczesnym występowaniem MSI oraz CIMP. Przeprowadzone badania wskazują na obecność wielu mutacji, m.in. w genach: *MLH1*, *PMS2*, *MSH6*, *BRAF*, *PTEN* (ang. *Phosphatase And Tensin Homolog*), *ATM* (ang. *ATM Serine/Threonine Kinase*). Stwierdzono również, że RJG o podtypie CMS1 występuje najczęściej z prawej strony okrężnicy oraz znacznie częściej diagnozowany jest w przypadku kobiet niż mężczyzn. CMS1 związany jest z pomyślnymi rokowaniami, jeśli nowotwór zostanie wykryty przed wystąpieniem przerzutów. 5-letni wskaźnik przeżycia wynosi ok. 73%. Jednocześnie nawrót RJG o podtypie CMS1 cechuje się agresywnym przebiegiem i krótkim całkowitym czasem przeżycia. Podtyp CMS2 (kanoniczny) stanowi najliczniejszą (37%) grupę przypadków RJG. Charakteryzuje się występowaniem CIN, co wiąże się z występowaniem aneuploidii oraz rearanżacji chromosomowych. Najczęściej obserwowanymi zmianami są nieprawidłowe funkcjonowanie szlaku Wnt oraz aktywacja czynnika transkrypcyjnego MYC. RJG o podtypie CMS2 zlokalizowany jest po lewej stronie okrężnicy, a 5-letni wskaźnik przeżycia wynosi 77%. Kolejne 13% stanowi podtyp CMS3 (metaboliczny), w którym zaobserwowano dużą częstość mutacji w genie *KRAS*, a także od 3 do 5% przypadków posiada mutacje w genie *HER2*. Jednocześnie niewiele przypadków charakteryzuje

się obecnością CIN. Dodatkowo tkanki zidentyfikowane jako podtyp CMS3 nie pochodzą z konkretnej części okrężnicy, jak w przypadku tkanek o podtypie CMS1 oraz CMS2, a 5-letni wskaźnik przeżycia pacjentów z CMS3 wynosi 75% i dotyczy wszystkich stopni zaawansowania. CMS4 (mezenchymalny) jest ostatnim podtypem klasyfikacji CMS, który jednocześnie stanowi drugą (23%) grupę pod względem częstości występowania. Charakterystyczne dla CMS4 jest znaczne pobudzenie angiogenezy, przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej oraz aktywacja elementów odpowiedzi immunologicznej oraz komórek stromy. Ponadto obserwuje się pobudzenie szlaku TNF β /SMAD oraz aktywację procesu EMT. CMS4 diagnozowany jest znacznie częściej u mężczyzn niż u kobiet, wykrywany jest głównie w dystalnej części jelita oraz związany jest z najgorszymi rokowaniami, 5-letni wskaźnik przeżycia szacuje się na ok. 60%. Pozostałe 13% to tkanki o charakterze mieszanym lub nie pozwalające na jednoznaczne sklasyfikowanie wg kryteriów CMS (Guinney i wsp. 2015, Coobergh van den Braak i wsp. 2020).

Klasyfikacje zaproponowane w ciągu ostatnich lat niewątpliwie przyczyniają się do lepszego zrozumienia biologii RJG. Dotyczy to szczególnie systemu CMS. Grupy CMS1, CMS2, CMS3 oraz CMS4 mogą być pomocne podczas oceny stopnia zaawansowania oraz doboru właściwej terapii onkologicznej pacjentów ze zdiagnozowanym RJG. Jednocześnie nadal brakuje wystarczającej ilości danych, które ułatwiłyby dobór najskuteczniejszego schematu leczenia dla danego podtypu RJG. Najnowsze badania pokazują jak ważną rolę odgrywa mikrośrodowisko w rozwoju tego nowotworu. Ostatnia analiza transkryptomyczna na poziomie pojedynczych komórek tkanek od pacjentów z RJG sklasyfikowanych wg CMS, wykazała, że wysoki poziom infiltracji przez fibroblasty (CAFs, ang. *Cancer-associated Fibroblasts*) oraz obecność określonych subpopulacji makrofagów wskazuje na słabe rokowania dla pacjenta w kontekście stosowania dostępnych terapii. Wyodrębnienie dodatkowej klasyfikacji w obrębie podtypów CMS, może zatem przyczynić się do dokładniejszej oceny wrażliwości pacjentów na stosowane schematy leczenia lub też rozwoju nowych terapii (Khaliq i wsp. 2022).

1.7. Terapie przeciwnowotworowe w RJG

Od wielu lat za złoty standard terapii przeciwnowotworowej RJG uznaje się kombinacje operacji chirurgicznej z radio- i/lub chemioterapią, czyli tzw. leczenie skojarzone. Rutynowo w pierwszej kolejności zaleca się najczęściej chirurgiczne usunięcie powstałych zmian wraz z marginesem zdrowej tkanki (Akkoca i wsp. 2014). Po ocenie stadium zaawansowania choroby lekarz podejmuje decyzję o wdrożeniu terapii adjuwantowej. Chemioterapia wieloskładnikowa uznawana jest za terapię pierwszego rzutu, w której skład wchodzi kombinacje fluorouracylu (5-FU, ang. *Fluorouracil*), folinianu wapnia i oksaliplatyny (FOLFOX) lub irynotekanu (FOLFIRI). Terapia jednoskładnikowa oparta jest głównie na 5-FU i zalecana jest w przypadku pacjentów z gorszym ogólnym stanem zdrowia. Pomimo powszechnego stosowania chemioterapii, warto podkreślić, że jest to leczenie obciążające dla organizmu. Jej wdrożenie wiąże się z licznymi niekorzystnymi efektami, takimi jak toksyczność ogólnoustrojowa, niezadowolający odsetek odpowiedzi, nieprzewidywalna oporność wrodzona i nabyta oraz niska selektywność swoista dla komórek nowotworowych. Występowanie tak wielu niekorzystnych efektów wpłynęło na zwiększenie zainteresowania opracowaniem różnych strategii leczenia z wykorzystaniem nowych czynników terapeutycznych (Xie i wsp. 2020).

Pierwszą alternatywną propozycją były przeciwciała monoklonalne, których głównym celem jest selektywne oddziaływanie z określonym celem molekularnym znajdującym się na komórkach nowotworowych lub w ich środowisku. W efekcie prowadzi to do zatrzymania lub zredukowania aktywności szlaków sygnałowych zaangażowanych w proces rozwoju i progresji nowotworu. W 2004 roku FDA (ang. *Food and Drug Administration*) dopuściła do użytku dwa przeciwciała monoklonalne (Cetuksymab oraz Bevacizumab), które do dziś są wykorzystywane w terapii celowanej RJG. Obecnie lista przeciwciał monoklonalnych używanych w terapii celowanej RJG lub znajdujących się w fazie badań klinicznych opiera się głównie na blokowaniu działania:

- naskórkowego czynnika wzrostu – EGF (ang. *Epidermal Growth Factor*) oraz jego receptora – EGFR (ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*),
- czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego – VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*) oraz jego receptora – VEGFR (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*),
- receptora HER2,

- czynnika wzrostu hepatocytów – HGF (ang. *Hepatocyte Growth Factor*) oraz jego receptora HGFR (c-MET, ang. *Hepatocyte Growth Factor Receptor*).

EGFR to receptor o aktywności kinazy tyrozynowej należący do rodziny białek ErbB (ang. *Erythroblastosis Oncogene B*), znanych również jako HER (ang. *Human Epidermal Growth Factor Receptor*). Oprócz EGFR (HER1, ang. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 1*) można wyróżnić 3 przedstawicieli rodziny HER: HER2, HER3 oraz HER4. EGFR po związaniu liganda (EGF lub TGF- α), ulega aktywacji tworząc homo- lub heterodimer z innymi receptorami z grupy HER, kolejno aktywując szlaki sygnałowe, takie jak: RAS-RAF-MEK-MAPK czy PI3K/AKT, których rola w progresji RJG została dobrze udokumentowana. Około 85% przypadków RJG charakteryzuje się zwiększoną ekspresją EGFR, dlatego zastosowanie przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko temu receptorowi przynosi korzystne efekty terapeutyczne. Jednocześnie należy zauważyć, że terapia przeciwciałami monoklonalnymi anty-EGFR nie powinna być zastosowana w przypadku pacjentów, u których wykryto mutacje w genach *KRAS* lub *NRAS* (ang. *Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog*). W przypadku RJG dostępne przeciwciała monoklonalne anty-EGFR to: Cetuksymab (chimeryczne przeciwciało; IgG1) oraz Panitumumab (rekombinowane ludzkie przeciwciało; IgG2). Oba przeciwciała działają poprzez wiązanie z zewnątrzkomórkową domeną III EGFR zapobiegając wiązaniu liganda, tym samym blokując przekazywanie sygnału przez receptor oraz powodując jego internalizację/degradację, czego efektem jest zmniejszenie poziomu receptora na powierzchni komórek nowotworowych. Prowadzi to do zatrzymania szlaków sygnałowych, a następnie zmniejszenia proliferacji komórek nowotworowych (Xie i wsp. 2020, Hwang i wsp. 2021, Biller i Schrag 2021). Przeprowadzone badania potwierdzają, że połączenie Cetuksymabu ze schematem FOLFIRI wydłużyło zarówno czas wolny od progresji (PFS, ang. *Progression Free-Survival*) jak i czas całkowitego przeżycia (OS, ang. *Overall Survival*) u pacjentów z RJG (Van Cutsem i wsp. 2009). Podobne efekty zaobserwowano w przypadku zastosowania Panitumumabu ze schematem FOLFLOX lub FOLFIRI, (Hwang i wsp. 2021).

Z kolei grupa receptorów VEGFR, należąca również do receptorowych kinaz tyrozynowych, składa się z trzech typów: VEGFR1, VGFR2 oraz VEGFR3. Ligandami dla receptorów VEGFR są białka z grupy VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D oraz PIGF (ang. *Placental Growth Factor*). Najważniejszym celem

terapeutycznym w leczeniu chorób nowotworowych, w tym RJG, wydaje się zablokowanie interakcji VEGFR2 z ligandem VEGF-A, promującej angiogenezę oraz regulującej szlaki sygnałowe RAS-RAF-MEK-MAP oraz PI3K/AKT. U około 50% pacjentów w II i III stadium RJG oraz 70% w IV stadium RJG potwierdzono podwyższoną ekspresję *VEGF/VEGFR*, co stanowi dobry cel terapeutyczny. Bevacizumab (humanizowane przeciwciało, IgG1) skierowane przeciwko VEGF-A oraz Ramucirumab (rekombinowane ludzkie przeciwciało, IgG1) skierowane przeciwko VEGFR2 zostały zatwierdzone przez FDA w terapii RJG. Działanie Bevacizumabu polega na wiązaniu VEGF-A, przez co blokuje jego interakcję z receptorami VEGFR1 lub VEGFR2, podczas gdy Ramucirumab wiąże się specyficznie z VEGFR2 uniemożliwiając przyłączenie VEGF-A. Zarówno Bevacizumab, jak i Ramucirumab stosowane są w połączeniu z chemioterapią, co zwiększa PFS oraz OS pacjentów z RJG (Xie i wsp. 2020, Hwang i wsp. 2021, Biller i Schrag 2021). Innym przykładem terapii celowanej dla VEGF/VEGFR jest Aflibercept, rekombinowane białko fuzyjne, zbudowane z zewnątrzkomórkowych domen VEGFR1 i VEGFR2, połączone z fragmentem Fc ludzkiej IgG. Aflibercept działa jak receptor poprzez preferencyjne wiązanie z VEGFA, VEGFB oraz PIGF, a jego działanie w terapii RJG jest najbardziej efektywne w połączeniu ze schematem FOLFIRI (Biller i Schrag 2021).

W przypadku receptora HER2, schemat działania jest podobny jak w przypadku EGF/EGFR, związanie liganda przez receptor HER2 prowadzi do jego homo- lub heterodimeryzacji oraz pobudzenia wyżej wymienionych szlaków sygnałowych (RAS-RAF-MEK-MAPK oraz PI3K/AKT), a także szlaku PLC/PKC, które są zaangażowane m.in. w regulację proliferacji komórek oraz promowanie metastazy. Badania prowadzone w różnych komórkach nowotworowych, w tym RJG dotyczące blokowania aktywności HER2 pozostają w II fazie badań klinicznych i obejmują dwa przeciwciała monoklonalne: Trastuzumab (humanizowane przeciwciało, IgG1) oraz Pertuzumab (humanizowane przeciwciało, IgG1) (Xie i wsp. 2020, Hwang i wsp. 2021).

Równie istotnym celem terapeutycznym jest zablokowanie wiązania liganda HGF przez receptor c-MET, którego zwiększoną ekspresję obserwuje się na powierzchni komórek nowotworowych, w tym RJG. Po związaniu receptora c-MET z ligandem HGF dochodzi do dimeryzacji receptora oraz autofosforylacji tyrozyny. W kolejnych etapach aktywny c-MET pobudza ścieżki sygnałowe zależne od białka STAT3 (ang. *Signal Transducer And Activator Of Transcription 3*), ścieżkę sygnałową FAK/Src oraz RAS-RAF-MEK-MAPK. Najbardziej obiecujące badania, w RJG, dotyczą

przeciwciała anty-HGF, Rilotumumabu (rekombinowane ludzkie przeciwciało, IgG2), które znajduje się w II fazie badań klinicznych. Również w II fazie badań klinicznych jest Onartuzumab (humanizowane przeciwciało monowalentne, IgG1) skierowane przeciwko c-MET, jednak dotychczasowe dane wskazują brak skuteczności w walce z RJG (Xie i wsp. 2020, Hwang i wsp. 2021, Biller i Schrag 2021).

Przeciwciała monoklonalne blokują aktywność kinaz tyrozynowych, które można podzielić na receptorowe kinazy tyrozynowe (RTK, ang. *Receptor Tyrosine Kinase*) oraz niereceptorowe kinazy tyrozynowe (nRTK, ang. *non-Receptor Tyrosine Kinases*). Dopuszczone do użytku lub znajdujące się w fazie badań klinicznych przeciwciała skierowane są głównie przeciwko aktywności RTK. Jednym z przykładów RTK jest wyżej opisana grupa receptorów VEGFR, ale także EGFR oraz c-MET. RTK mogą zostać zablokowane poprzez użycie inhibitorów. Zazwyczaj leki te blokują też aktywność innych kinaz. Najczęściej stosowanym w RJG inhibitorem RTK jest Regorafenib, opisywany jako inhibitor wielu kinaz w tym PDGFR (ang. *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*), ale także receptorów VEGFR1-3 oraz FGFR (ang. *Fibroblast Growth Factor Receptor*), które odgrywają istotną rolę w procesie angiogenezy i metastazy nowotworów. Regorafenib zalecany jest wyłącznie w zaawansowanych przypadkach RJG, gdzie zastosowano już chemioterapię lub pacjent nie został do niej zakwalifikowany (Dhillon 2018, García-Aranda i Redondo 2019). Sorafenib to również inhibitor RTK oraz kinaz serynowo-treoninowych stosowany w przypadku pacjentów z zaawansowanym RJG. Zastosowanie Sorafenibu skutkuje zahamowaniem wzrostu guza, zmniejszeniem proliferacji oraz unaczynienia nowotworu poprzez hamowanie aktywności wielu kinaz, w tym VEGFR, PDGFR oraz kinaz serynowo-treoninowych z grupy RAF-RAS, a także FLT3 (ang. *FMS-like Tyrosine Kinase 3*) (García-Aranda i Redondo 2019, Jeong i wsp. 2020). Z kolei, Nintedanib, hamujący działanie wielu kinaz, w tym VEGFR1-3, PDGFR, FGFR1-3, ale także kinazy FLT3 oraz RET (ang. *Receptor Tyrosine-protein Kinase*), z powodu braku różnic w OS pomiędzy pacjentami przyjmującymi lek, a pacjentami, u których zastosowano placebo, został wycofany z badań w III fazie badań klinicznych (Van Cutsem i wsp. 2018, Xie i wsp. 2020). Równie interesującym przykładem inhibitora wielu kinaz jest Encorafenib, który głównie hamuje kinazę RAF, a następnie prowadzi do zatrzymania aktywności szlaku sygnałowego RAF-MEK-ERK. Encorafenib w połączeniu z Cetuksymabem dedykowany jest pacjentom z zaawansowanym RJG u których stwierdzono mutację V600E w genie *BRAF* (Tabernero i wsp. 2020, Al-Salama 2020).

Stosunkowo nowym podejściem terapeutycznym walki z RJG jest immunoterapia. W porównaniu ze standardowym leczeniem, wykorzystuje układ odpornościowy pacjenta do walki z komórkami nowotworowymi. W RJG dopuszczone do użytku są 3 przeciwciała monoklonalne: Ipilimumab (ludzkie przeciwciało, IgG1) skierowane przeciwko CTLA4 (ang. *Cytotoxic T Cell Antigen 4*), a także Pembrolizumab (humanizowane przeciwciało, IgG4) oraz Niwolumab (humanizowane przeciwciało, IgG4) skierowane przeciwko PD-1 (ang. *Programmed Cell Death Protein 1*). Zarówno PD-1 oraz CTLA4 to receptory znajdujące się na powierzchni limfocytów T, które oddziałują z białkami znajdującymi się na komórkach nowotworowych, odpowiednio PD-L1 (ang. *Programmed Death Ligand 1*) lub B7 (CD80) tym samym uniemożliwiając pobudzenie odporności immunologicznej. Komórki nowotworowe poprzez łączenie się do tych receptorów, hamują aktywność limfocytów i unikają w ten sposób nadzoru immunologicznego. Zastosowanie inhibitorów punktów kontrolnych umożliwia przywrócenie oryginalnej funkcjonalności limfocytów T. Oprócz wyżej wymienionych przeciwciał monoklonalnych wykorzystywanych w terapii RJG, prowadzone są badania z Ab przeciwko PD-L1, takimi jak: Atezolizumab (humanizowane przeciwciało, IgG1), Avelumab (rekombinowane ludzkie przeciwciało, IgG1) oraz Durvalumab (rekombinowane ludzkie przeciwciało, IgG1), które znajdują się w II fazie badań klinicznych (Wieder i wsp. 2018, Feng i wsp. 2021).

Oprócz inhibitorów receptorów punktów kontrolnych obiecująca wydaje się być terapia adoptywna i szczepionki przeciwnowotworowe, które w połączeniu z terapią celowaną mogłyby zwiększyć szanse pacjentów na przeżycie. Terapia adoptywna komórkami CAR-T (ang. *Chimeric Antigen Receptor-T*) polega na walce z nowotworem poprzez podanie choremu genetycznie zmodyfikowanych limfocytów T. Modyfikacje genetyczne, którym poddawane są limfocyty T, polegają na dodaniu genu kodującego receptor CAR (ang. *Chimeric Antigen Receptor*), mogący wiązać konkretny ligand na komórkach nowotworowych. Terapia z wykorzystaniem komórek CAR-T stosowana jest głównie w nowotworach krwi, jednak prowadzone są również badania kliniczne dotyczące guzów litych, np. RJG. Potencjalne cele dla terapii CAR-T, w RJG, to: CAE, EGFR, mucyna 1 (ang. *Mucin 1*), HER2, c-MET, CD133 (ang. *Prominin 1*) oraz receptor NKG2D (ang. *Natural Killer Group 2 Member D*) i jego ligand. CAE, jest białkiem szczególnie istotnym dla rozwoju embrionalnego. Jego wysokie poziomy oznaczono w jelicie, wątrobie i trzustce. Wraz z wiekiem poziom CEA spada, a jego podwyższenie może świadczyć o obecności wielu chorób, takich jak: wrzodziejące zapalenie jelita

grubego, stany zapalne przewodu pokarmowego (choroba Leśniowskiego-Crohna), upośledzenie funkcji nerek, a także możliwości wystąpienia chorób nowotworowych, w tym RJG. Prace dotyczące CEA jako celu terapeutycznego w RJG obecnie znajdują się w I lub II fazie badań klinicznych. Z kolei, NKG2D uważany jest za molekularny czujnik stresu komórek oraz aktywator odpowiedzi układu immunologicznego po związaniu ligandu z grupy NKG2DL (ang. *NKG2D Ligand*). Jego wysoki poziom obserwuje się na komórkach NK (ang. *Natural Killer*), a także limfocytach CD4+ oraz CD8+. Badania nad NKG2D lub NKG2DL w RJG znajdują się w I fazie badań klinicznych. Dodatkowo w I lub II fazie badań klinicznych prowadzone są prace nad EGFR, c-MET, HER2 oraz mucyną 1 (Babic i Romaganani 2018, Jin i wsp. 2021, Li i wsp. 2020).

W przypadku szczepionek przeciwnowotworowych celem jest również pobudzenie układu odpornościowego do walki z powstałym już nowotworem, poprzez stymulację i aktywację limfocytów T. Jednak prace nad szczepionkami przeciwko RJG są dopiero w fazie badań podstawowych, a otrzymane wyniki nie wykazały dużej skuteczności. Najnowszym przykładem terapii jest połączenie szczepionki peptydowej specyficznej dla TM4SF5 (ang. *Transmembrane 4 L Six Family Member 5*) wraz z przeciwciałem monoklonalnym anti-TM4SF5, których stosowanie spowodowało zmniejszenie przerzutów raka okrężnicy w badaniach przeprowadzonych na modelu mysim (Azadi i wsp. 2021).

Proces rozwoju nowych terapii RJG jest czasochłonny, a dostępne obecnie schematy leczenia nie są w 100% skuteczne i wywołują liczne niekorzystne efekty lub skutki uboczne, które często powodują przerwanie leczenia i skierowanie pacjenta na oddziały paliatywne. Rozpoczęto kilka badań mających na celu identyfikację nowych potencjalnych celów terapeutycznych, takich jak: szlak Wnt, Notch, Hedgehog, ludzki receptor śmierci 5 (DR5, ang. *Death Receptor 5*) i TGF- β , jednak jak dotąd nie uzyskano zadowalających wyników (Xie i wsp. 2020).

Pomimo rozwoju nauki, stosowania coraz doskonalszych metod diagnostycznych oraz terapeutycznych, nadal brakuje jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, jak skutecznie leczyć pacjentów z RJG. Głównym problemem jest zróżnicowanie molekularne typów RJG oraz różnorodność fenotypów komórkowych w obrębie jednego guza. Z tego powodu istotne wydaje się poszukiwanie genów/białek, które pozwoliłyby na dokładniejszą diagnozę RJG, a także dopasowanie najbardziej korzystnej metody leczenia. W 2016 roku Przygodzka i wsp., zaobserwowali, że nadekspresja *Snail* w komórkach RJG powoduje zmianę fenotypu komórek na inwazyjny oraz podwyższony

poziom ekspresji genu kodującego małe białko wydzielnicze – neuromedynę U (NMU, ang. *Neuromedin U*). Trzy lata później, Wang i wsp. (2019) opublikowali dane wskazujące na regulację ekspresji *NMU* w komórkach RJG przez długie niekodujące RNA LINC0155, co związane jest ze zmianami w migracji komórek. Powyższe dane sugerują, że NMU może stanowić dobry cel badawczy, jako wskaźnik zmian fenotypu komórek RJG na bardziej inwazyjny w kontekście poszukiwania nowych czynników diagnostycznych, prognostycznych lub predykcyjnych RJG.

1.8. Neuromedyna U

NMU to małe białko wydzielnicze, które po raz pierwszy wyizolowano z rdzenia kręgowego świni (Minamino i wsp. 1985). Dotychczas NMU została zidentyfikowana u wielu gatunków, w tym także u człowieka, psa, królika czy szczura. Neuromedyna U zaangażowana jest w wiele procesów fizjologicznych. Pierwszą zbadaną funkcją tego małego białka wydzielniczego było wywoływanie skurczów mięśni gładkich pęcherza moczowego szczura. Podobne działanie NMU udowodniono także w jelicie krętym i w żołądku szczura i myszy (Dass i wsp. 2007). W ciągu ostatniej dekady pojawiły się doniesienia opisujące rolę NMU w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), jak również w innych układach w ludzkim organizmie. Procesy regulowane przez NMU w OUN dotyczą regulacji odżywiania, stresu oraz homeostazy (Howard i wsp. 2000, Malendowicz i Ruciński 2021). Rola NMU poza ośrodkowym układem nerwowym jest rzadziej opisywana. Obecnie wiadomo, że może być istotna podczas regulacji wydzielania hormonów odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie tarczycy. Udowodniono, że NMU zmniejsza poziom wydzielania insuliny przez trzustkę (dokładnie wysypki Langerhansa) u szczurów. Z kolei w układzie sercowo-naczyniowym, NMU dożylnie wstrzyknięta szczurom, powoduje wzrost ciśnienia krwi oraz może powodować regionalną regulację jelitowego przepływu krwi (Malendowicz i Ruciński 2021).

Ludzki gen *NMU* zlokalizowany jest na chromosomie 4 (4q12) i składa się z 10 eksonów i 9 intronów (https://useast.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000109255;r=4:55595229-55636698). W wyniku procesu transkrypcji istnieje możliwość powstania 6 alternatywnych transkryptów. W wyniku procesu translacji z 4 transkryptów mogą powstać różnej długości pre-pro-peptydy (Tabela 2). Wszystkie pre-pro-peptydy zawierają trzy domeny: peptyd wydzielniczy, peptyd prekursorowy NMU (*NURP*, ang. *Neuromedin U Precursor Related Peptide*) oraz dojrzałą (ostateczną) formę NMU. Pierwsze 34 aminokwasów zlokalizowanych

na N-końcu łańcucha polipeptydowego pre-pro-peptydu stanowi sekwencję sygnałową odpowiedzialną za wydzielanie NMU na zewnątrz komórki. Peptydy prekursorowe – NURP – o długości 33 aminokwasów (NURP-33) lub 36 aminokwasów (NURP-36), podobnie jak dojrzała forma NMU-21 oraz NMU-25, powstają poza komórką w wyniku cięcia proteolitycznego. Dotychczas nie zidentyfikowano, które proteazy biorą udział w procesie tworzenia NURP oraz NMU. Obecnie u ludzi poznane są dwie ostateczne formy NMU. Są one zbudowane z 21 (NMU-21) lub 25 aminokwasów (NMU-25) zlokalizowanych na C-końcu łańcucha pre-pro-peptydów. Zgromadzone dane sugerują, że jedynie NMU-25 jest aktywna biologicznie. NMU-25 zdolna jest do wiązania z receptorami na powierzchni komórek i generowania sygnałów wewnątrzkomórkowych (Tabela 2 – pogrubiony tekst). Aktywność NMU-25 warunkowana jest obecnością konserwatywnej sekwencji aminokwasowej zlokalizowanej na końcu C peptydu: Phe-Arg-Pro-Arg-Asn, gdzie asparagina, będąca ostatnim aminokwasem, ulega amidacji. Dotychczas nie opisano aktywności biologicznej prekursorów NURP (Brighton i wsp. 2004a, Przygodzka i wsp. 2019, Ye i wsp. 2020, Malendowicz i Ruciński 2021).

Tabela 2. Proces transkrypcji i translacji NMU (na podstawie: Malendowicz i Ruciński 2021, https://useast.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000109255;r=4:55595229-55636698).

Numer transkryptu	Nazwa	Liczba nukleotydów	Długość pre-pro-peptydu	Długość dojrzałej NMU
ENST00000264218.7	NMU-201	816	174aa	25aa
ENST00000505262.5	NMU-202	693	147aa	25aa
ENST00000507338.1	NMU-203	658	149aa	21aa
ENST00000509371.1	NMU-204	283	-	-
ENST00000511469.5	NMU-205	756	158aa	25aa
ENST00000515325.5	NMU-206	616	-	-

1.9. Receptory dla NMU

Aktywność biologiczna ludzkiej NMU została najlepiej poznana w kontekście dwóch receptorów: NMUR1 (ang. *Neuromedin U Receptor 1*) lub NMUR2 (ang. *Neuromedin U Receptor 2*), które należą do nadrodziny A receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR, ang. *G-Protein Coupled Receptor*). Każdy receptor należący do grupy GPCR zbudowany jest z około 800-1200 aminokwasów tworzących siedem transbłonowych α -helis, zawierających 25-35 aminokwasów. Cechą charakterystyczną dla GPCR jest cytoplazmatyczny C-koniec oraz zewnątrzkomórkowy N-koniec łańcucha aminokwasowego. Grupa tych receptorów jest niezwykle istotnym celem badawczym, ponieważ receptory GPCR zaangażowane są w wiele procesów fizjologicznych, a także rozwój chorób, w tym także nowotworowych (Przygodzka i wsp. 2019, Odoemelam i wsp. 2020, Basith i wsp. 2018).

Receptor NMUR1 kodowany jest przez gen zlokalizowany na chromosomie 2 w pozycji q37.1., z kolei receptor NMUR2 kodowany jest przez gen zlokalizowany na chromosomie 5 w pozycji q33.1. Udowodniono, że NMUR1 oraz NMUR2 wykazują wysoką homologię sekwencji aminokwasowej (około 50%) oraz podobne powinowactwo do wiązania NMU. NMUR1 składa się z 426 aminokwasów, natomiast NMUR2 zbudowany jest z 415 aminokwasów (Shan i wsp. 2000). NMUR1 i NMUR2 mogą tworzyć homo- lub heterodimery (Lin i wsp. 2015). Pierwsze badania dotyczące dystrybucji NMUR1 oraz NMUR2, wykazały że NMUR1 obecny jest na komórkach płuc, nerek, przewodu pokarmowego układu krwionośnego oraz tkanki tłuszczowej. NMUR2 występuje głównie w OUN, szczególnie na komórkach podwzgórza, rdzenia przedłużonego, przysadki mózgowej i rdzenia kręgowego. Obecnie wiadomo, że oba receptory występują w wielu narządach, zarówno w OUN, jak i poza nim (Shan i wsp. 2000, Przygodzka i wsp. 2019, Ye i wsp. 2020).

Oprócz wspomnianych wyżej receptorów (NMUR1 i NMUR2), zidentyfikowano także inne receptory oddziałujące z NMU. Takahashi i wsp. (2006) opisali wiązanie NMU z heterodimerem zbudowanym z receptora NTSR1 (ang. *Neurotensin Receptor 1*) oraz GHSR1b (ang. *Growth Hormone Secretagogue Receptor 1b*) w komórkach nowotworowych płuc. Natomiast Lin i wsp. (2015) zidentyfikowali receptor NMUR2S, zbudowany z sześciu transbłonowych α -helis, którego N-koniec oraz C-koniec łańcucha zlokalizowane są po zewnętrznej stronie błony komórkowej. Ekspresję *NMUR2S* potwierdzono w kilku liniach komórkowych, w tym HeLa (rak szyjki macicy), THP-1 (białaczka monocytowa) oraz T-47D (rak piersi). Obserwacje te oraz poszukiwania

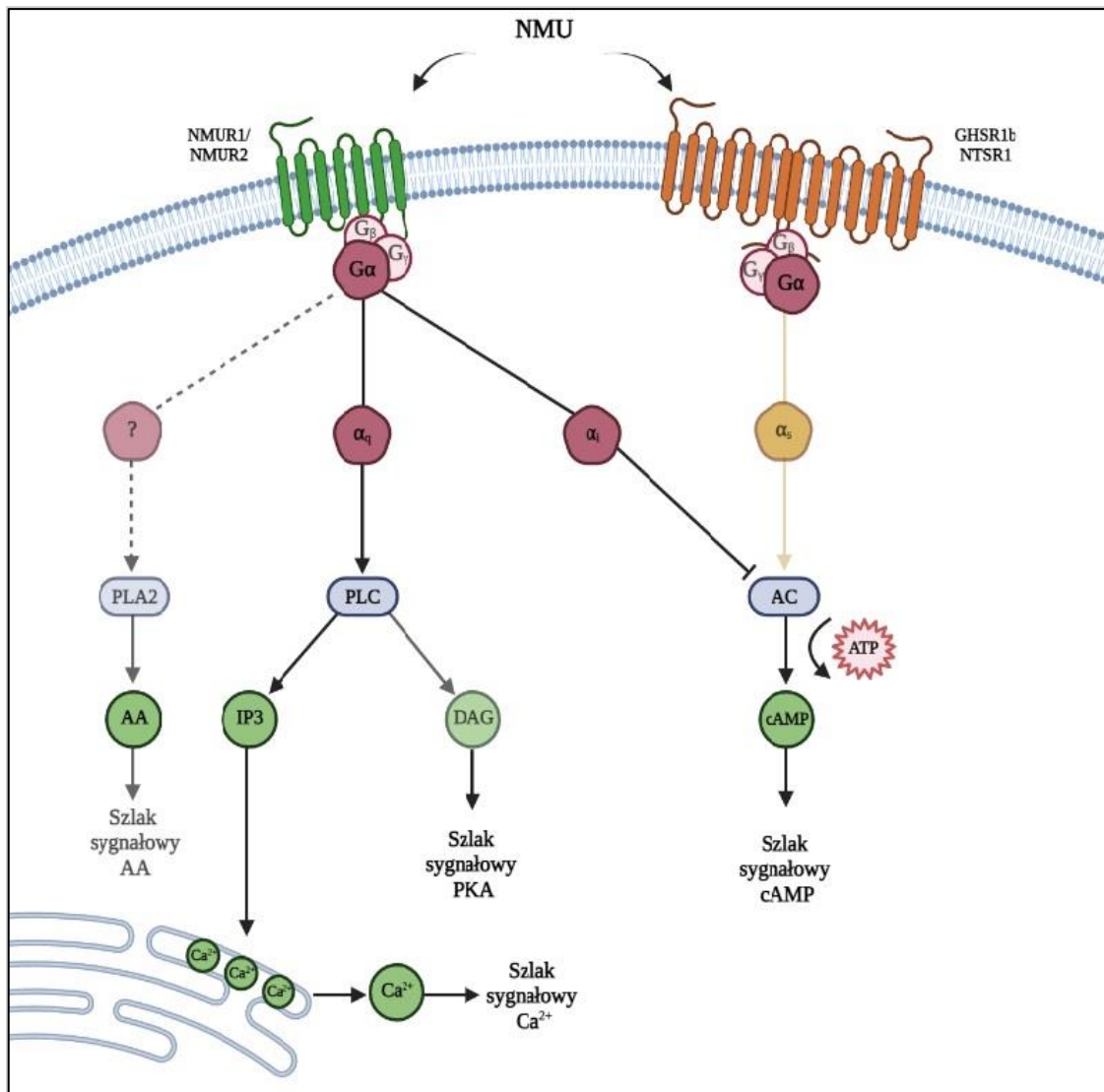
znaczenia receptora nie były jednak kontynuowane. Ostatnio udowodniono również w modelu mysim, że receptor MRGPRX2 (ang. *Mas-Related G Protein-Coupled Receptor-X2*), obecny na komórkach tucznych z ludzkiej skóry, może zostać aktywowany pod wpływem NMU (Ye i wsp. 2020).

1.9.1. Przekazywanie sygnału za pomocą receptorów dla NMU

Dwa główne receptory dla NMU uruchamiają szlaki sygnałowe charakterystyczne dla receptorów z rodziny GPCR. Po związaniu liganda z receptorem, białko G zmienia swoją konformację i przekazuje sygnał do wnętrza komórki. Białka G zbudowane są z trzech polipeptydów, które pogrupowano w dwie jednostki funkcjonalne: podjednostkę α (39–52 kDa) i podjednostkę $\beta\gamma$ (38 i 5 kDa). Znajdują się one na wewnętrznej powierzchni błony komórkowej (Odoemelam i wsp. 2020). Aktywowanie podjednostki $G\alpha$, może powodować pobudzenie odpowiednich białek efektorowych, a w efekcie kontrolować wybrane szlaki sygnałowe. Udowodniono, że pobudzenie podjednostki $G\alpha_s$ lub $G\alpha_i$, odpowiednio aktywuje lub hamuje szlaki zależne od cAMP (ang. *cyclic Adenosine Monophosphate*). Natomiast, pobudzenie podjednostki $G\alpha_q$ aktywuje fosfolipazę C (PLC, ang. *PhosphoLipase C*), co prowadzi m.in. do mobilizacji jonów wapnia w komórce. Zgromadzone dotychczas dane potwierdzają, że w przekazywanie sygnału pochodzącego od NMU zaangażowane są podjednostki $G\alpha_q$ bądź $G\alpha_i$ i $G\alpha_s$ (Ryc. 3), a sygnalizacja zależna od NMU obejmuje szlaki sygnałowe związane z aktywacją lub zahamowaniem aktywności cykazy adenylowej, fosfolipazy C i fosfolipazy A2. Opisane badania zostały przeprowadzone na początku XXI wieku. W badaniach tych wykorzystywano jako model badawczy różne linie komórkowe z nadekspresją *NMUR1* lub *NMUR2*. Dostępne dane potwierdzają, że traktowanie ludzką NMU-25 komórek linii HEK-293, COS-7 i CHO z nadekspresją jednego z receptorów, *NMUR1* lub *NMUR2*, prowadzi do zmiany poziomu cAMP lub poziomu jonów Ca^{2+} w komórce (Raddatz i wsp. 2000, Aiyar i wsp. 2004, Fujii i wsp. 2000, Szekeres i wsp. 2000, Brighton i wsp. 2004b). Wyniki otrzymane po traktowaniu ludzką NMU-25 oraz forskoliną komórek linii HEK-293 z nadekspresją jednego z receptorów, *NMUR1* lub *NMUR2*, pokazały, że użycie NMU-25, wywołuje podobny efekt do forskoliny, co potwierdza zdolność NMU do regulowania aktywności cykazy adenylowej. Ponadto, zaobserwowano, że komórki linii HEK-293 z nadekspresją *NMUR2* i traktowane NMU wykazywały wyższy wzrost stężenia cAMP niż komórki

z nadekspresją *NMUR1* (Brighton i wsp. 2004b). Z kolei, Takahashi i wsp. (2006) udowodnili, że w komórkach linii LC319, w których potwierdzono ekspresję *GHSR1b* oraz *NTSR1*, następuje wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP pod wpływem NMU w zależności od jej stężenia. Podobnych efektów nie zaobserwowano, badając poziom wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} . Dodatkowo specyficzność tego heterodimeru w stosunku do NMU potwierdzono w komórkach linii NCI-H358 i SK-MES-1, z nadekspresją odpowiednio *GHSR1b* lub *NSTR1*. Żadna z traktowanych linii nie wykazywała zmian w poziomie cAMP, co sugeruje, że tylko obecność dimeru GHSR1b/NTSR1 może skutecznie zwiększać wewnątrzkomórkową produkcję cAMP pod wpływem NMU (Ryc. 3) (Takahashi i wsp. 2006).

W wyniku aktywacji receptorów NMUR1 oraz NMUR2 pod wpływem NMU, oprócz zmiany poziomu cAMP oraz wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} , może dojść do pobudzenia szlaku MAPK/ERK. Szlak ten jest jednym z podstawowych szlaków sygnalizacyjnych odbierających sygnał ze środowiska komórki. Uważa się, że szlak MAPK/ERK jest głównie odpowiedzialny za regulację proliferacji, ruch komórek, a także ich apoptozę. Udowodniono, że dodanie NMU-25 do komórek linii HEK-293 z nadekspresją *NMUR1* lub *NMUR2* powodowało fosforylację kinaz ERK_{1/2} po około 5–10 minutach (Przygodzka i wsp. 2019, Brighton i wsp. 2004a, Brighton i wsp. 2004b, Alhosain i wsp. 2018). Podobne wyniki uzyskano w komórkach linii SKOV-3 z ekspresją *NMUR1* i *NMUR2*. Natomiast efektu tego nie zaobserwowano w przypadku komórek SKOV-3 z nadekspresją *NMUR2S* (Lin i wsp. 2015).



Rycina 3. Schemat aktywacji szlaków sygnałowych przez NMU (na rycinie skrótami oznaczono: NMU – neuromedyna U; NMUR1 – receptor 1 dla neuromedyny U; NMUR2 – receptor 2 dla neuromedyny U; GHSR1b – receptor 1b dla greliny; NTSR1 – receptor 1 dla neurotensyny; PLA2 – fosfolipaza A2; PLC – fosfolipaza C; AC – cyklaza adenylowa; AA – kwas arachidonowy; IP3 – trifosforan 1,4,5-inozytolu; DAG – 1,2-diacylglicerol; PKA – kinaza białkowa A; cAMP – cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan; Ca^{2+} – jony wapnia) (na podstawie: Przygodzka i wsp. 2019).

1.10. Rola NMU w chorobach nowotworowych

Rola NMU w przebiegu i progresji nowotworów endometrium, piersi, płuc, przełyku, szyi, głowy i szpiku została zauważona stosunkowo niedawno. Ta wiedza została zebrana i usystematyzowana przez nasz zespół badawczy w formie publikacji przeglądowej (Przygodzka i wsp. 2019).

Dotychczasowe badania nad rolą NMU w procesie nowotworzenia opierają się na analizie jej ekspresji w tkankach od pacjentów oraz roli w procesach komórkowych

poprzez aktywowanie szlaków sygnalizacyjnych. Analiza próbek niedrobnokomórkowego (stadium I – III) oraz drobnokomórkowego (stadium IV) raka płuc wykazała zwiększoną ekspresję *NMU* oraz obecność białka w ponad 50% przypadkach pierwszego typu nowotworu. Dodatkowo w badanych próbkach wykorzystując barwienie immunohistochemiczne potwierdzono obecność receptorów NTSR1 oraz GHSR1b, natomiast nie potwierdzono obecności receptorów NMUR1 oraz NMUR2 (Takahashi i wsp. 2006). Podobne badania przeprowadzono na tkankach pochodzących z gruczolakoraka trzustki. Otrzymane wyniki pokazały wzrost poziomu mRNA oraz białka NMU tylko w przypadku gruczolakoraka. Podobne zmiany widoczne były w przerzutach pobranych z węzłów chłonnych oraz wątroby. Zbadano również poziom ekspresji *NMUR1* oraz *NMUR2*. Poziom pierwszego receptora był bardzo niski, natomiast poziom ekspresji *NMUR2* był podwyższony we wszystkich tkankach nowotworowych w porównaniu do tkanek zdrowych (Ketterer i wsp. 2009). W przypadku raka endometrium i piersi również zaobserwowano wzrost ekspresji *NMU* w tkankach nowotworowych w porównaniu do tkanek zdrowych (Lin i wsp. 2016, Garczyk i wsp. 2017). Z kolei, w przypadku kolczystokomórkowego raka szyi i głowy udowodniono, że promotor genu *NMU* może być metylowany, co skutkuje zmianami w jego poziomie ekspresji zarówno w tkankach od pacjentów, jak i liniach komórkowych (Tokumaru i wsp. 2004). Kolejne badania na tym samym modelu nowotworu wykazały obecność NMU w tkankach pobranych od pacjentów, podczas gdy obecności NMU nie wykryto w tkankach zdrowych (Wang i wsp. 2016). Powyższe badania dowodzą, że wzrost ekspresji *NMU* może pełnić funkcję czynnika prognostycznego, jednak praca Yamashita i wsp. (2002), w której materiał badawczy stanowiło pięć próbek z pierwotnych guzów raka płaskonabłonkowego przełyku (ESCC, ang. *Esophageal Squamous Cell Carcinoma*) wykazały spadek ekspresji *NMU* w porównaniu do tkanek prawidłowych.

Badania funkcjonalne przeprowadzono na modelach komórkowych, gdzie obserwowano wpływ NMU na migrację, proliferację, inwazyjność oraz oporność na leki. W badaniach dotyczących białaczki szpikowej udowodniono, że brak aktywacji genu *Myc* prowadzi do wzrostu ekspresji *NMU*. Dodatkowo potwierdzono obecność receptora NMUR1 na poziomie białka oraz mobilizację jonów wapnia pod wpływem NMU, co świadczy o interakcji NMU z tym receptorem (Shetzline i wsp. 2004). Z kolei, w przypadku linii komórkowych raka endometrium, zaobserwowano, że NMU wpływa na wzrost poziomu proliferacji. Ponadto całkowite wyciszenie (ang. *knockdown*)

NMU spowodowało zahamowanie wzrostu komórek (Lin i wsp. 2016, Yang i wsp. 2018). Potwierdzono, że NMU jest zaangażowana w zwiększanie zarówno potencjału migracyjnego, jak i inwazyjnego komórek raka piersi oraz trzustki (Harten i wsp. 2011, Rani i wsp. 2014, Garczyk i wsp. 2017, Martinez i wsp. 2017).

Gen *NMU* znalazł się w grupie genów potencjalnie zaangażowanych w zwiększenie oporności na leki stosowane w leczeniu nowotworów piersi i niedrobnokomórkowego raka płuc. Analizy transkryptomyczne wybranych linii komórkowych opornych na wybrane terapeutyki, lepatynib, trastuzumab, neratynib lub afatynib (rak piersi) oraz alectinib (niedrobnokomórkowy rak płuc), pokazują wzrost ekspresji *NMU*. Dodatkowo zaobserwowane zmiany w ekspresji *NMU* powiązano z czynnikami transkrypcyjnymi HOXB9 (ang. *Homeobox B9*) i TAL1 (ang. *TAL BHLH Transcription Factor 1, Erythroid Differentiation Factor*), których rola w oporności na terapię przeciwnowotworowe jest udokumentowana (Rani i wsp. 2014, You i Gao 2018).

Ocena ekspresji mRNA kodującego NMU oraz obecności białka NMU, jak również receptorów NMUR1 i NMUR2 w tkankach nowotworowych może przyczynić się do dokładniejszej oceny stopnia zaawansowania choroby oraz pozwoli na doprecyzowanie schematu leczenia RJG.

2. Cele pracy

W ramach niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono ocenę roli NMU w progresji RJG. Zebrane dotychczas dane pozwoliły na wysunięcie hipotezy badawczej, że NMU reguluje potencjał migracyjny oraz inwazyjny komórek RJG. W celu weryfikacji tej hipotezy, wyznaczono następujące cele szczegółowe:

- Charakterystyka wybranych linii komórek RJG pod względem ekspresji *NMU* oraz receptorów *NMUR1*, *NMUR2*, jak również podjednostek receptora alternatywnego *NTSRI/GHSR1b*. Identyfikacja NMU w lizatach komórkowych oraz medium pochodzonym w wybranym panelu linii RJG,
- Analiza aktywacji kinaz białkowych $ERK_{1/2}$ oraz zmian w poziomie wapnia w komórkach RJG z ekspresją *NMUR1* lub *NMUR2* pod wpływem NMU,
- Ocena roli NMU w procesie migracji oraz inwazji z wykorzystaniem wyselekcjonowanych linii komórkowych RJG ze stabilną nadekspresją *NMU*,

3. Materiały i metody

3.1. Materiały

3.1.1. Linie komórkowe

Do wykonania badań wykorzystano 7 linii komórkowych zakupionych z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Komórkowych (ATCC, ang. *American Type Culture Collection*) - 6 linii nowotworowych raka jelita grubego zróżnicowanych pod względem fenotypu (Caco-2, HT29, HCT15, HCT116, SW480, SW620) oraz linia nabłonka jelita grubego, CCD 841 CoN (Tabela 3). W badaniach użyto linie Caco-2 oraz HT-29 stabilnie transfekowane wektorem ekspresyjnym pcDNA 3.1/Hygro (+) (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornia, Stany Zjednoczone) zawierającym cDNA dla NMU. Wygenerowano następujące sublinie: Caco-2 pcDNA, Caco-2 NMU1, Caco-2 NMU3 oraz HT29 pcDNA, HT29 NMU1, HT29 NMU45. Wektor pcDNA 3.1/Hygro (+) z sekwencją kodującą NMU, jak i sublinie HT29 zostały wykonane przez dr. Kamilę Soboską w Pracowni Sygnalizacji Komórkowej Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi.

Tabela 3. Charakterystyka linii raka jelita grubego.

Linia	Pochodzenie	Klasyfikacja CMS	Choroba/stopień zaawansowania na podstawie klasyfikacji TNM	Mutacja		
				<i>KRAS</i>	<i>BRAF</i>	<i>APC</i>
CCD 841 CoN	Nabłonek okrężnicy	x	Tkanka prawidłowa / 0	brak	brak	Brak
Caco-2	Guz pierwotny	CMS4	Rak jelita grubego / II	brak	brak	Występuje
HT29	Guz pierwotny	CMS3	Gruczolakorak jelita grubego / II	brak	V600E T119S	Występuje
HCT15	Guz pierwotny	CMS1	Gruczolakorak jelita grubego / III	G13D	brak	Występuje
HCT116	Guz pierwotny	CMS4	Rak jelita grubego / IV	G13D	brak	Brak
SW480	Guz pierwotny	CMS4	Gruczolakorak jelita grubego / II	G12V	brak	Występuje
SW620	Przerzuty do węzłów chłonnych	CMS4	Gruczolakorak jelita grubego / III	G12V	brak	Występuje

3.1.2. Odczynniki

W celu sporządzenia roztworów używano wody o przewodności 18,2 MΩ×cm oczyszczonej metodami odwróconej osmozy i dejonizacji w aparacie MilliQ® Integral (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Odczynniki używane do doświadczeń charakteryzowały się najwyższym możliwym stopniem czystości.

3.1.2.1. Odczynniki do hodowli komórek

- Medium wzrostowe MEM (ang. *Minimum Essential Medium*), Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone)
- Medium wzrostowe RPMI1640 (ang. *Roswell Park Memorial Institute*), modyfikowane wg ATCC, Thermo Fisher Scientific)
- Medium wzrostowe McCoy 5A (Thermo Fisher Scientific)
- Medium wzrostowe DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), Thermo Fisher Scientific)
- 100 mM aminokwasy endogenne MEM (100x) (Thermo Fisher Scientific)
- 100 mM pirogronian sodu (100x) (Sigma-Aldrich, Missouri, Stany Zjednoczone)
- Płodowa surowica bydlęca - FBS (ang. *Fetal Bovine Serum*, Sigma-Aldrich)

3.1.2.2. Antybiotyki

- 10 000 jednostek/ml penicylina (100x)/10 000 µg/ml streptomycyna (100x) (Thermo Fisher Scientific)
- 50 mg/ml primocyna (500x) (Invivogen, San Diego, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- 50 mg/ml hygromycyna B (Toku-E, Belgia)
- 50 mg/ml genetycyna (Thermo Fisher Scientific)

3.1.2.3. Enzymy proteolityczne

- 0,25% trypsyna/EDTA (Sigma-Aldrich)
- Akutaza (400 jednostek/ml) rozpuszczona w roztworze soli fizjologicznej wg modyfikacji Dulbecco (DPBS) bez jonów Ca²⁺ oraz Mg²⁺ (Sigma-Aldrich)

3.1.2.4. Komercyjne zestawy odczynników

- Plasmotest – Mycoplasma Detection Kit (Invivogen)
- ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega, Madison, Wisconsin, Stany Zjednoczone)
- Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide (Agilent Technologies, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- High-Capacity cDNA Reverse transcription kit (Applied Biosystems, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- FastStart Essential DNA Probes Master lub FastStart Essential DNA Green Master (Roche, Basel, Szwajcaria)
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)
- Xfect™ Transfection Reagent (Takara, Dalian, Liaoning)
- Dynabeads™ Protein an Immunoprecipitation Kit (Thermo Fisher Scientific)

3.1.2.5. Barwniki i sondy fluorescencyjne

- Hematoksylina (Chempur, Polska)
- Eozyna (Chempur, Polska)
- Fluo-4 AM (acetoksymetylowy ester kalceiny) (Invitrogen)
- Cell Tracker™ Green CMFDA Dye (dioctan 5-chlorometylofluoresceiny) (Invitrogen)
- Heochest 33342 (Invitrogen)

3.1.2.6. Peptydy

- NMU-9, neuromedyna U powstała na drodze chemicznej syntezy zawierająca sekwencję aminokwasową odpowiadającą 9 ostatnim aminokwasom ludzkiej NMU, składająca się z aminokwasów: Gly-Tyr-Phe-Leu-Phe-Arg-Pro-Arg-Asn-NH₂ (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- Agonista receptora NMUR1, SBL-NMU-21: Ac-Tyr-Phe-Leu-Dmt-Arg-Pro-Arg-Asn-NH₂ oraz agonista receptora NMUR2, SBL-NMU-17: H-Tyr-Phe-Leu-Phe-Arg-Tic-Arg-Asn-NH₂ z potwierdzoną aktywnością względem receptorów NMUR1 oraz NMUR2 (De Prins i wsp. 2018, De Prins i wsp. 2020) (udostępnione do badań przez Profesora Steven'a Ballet'a (Vrije Universiteit Brussel))

3.1.3. Przeciwciała

3.1.3.1. Przeciwciała I-rzędowe

- królicze, anty-NMU (Abbexa, Cambridge, Wielka Brytania)
- królicze, anty-NMU (Genetex, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- królicze, anty-ERK_{1/2} (Santa Cruz Biotechnology, Teksas, Stany Zjednoczone)
- królicze, anty-pERK_{1/2} (Invitrogen)
- królicze, anty-GM130 (Cell Signaling Technologies, Danvers, Massachusetts, Stany Zjednoczone)
- królicze, anty-aneksyna V (Cell Signaling Technologies)
- królicze, anty-flotylna-1 (Cell Signaling Technologies)
- mysie, anty- α -tubulina (Abcam, Cambridge, Wielka Brytania)
- królicze, anty-GAPDH (Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego) (Abcam)
- mysie, anty- α 2 (BD Pharmingen Inc, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- mysie, anty- α 4 (BD Pharmingen Inc)
- mysie, anty- α 5 (Santa Cruz Biotechnology)
- mysie, anty- α 6 (Santa Cruz Biotechnology)
- szczurze, anty- α V (R&D Systems, Minnesota, Stany zjednoczone)
- mysie, anty- β 1 (Merck Millipore)
- szczurze, anty- β 4 (BD Pharmingen Inc)
- mysie, anty- β 6 (R&D Systems)
- mysie, anty- α V β 5 (R&D Systems)

3.1.3.2. Przeciwciała II-rzędowe

- kozie, anty-królicze przeciwciała sprzężone z HRP (Peroksydaza chrzanowa) (Invitrogen)
- białko wiążące mysie przeciwciała IgG sprzężone z HRP (Santa Cruz Biotechnology)

3.1.4. Bufory

- Roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanami, pH 7,5 – PBS (ang. *Phosphate Buffered Saline*) (Corning)
- 2x bufor RIPA (300 mM NaCl, 100 mM TRIS-HCl pH 7,5, 0,2% SDS)
- Bufor do elektroforezy SDS-PAGE (25 mM TRIS, 192 mM glicyna, 0,1% SDS)

- 5x bufor do próbek (312,5 mM TRIS-HCl pH 6,8, 10% SDS, 50% glicerol, 5% β -merkaptoetanol, 0,01% błękit bromotymolowy)
- Sól fizjologiczna buforowana TRISem - TBS (150 mM NaCl, 50 mM TRIS pH 7,5)
- TBS-T (TBS z 0,1% Tween 20)
- Bufor do elektroforezy w żelach agarozowych, TAE (40 mM TRIS, 20 mM kwasu octowego 1 mM EDTA pH 8,0)
- PBS/BSA/EDTA (0,5% BSA, PBS, 2 mM EDTA)
- PBS/BSA (0,1% BSA, PBS)

3.1.5. Pozostałe odczynniki

- 5-aza-2'-deoksytydyna (5-aza-CdR, Sigma-Aldrich)
- Agaroz (Abo, Grażyna Boreysza, Gdańsk, Polska)
- Woda wolna od nukleaz (Thermo Fisher Scientific)
- Inhibitory proteaz i fosfataz - *Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail* (Thermo Fisher Scientific)
- Albumina surowicy bydlęcej - BSA (ang. *Bovine Serum Albumin*, Sigmal-Aldrich)
- Żele poliakrylamidowe (Bio-Rad, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- Membrany nitrocelulozowe (Bio-Rad)
- 13-octan 12-mirystynian forbolu - PMA (Invivogen)
- Poli-D-lizyna (Sigmal-Aldrich)
- Matrigel, ekstrakt z mięsaka myszy, bogaty w składniki błony podstawnej takie, jak: laminina, kolagen IV i proteoglikany (Corning)
- Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich)
- 50 mg/ml bromek etydyny (Sigma-Aldrich)
- Medium do przechowywania komórek w ciekłym azocie - *Recovery™ Cell Culture Freezing Medium* (Thermo Fisher Scientific)
- PD98059 - inhibitor szlaku kinaz MAPK (Invivogen)
- Pluronic-127 (Sigma-Aldrich)

3.2. Metody

3.2.1. Hodowla komórkowa

Hodowlę komórek prowadzono w warunkach jałowych, w sterylnych, jednorazowych naczyniach hodowlanych firmy Thermo Fisher Scientific. Format oraz powierzchnia hodowlana naczynia uzależniona była od rodzaju wykonywanego eksperymentu. Komórki hodowano w kompletnym medium hodowlanym wzbogaconym bydlęcą surowicą płodową (FBS) – 10% lub 20% v/v, z dodatkiem antybiotyków: penicyliny (100 jednostek/ml) i streptomycyny (100 µg/ml) oraz primocyny (100 ng/ml), w warunkach standardowych w inkubatorze CO₂ (temp. 37 °C, 95% powietrza, 5% CO₂, 100% wilgotności względnej). Wszystkie wykorzystane linie komórkowe hodowane były według zaleceń dostawcy (Tabela 4). Sublinie z nadekspresją *NMU* uzyskane w wyniku transfekcji hodowano z dodatkiem hygromycyny B w stężeniu końcowym 250 µg/ml (sublinie Caco-2) lub 450 µg/ml (sublinie HT29).

Wszystkie hodowle komórkowe testowano okresowo na obecność bakterii z rodzaju *Mycoplasma* wykorzystując do tego zgodnie z instrukcją zestaw *PlasmoTest – Mycoplasma Detection Kit* firmy InvivoGen. Komórki wysiano w medium bez dodatku antybiotyków na płytki 6-dołkowe, a następnie inkubowano przez 48 godzin w 37 °C. Komórki mechanicznie usunięto z podłoża i wraz z medium przeniesiono do probówek typu eppendorf, które inkubowano przez 15 minut w 98 °C. Następnie tak przygotowaną zawiesinę inkubowano z komórkami HEK-Blue-2 na płytkach 96-dołkowych przez 24 godziny. Po tym czasie porównywano zabarwienie próby pozytywnej oraz negatywnej dostarczonej w zestawie z badanym medium znad komórek HEK-Blue-2.

Po przeprowadzeniu badań potwierdzono autentyczność wykorzystanych linii komórkowych za pomocą analizy profilu STR (ang. *Short Tandem Repeats*) komórek (Eurofins).

Tabela 4. Podłoża (media) stosowane w hodowli linii komórkowych.

Linia komórkowa	Medium hodowlane	Dodatki
CCD 841 CoN	MEM	10% FBS 1 mM MEM Non-Essential Amino Acids 1 mM pirogronian sodu
Caco-2 Caco-2 pcDNA Caco-2 NMU1 Caco-2 NMU3	MEM	20% FBS 1 mM MEM Non-Essential Amino Acids 1 mM pirogronian sodu
HT29 HT29 pcDNA HT29 NMU1 HT29 NMU45	McCoy 5A	10% FBS
HCT15	McCoy 5A	10% FBS, inaktywowany termicznie
HCT116	McCoy 5A	10% FBS, inaktywowany termicznie
SW480	RPMI1640	10% FBS
SW620	RPMI1640	10% FBS

3.2.2. Trypsynizacja i pasażowanie komórek

Wszystkie linie komórkowe użyte do badań są adherentne, rosnące w monowarstwie. Pasażu komórek dokonywano, gdy poziom konfluencji osiągnął minimum 90%. Po usunięciu medium hodowlanego, komórki przemywano 8 ml roztworu PBS, a następnie inkubowano 5 minut w 37 °C w roztworze trypsyny o stężeniu 0.25% z dodatkiem EDTA (300 µl na 25 cm² powierzchni lub 500 µl na 75 cm² powierzchni). Po upływie tego czasu do odklejonych komórek dodawano odpowiednią ilość świeżego podłoża w celu inaktywacji trypsyny, a następnie przenoszono je do nowego naczynia hodowlanego.

3.2.3. Transfekcja i selekcja klonalna

W celu ustalenia stężenia antybiotyku selekcyjnego, komórki Caco-2 wysiano na płytki 24-dołkowe w pełnym medium i inkubowano 48 godzin. Następnie do komórek dodano hygromycynę B w 20 różnych stężeniach w zakresie od 0 µg/ml do 500 µg/ml. Komórki hodowano przez 3 tygodnie, zmieniając medium na świeże oraz dodając

antybiotyk co 48 godzin. Po tym czasie wybrano najniższe stężenie powodujące śmierć wszystkich komórek. Analogicznie wybrano stężenie antybiotyku selekcyjnego w przypadku komórek HT29. Wybrane stężenie w przypadku sublinii Caco-2 wynosiło 250 µg/ml, natomiast sublinii HT29 450 µg/ml.

Komórki Caco-2 wysiano na płytki 24-dołkowe w ilości 8×10^5 komórek /dołek w pełnym medium i inkubowano 24 godziny w 37 °C. Po inkubacji przeprowadzono transfekcję chemiczną plazmidem pcDNA wykorzystując komercyjnie dostępny zestaw *Xfect™ Transfection Reagent* firmy Takara. Medium na płytce zmieniono na pozbawione penicyliny i streptomycyny. Do dwóch probówek typu eppendorf dodano po 200 µl buforu *X-fect reaction* oraz odpowiednio po 1,5 µl plazmidu pcDNA 3.1/Hygro (+) oraz plazmidu pcDNA 3.1/Hygro (+) z wklonowaną sekwencją kodującą NMU (przygotowanego przez dr Kamilę Soboską) oba w końcowym stężeniu 1 µg/ml. Następnie przygotowane probówki dokładnie wymieszano za pomocą worteksu i dodano po 0,3 µl odczynnika *X-fect*. Eppendorfy dokładnie zworteksowano i pozostawiono przez 10 minut w temp. pokojowej. Po skończonej inkubacji mieszaninę zawierającą plazmid dodano do komórek, a następnie inkubowano przez 4 godziny w 37 °C. Po tym czasie medium zmieniono na świeże z dodatkiem penicyliny i streptomycyny. Komórki inkubowano 48 godzin w 37 °C po czym wyizolowano z nich białko buforem RIPA z 1% Igepalem CA-630 i inhibitorami proteaz. Obecność białka w transfekowanych komórkach analizowano metodą Western immunoblotting opisaną poniżej.

Po potwierdzeniu obecności NMU w wyniku transfekcji przejściowej, komórki przesiano na szalki o średnicy 15 cm² w pełnym medium z dodatkiem hygromycyny B (250 µg/ml) i inkubowano przez 4 tygodnie, co 48 godzin zmieniając medium wraz antybiotykiem na świeże. Powstałe pojedyncze kolonie odklejano na pomocą trypsyny i przenoszono na płytki 24-dołkowe. Płytki inkubowano w 37 °C do czasu osiągnięcia odpowiedniej konfluencji i następnie komórki przesiewano na butelki hodowlane o powierzchni 25 cm². Poziom białka po transfekcji sprawdzono za pomocą metody Western immunoblotting, która została opisana w rozdziale 3.2.10. Wyselekcjonowane sublinie zamrożono w komercyjnie dostępnym medium *Recovery™ Cell Culture Freezing Medium* i przechowywano w ciekłym azocie w -195,8 °C.

3.2.4. Izolacja RNA

Do izolacji RNA wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw *ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System* firmy Promega. Komórki wysiewano na płytki 6-dołkowe, a następnie inkubowano do osiągnięcia minimum 90% konfluencji. Komórki przemywano roztworem PBS i dodawano 250 µl/dołek mieszanki buforu lizującego (BL) oraz 1-tioglicerolu (TG) w stosunku 99:1. Po 5 minutowej inkubacji komórki usuwano mechanicznie za pomocą skrobaczek i przenoszono do probówek typu eppendorf o pojemności 1,5 ml. W celu wyprecypitowania RNA dodawano izopropanol (85 µl/próbkę). Po dokładnym wymieszaniu, zawiesinę przenoszono na kolumny, które umieszczano w probówkach zbiorczych, a następnie wirowano (12 000 g, 30 sekund, temp. pokojowa). Po wirowaniu na kolumnie pozostawały związane kwasy nukleinowe, natomiast bufor oraz pozostałe elementy komórek znajdowały się w przesączu. Złoże przemywano buforem płuczącym (Wash) i wirowano (12 000 g, 30 sekund, temp. pokojowa). Eluat usuwano, a na kolumnę dodawano 30 µl mieszanki trawiącej pozostałości genomowego DNA: Yellow Core Buffer (24 µl/próbkę), 0,09 mM MgCl₂ (3 µl/próbkę) oraz deoksyrybonukleazę I (3 µl/próbkę), i inkubowano przez 15 minut w temp. pokojowej, po upływie tego czasu dodawano 200 µl buforu płuczającego (Column Wash) i wirowano (12 000 g, 15 sekund, temp. pokojowa). Kolumnę następnie dwukrotnie przepłukiwano buforem płuczającym (Wash), 500 µl oraz 300 µl i wirowano jak powyżej. Kolumny przekładano do nowych probówek zbiorczych i wirowano w celu osuszenia złoża (12 000 g, 2 minuty, temp. pokojowa). Następnie RNA wymywano z kolumny za pomocą 30 µl wody wolnej od nukleaz i wirowano (12 000 g, 45 sekund, temp. pokojowa). Ilość oraz jakość uzyskanego RNA sprawdzano spektrofotometrycznie oceniając stężenie oraz stosunek długości fal 260/280 nm (~2) oraz 260/230 nm (1,8-2,0) wykorzystując ND-1000 Spectrophometer (Thermo Fisher Scientific). Dodatkowo jakość RNA oceniano wyznaczając współczynnik integralności – RIN (ang. *RNA integrity number*) wykorzystując komercyjnie dostępny zestaw *Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide* oraz Bioanalyzer 2100 firmy Agilent (Agilent Technologies).

3.2.5. Odwrotna transkrypcja

Uzyskane jednoniciowe RNA przepisano przy użyciu enzymu odwrotnej transkryptazy na dwuniciowy DNA używając komercyjnie dostępnego zestawu *High Capacity cDNA Reverse transcription kit* firmy Applied Biosystem. W bloku chłodzącym przygotowano mieszaninę dla każdej badanej próby zawierającą: 1 µg całkowitego RNA,

2 µl buforu do odwrotnej transkrypcji, 2 µl starterów Random Primers, 0,8 µl 100 mM mieszaniny deoksynukleotydów (dNTPs), 1 µl enzymu odwrotnej transkryptazy (50 jednostek/µl) oraz 4,2 µl wody wolnej od nukleaz. Następnie próbki do reakcji PCR uzupełniano wodą do końcowej objętości 20 µl. Reakcja odwrotnej transkrypcji przebiegała w trzech etapach (Tabela 5) i została przeprowadzona w termocyklerze firmy Biometra (Göttingen, Niemcy).

Tabela 5. Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji.

Etap	Temperatura	Czas
I – przyłączanie starterów	25 °C	10 minut
II – polimeryzacja DNA	37 °C	120 minut
III – dezaktywacja enzymu	85 °C	5 minut

3.2.6. Real-Time PCR

Do oceny poziomów mRNA dla *NMU*, *NMUR1*, *NMUR2*, *NTSR1*, *GHSR1b* oraz kontrolnych genów *GAPDH* i β -aktyny posłużyła metoda łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *Real-Time PCR*). Do reakcji PCR w czasie rzeczywistym wykorzystano komercyjnie dostępne zestawy *FastStart Essential DNA Probes Master* lub *FastStart Essential DNA Green Master* (Roche) oraz sondy typu TaqMan (Thermo Fisher Scientific). Do oceny poziomów mRNA dla *NMU*, *NMUR1* oraz *NMUR2* wykorzystano: 5 µl cDNA/reakcję, 1 µl 20x sondy TaqMan, 10 µl 2x *FastStart Essential DNA Probes Master* (zawiera polimerazę DNA *FastStart Taq*) oraz 4 µl wody, natomiast do oceny poziomów mRNA dla *NMUR1*, *NMUR2*, *NTSR1* oraz *GHSR1b* wykorzystano: 6 µl cDNA/reakcję, 4 µl 100 µM komplementarnych starterów, 10 µl 2x *FastStart Essential DNA Green Master* (zawiera polimerazę DNA *FastStart Taq* i barwnik SYBR Green I), prowadząc reakcję w końcowej objętości 20 µl. Zakupione sondy i zaprojektowane startery użyte do oznaczenia poziomu mRNA podano w Tabeli 6., natomiast w Tabeli 7. i Tabeli 8. przedstawiono warunki reakcji. Uzyskane wyniki przeanalizowano wstępnie w programie *LightCycler 96 v 1.1.* (Roche, Szwajcaria), a następnie w oprogramowaniu *DataAssist v 3.01* (Applied Biosystem). Wyniki przedstawiono w postaci relatywnej ekspresji genów porównanej do ekspresji genu referencyjnego ($2^{-\Delta C_t}$).

Ilość produktu wykorzystanego do reakcji PCR, wybór genu referencyjnego oraz warunki reakcji amplifikacji wyznaczono na drodze analiz krzywych wydajności dla poszczególnych par starterów.

Tabela 6. Sondy TaqMan oraz pary starterów wykorzystane podczas reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Nazwa genu	Sonda TaqMan	Sekwencje nukleotydowe starterów Kierunek startera (Forward/Revers)
<i>NMU</i>	Hs00183624_m1	-
<i>NMUR1</i>	Hs00173804_m1	5' GCCGGAGACAAGTGACCZZGA 3' 5' TGACACGACGCTCCACATG 3'
<i>NMUR2</i>	Hs00173930_m1	5' TCAACCTCGTCCATGTGGTG 3' 5' AGCGGCGAGACAGTAGGTTA 3'
<i>NTSR1</i>	-	5' CCGTCAAGGTCGTCATACAG 3' 5' GATGGTGGAGCTGACGTAGAA 3'
<i>GHSR1b</i>	-	5' CTTGGGACACCAACGAGTG3' 5' AGGACCCGCGAGAGAAAGC 3'
<i>GAPDH</i>	Hs_02758991_g1	5' TTGCCCTCAACGACCACTTT 3' 5' TCCTCTTGCTCTTGCTGG 3'
<i>β-aktyna</i>	Hs_01060665_g1	5' CTGGAACGGTGAAGGTGACA 3' 5' AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA 3'

Tabela 7. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym z użyciem sondy TaqMan.

Etap reakcji	Temperatura	Czas trwania
Inkubacja wstępna	95 °C	10 minut
Amplifikacja (45 cykli):		
Denaturacja	95 °C	10 sekund
Przyłączanie starterów	60 °C	20 sekund

Tabela 8. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym z użyciem zaprojektowanych starterów.

Etap reakcji	Temperatura	Czas trwania
Inkubacja wstępna	95 °C	10 minut
Amplifikacja (45 cykli):		
Denaturacja	95 °C	20 sekund (<i>NMUR1, NMUR2</i>) 10 sekund (<i>NTSR1, GHSR1b</i>)
Przyłączanie starterów	60 °C	20 sekund (<i>NMUR1, NMUR2</i>) 10 sekund (<i>NTSR1, GHSR1b</i>)
Wydłużanie łańcucha	72 °C	20 sekund (<i>NMUR1, NMUR2</i>) 14sekund (<i>NTSR1, GHSR1b</i>)
Melting	95 °C	10 sekund
	65 °C	60 sekund
	97 °C	1 sekunda

3.2.7. Izolacja białka

Komórki wysiano na płytki 6-dołkowe lub butelki hodowlane o powierzchni 25cm². Po uzyskaniu konfluencji minimum 90% komórki przemyto zimnym roztworem PBS, a następnie użyto 200-500 µl buforu lizującego RIPA z 1% Igepalem CA-630 oraz inhibitorami proteaz i fosfataz (Tabela 9). Próbkę poddano inkubacji na lodzie przez 30 minut, zwirowano (20 000 g, 20 minut, 4 °C), a supernatant z nad osadu przeniesiono do nowych próbek i przechowywano w –80 °C.

Tabela 9. Skład *Halt Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail*.

Inhibitor	Cel
Aprotynina	Proteazy serynowe
Bestatyna	Aminopeptydazy
E-64 (epoksyd)	Proteazy cysteinowe
Leupeptyna	Proteazy serynowe i cysteinowe
Fluorek sodu	Fosfatazy serynowe i treoninowe
Ortowanadan sodu	Fosfatazy zasadowe i tyrozynowe
Pirofosforan sodu	Fosfatazy serynowe i treoninowe
β-glicerofosforan	Fosfatazy serynowe i treoninowe

3.2.8. Ocena stężenia białka

Na płytce 96-dołkowej wykonano krzywą wzorcową używając standardowego roztworu BSA w 8 stężeniach od 2 mg/ml do 0 mg/ml. Lizaty białkowe rozcieńczono dwukrotnie z roztworem PBS na płytce 96-dołkowej w końcowej objętości 10 µl. Do każdego dołka dodano po 200 µl roztworu BCA z komercyjnie dostępnego zestawu *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* w stosunku 1:50 (reagent A zawierający kwas bicynchoninowy: reagent B zawierający jony miedzi Cu²⁺). Płytkę inkubowano przez 30 minut w 37 °C w ciemności, następnie dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali λ=562 nm. Z krzywej kalibracyjnej odczytano stężenie białka całkowitego zawartego w poszczególnych próbach.

3.2.9. Elektroforeza

Rozdział elektroforetyczny białek prowadzono w żelach poliakrylamidowych 10% lub gradientowych 4-15% (Bio-Rad) w warunkach denaturujących i redukujących. Do lizatów zawierających odpowiednią ilość białka dodawano 5 krotnie stężonego buforu do próbek z dodatkiem 2-merkaptoetanolu, następnie próbki poddawano denaturacji w 95 °C przez 5 minut. Po ostudzeniu, próbki nakładano na żel i dokonywano rozdziału elektroforetycznego przy stałym natężeniu prądu 100 mA.

3.2.10. Western immunoblotting

Białka rozdzielone w żelu poliakrylamidowym przeniesiono na membrany nitrocelulozowe z wykorzystaniem aparatu do szybkiego transferu białek (Trans-Blot Turbo Transfer System) firmy Bio-Rad. Parametry reakcji były dobierane adekwatnie do wielkości analizowanych białek. Po zakończeniu transferu membrany nitrocelulozowe przepłukano w roztworze TBS, a następnie niespecyficzne miejsca wiązania białek na membranie blokowano 1 godzinę w temp. pokojowej za pomocą 5% roztworu odtłuszczonego mleka lub 5% roztworu BSA sporządzonym w buforze TBS-T. Wysyczone membrany inkubowano przez całą noc w temp. 4 °C z przeciwciałami pierwszorzędowymi skierowanymi przeciw odpowiednim białkom (Tabela 10). Po zakończonej inkubacji nadmiar przeciwciał odpłukano trzykrotnie przez 15 minut roztworem TBS-T, a następnie membrany inkubowano w temp. pokojowej przez 1 godzinę z przeciwciałami drugorzędowymi skoniugowanymi z HRP. Membrany ponownie odpłukano trzykrotnie przez 15 minut roztworem TBS-T. Do wizualizacji białka na membranie wykorzystano metodę chemiluminescencji. Poziom sygnał widoczny na kliszy został poddany analizie densytometrycznej w programie ImageJ porównując stosunek intensywności otrzymanych prążków.

Tabela 10. Przeciwciała wykorzystane podczas Western immunoblotting.

Przeciwciało I-rzędowe	Gospodarz	Rozcieńczenie
anty – NMU	królik	1:1000
anty - NMU (immunoprecypitacja)	królik	1:1000
anty - ERK _{1/2}	mysz	1:500
anty - pERK _{1/2}	królik	1:1000
anty - GM130	królik	1:1000
anty - aneksyna V	królik	1:1000
anty - flotylina-1	królik	1:1000
anty - α -tubulina	mysz	1:5000
anty – GAPDH	królik	1:10 000
Przeciwciało II-rzędowe	Gospodarz	Rozcieńczenie
anty – królicze	koza	1:5000
anty – mysie	białko HRP	1:2500

3.2.11. Immunoprecypitacja

Linie komórkowe raka jelita grubego oraz sublinie Caco-2 i HT29 hodowano na butelkach hodowlanych 75 cm² do konfluencji 80-90%, następnie medium usunięto, a komórki przepłukano roztworem PBS i dodano 5 ml medium pozbawionego FBS. Po 48 godzinach, zebrano 2 ml medium znad komórek i zwirowano (1000 g, 20 minut, 4°C), następnie przeprowadzono immunoprecypitację wykorzystując zestaw *Dynabeads™ Protein A Immunoprecipitation Kit* firmy Thermo Fisher Scientific. W dwóch osobnych probówkach przygotowano mieszaniny zawierające po 200 μ l buforu wiążącego, 20 μ l kulek magnetycznych oraz odpowiednio po 2 μ g króliczych przeciwciał przeciw NMU lub kontrolnych przeciwciał IgG z surowicy królika. Następnie przygotowane mieszaniny inkubowano 20 minut w temp. pokojowej z rotacją po czym usunięto resztki buforu wiążącego. Wszystkie etapy usuwania supernatantu były wykonywane po uprzednim umieszczeniu probówek w statywie magnetycznym. Przeciwciała związane z kulkami magnetycznymi dodano do medium pochodzącego znad komórek, a następnie inkubowano przez 1,5 godziny w temp. pokojowej z rotacją. Medium usunięto, a probówki przepłukano trzykrotnie buforem płuczającym.

Kompleks przeciwciało-antygen wmywano buforem do próbek z 2-merkaptoetanołem, przeprowadzono elektroforezę i wizualizację białka według opisanej wcześniej metody.

3.2.12. Demetylacja DNA

Komórki HT29, HCT116 oraz HCT15 wysiano na płytki 6-dołkowe w pełnym medium i inkubowano 6 godzin do czasu przyklejenia komórek do powierzchni dołka. Po tym czasie do medium dodano inhibitor metylacji DNA, 5-aza-CdR, w końcowym stężeniu 50 μ M. Medium wraz z inhibitorem zmieniano co 24 godziny. Po 96 godzinach inkubacji z inhibitorem, z komórek wyizolowano RNA, przeprowadzono odwrotną transkrypcję oraz sprawdzono poziom mRNA dla *NMUR1* oraz *NMUR2* w komórkach kontrolnych oraz traktowanych inhibitorem. Zaprojektowane startery użyte do oznaczenia poziomu mRNA podano w Tabeli 6., natomiast w Tabeli 8. przedstawiono warunki reakcji. Produkty po przeprowadzeniu reakcji PCR w czasie rzeczywistym zostały rozdzielone w 2% żelu agarozowym z bromkiem etydyny w końcowym stężeniu 12,5 μ g/ml. Efekt rozdziału uwidoczniło się w świetle UV i utrwalono za pomocą kamery cyfrowej umieszczonej w urządzeniu Alpha Innotech FluorChem 8800 firmy Cell Biosciences (San Leandro, Kalifornia, Stany Zjednoczone).

3.2.13. Aktywacja kinaz białkowych ERK_{1/2}

Komórki Caco-2 wysiano na płytki 6-dołkowe i hodowano do konfluencji 60-70%, 24 godziny przed eksperymentem usunięto medium i dodano 1 ml medium bez FBS. Następnie do każdego z dołków dodawano 12-mirystynian 13-octan forbolu (PMA) w końcowym stężeniu 3 ng/ml oraz agonistę receptora 2 dla NMU (SBL-NMU-17) w końcowym stężeniu 250 nM. Aktywacja kinaz pERK_{1/2} sprawdzana była w przypadku PMA po 15 minutach, natomiast w przypadku agonisty po 3, 5, 7, 15 minutach. Z komórek wyizolowano białko, zmierzono jego stężenie, po czym dokonano rozdziału elektroforetycznego i analizy metodą Western immunoblotting. Poziom białka poddano analizie densytometrycznej w programie ImageJ, porównując stosunek intensywności prążków kinaz ERK_{1/2}, pERK_{1/2} i białka kontrolnego α -tubuliny.

3.2.14. Test formowania kolonii

Sublinie Caco-2 (Caco-2 pcDNA, Caco-2 NUM1, Caco-2 NMU3) oraz HT29 (HT29 pcDNA, HT29 NMU1, HT29 NMU45) wysiano na płytki 6-dołkowe po 500 komórek na dołek w 2 ml pełnego medium. Płytki inkubowano przez 7 dni w 37 °C, co 48 godzin zmieniając medium na świeże. Po zakończeniu inkubacji komórki przemyto roztworem PBS z jonami Mg²⁺ i Ca²⁺. Następnie komórki utrwalono w roztworze lodowatego kwasu octowego i metanolu w stosunku 1 do 3, przez 15 min w -20 °C. Utrwalone komórki dwukrotnie przepłukano roztworem PBS. W celu wybarwienia jąder komórkowych wykorzystano 1 ml/dołek roztworu hematoksyliny (8 minut, temp. pokojowa), która jest substancją zasadową, natomiast do wybarwienia białek cytoplazmatycznych użyto 1 ml/dołek 1% roztworu eozyny będącej słabym kwasem. Każdorazowo komórki przemywano roztworem PBS. Kolonie utworzone z więcej niż 50 komórek policzono pod mikroskopem Nikon Eclipse TE 2000-U (Nikon, Tokio, Japan).

3.2.15. Test migracji i inwazyjności z wykorzystaniem filtrów poliwęglanowych

Test migracji oraz inwazyjności przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych filtrów poliwęglanowych o średnicy 8µm (Thermo Fisher Scientific), które następnie umieszczono w płytce 24-dołkowej. W przypadku testu inwazyjności filtr uprzednio pokrywano 30 µl Matrigelu w końcowym stężeniu 0,5 mg/ml. Sublinie Caco-2 oraz HT29 odklejano od naczynia hodowlanego poprzez dodanie 500 µl akutazy. Następnie 2×10⁵ komórek odwirowano (200 g, 5 minut, temp. pokojowa) i zawieszono w 500 µl medium pozbawionego FBS. Do wszystkich sublinii dodano po 0,5 µl barwnika fluorescencyjnego – Cell Tracker i inkubowano 30 minut w 37 °C. Po upływie tego czasu komórki odwirowano (200 g, 5 minut, temp. pokojowa), a osad zawieszono w 200 µl medium pozbawionego FBS i dodano na górę filtru. Poza filtr, do dołka dolnego dodano 600 µl medium zawierającego 10% FBS. Płytki z filtrami inkubowano 3 godziny w przypadku testu migracji lub 6 godzin w przypadku testu inwazyjności w 37 °C. Po zakończeniu inkubacji komórki, które nie przemigrowały zostały usunięte przy pomocy bawełnianego aplikatora. Filtry przepłukano dwukrotnie w roztworze PBS w celu pozbycia się resztek komórek, a następnie wykonano 6 zdjęć losowo wybranych miejsc dla każdego filtra przy pomocy mikroskopu Nikon Eclipse TE 2000-U, z obiektywem 10x oraz oprogramowaniem NIS-Elements Advanced Research. Liczba komórek została zliczona przy pomocy oprogramowania ImageJ przez dwie niezależne osoby.

3.2.16. Ocena zawartości NMU w mikropęcherzykach pochodzenia komórkowego

Komórki HCT116 wysiano na szalki o średnicy 15 centymetrów, po 48 godzinach zmieniono medium na zawierające 10% FBS, które wcześniej poddane zostało ultrawiroowaniu (100 000 g, 16 godzin, 4 °C) w celu usunięcia egzosomów. Następnie po 48 godzinach inkubacji medium zebrano i poddano dwukrotnemu wirowaniu, w wyniku pierwszego wirowania usunięte zostały pozostałości komórek (300 g, 10 minut, 4 °C), a w drugim usunięto ciała apoptotyczne (2000, 20 minut, 4 °C), zebrany supernatant poddano ultrawiroowaniu (100 000 g, 1,5 godziny, 4 °C), osad zawieszono w buforze PBS i poddano ultrawiroowaniu (100 000 g 1,5 godziny, 4 °C). Osad zawieszono w buforze RIPA zmodyfikowanym według publikacji P. Kucharzewskiej i wsp. (2013), a następnie dokonano rozdziału elektroforetycznego oraz wizualizacji białek za pomocą swoistych przeciwciał i metody Western immunoblotting.

3.2.17. Mobilizacja wapnia

Komórki HT29 oraz HCT116 wysiano na płytki 24-dołkowe pokryte poli-D-lizyną i inkubowano 24 godziny w 37 °C. Po inkubacji wykonano barwienie jąder komórkowych barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst 33342 przez 15 minut w 37 °C. Dodatkowo komórki wyznakowano sondą fluorescencyjną Fluo-4 AM w końcowym stężeniu 5 µM (45-60 minut, 37 °C) w obecności 0,5% detergentu, pluronic-127, w medium hodowlanym z 0,1% BSA. Wszystkie inkubacje przeprowadzono w medium pozbawionym FBS i antybiotyku. Nadmiar sondy Fluo-4 AM odpłukano roztworem PBS, a do komórek dodano 300 µl medium pozbawionego FBS. Rejestracja obrazu za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu odwróconego AxioVert (Zeiss), (obiektyw 10x) i analiza danych za pomocą oprogramowania FIJI image processing package (doi:10.1038/nmeth.2019) wykonana została w pracowni Zakładu Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Uniwersytetu Medycznego w Łodzi we współpracy z dr T. Przygodzkim. Komórki traktowano NMU-9 (1 µM) oraz agonistą NMUR1, SBL-NMU-21 (40 nM) lub agonistą NMUR2, SBL-NMU-17 (200 nM). Stężenia peptydów zostały wybrane eksperymentalnie. Były to najniższe stężenia, które wywołały istotną zmianę fluorescencji w badanym układzie. Reakcję komórek na zastosowane związki utrwalono wykonując ciągłą rejestrację obrazu przez 60 sekund. Analiza obrazów pozwoliła na przedstawienie wyników jako procent komórek, w których doszło do zmian fluorescencji w wyniku mobilizacji wapnia komórkowego (Przygodzka i wsp. 2021).

Program użyty do analizy obrazów zamieszczono jako suplement do publikacji Przygodzka i wsp. 2021. Reprezentatywne filmy zarejestrowane podczas eksperymentu zostały umieszczone w repozytorium Repozytorium Otwartych Danych – RepOD (Przygodzka, Patrycja, 2021, "Calcium mobilisation upon NMURs activation in CRC cells", <https://doi.org/10.18150/XXYTZD>, RepOD, V1).

3.2.18. Cytometria przepływowa

Komórki HT29 oraz Caco-2 z nadekspresją NMU odklejono od podłoża hodowlanego poprzez inkubację z akutazą, 10 minut w 37 °C. 1×10^6 komórek odwirowano (200 g, 5 minut, temp. pokojowa), osad zawieszono w mieszaninie PBS/BSA/EDTA i rozporcjowano do probówek typu eppendorf po 100 μ l do barwienia jednoetapowego przeciwciałami sprzężonymi z barwnikami fluorescencyjnymi (Tabela 11) lub po 200 μ l do barwienia dwuetapowego. W przypadku barwienia jednoetapowego inkubacja trwała 30 minut, następnie komórki przemywano PBS, wirowano (200 g, 5 minut, temp. pokojowa) i zawieszano w 300 μ l PBS/BSA. W przypadku barwienia dwuetapowego, inkubacja z przeciwciałami I-rzędowymi trwała 45 minut. Po przemyciu PBS komórki inkubowano z przeciwciałami II-rzędowymi (Thermo Fisher Scientific) przez 30 minut w ciemności. Po inkubacji komórki przemywano PBS, wirowano (200 g, 5 minut, temp. pokojowa) i zawieszano w 300 μ l PBS/BSA. Jako kontrolę stosowano komórki wybarwione odpowiednimi przeciwciałami izotypowymi (Thermo Fisher Scientific). Odczyt przeprowadzono przy użyciu cytometru przepływowego FACS LSR II BD (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nowy Jork, Stany Zjednoczone) oraz oprogramowania BD FACSDiva. Analizę otrzymanych wyników przeprowadzono w programie FlowJo™ 10.7.1 firmy Becton Dickinson.

Tabela 11. Przeciwciała wykorzystane do oceny ekspresji powierzchniowej podjednostek integrynowych.

Nazwa podjednostki integrynowej	Izotyp	Gospodarz	Znacznik fluorescencji
$\alpha 2$	IgG1K	mysz	FITC
$\alpha 4$	IgG1K	mysz	FITC
$\alpha 5$	IgG2b	mysz	FITC
$\alpha 6$	IgG2a	szczur	FITC
αV	IgG1	mysz	PE
$\beta 1$	IgG2b κ	mysz	X
$\beta 4$	IgG2b κ	szczur	PE
$\beta 6$	IgG2b κ	mysz	X
$\alpha V\beta 5$	IgG1	mysz	PE
II-rzędowe anty-mysie	X	koza	FITC

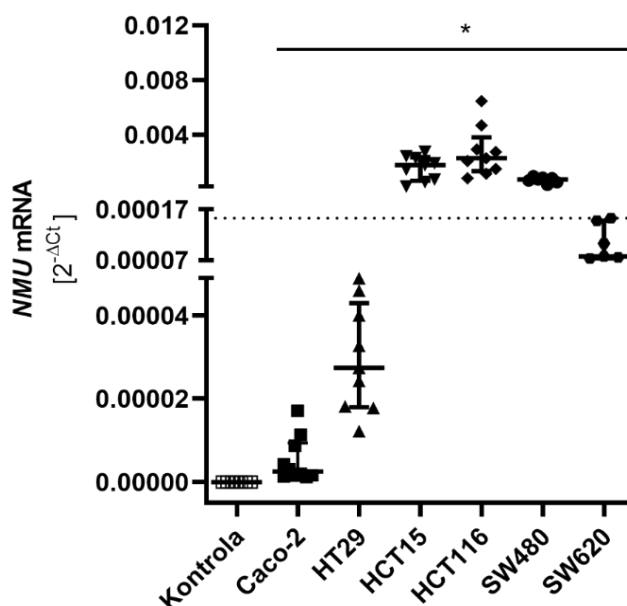
3.2.19. Analiza statystyczna

Wyniki badań uzyskano w minimum 3 niezależnych eksperymentach. Do oceny istotności statystycznej uzyskanych wyników wykorzystano program GraphPad Prism v 7.05 (GraphPad Prism Software, Stany Zjednoczone). Wyniki przeanalizowano pod kątem normalności rozkładu Gaussa testem Shapiro-Wilka. W przypadku uzyskania rozkładu normalnego, przeprowadzono test t-Studenta dla dwóch grup lub test ANOVA dla porównań wielokrotnych. Natomiast w przypadku danych niezgodnych z rozkładem normalnym używano testów nieparametrycznych: test U Manna-Whitneya dla dwóch grup oraz test Kruskala-Wallisa dla porównań wielokrotnych. Po uzyskaniu różnic istotnych statystycznie w przypadku testu ANOVA lub Kruskala-Wallisa, wykonywano dodatkową analizę testem Dunna. Do oceny różnic danych sparowanych lub danych z wartością hipotetyczną zastosowano test t-Studenta dla jednej próby dla rozkładu normalnego lub test rang Wilcoxon dla rozkładów innych niż normalny. Uzyskaną istotność statystyczną przedstawiono na wykresach według odpowiedniego oznaczenia: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

4. Wyniki

4.1. Ocena poziomu ekspresji *NMU* w liniach komórkowych RJG

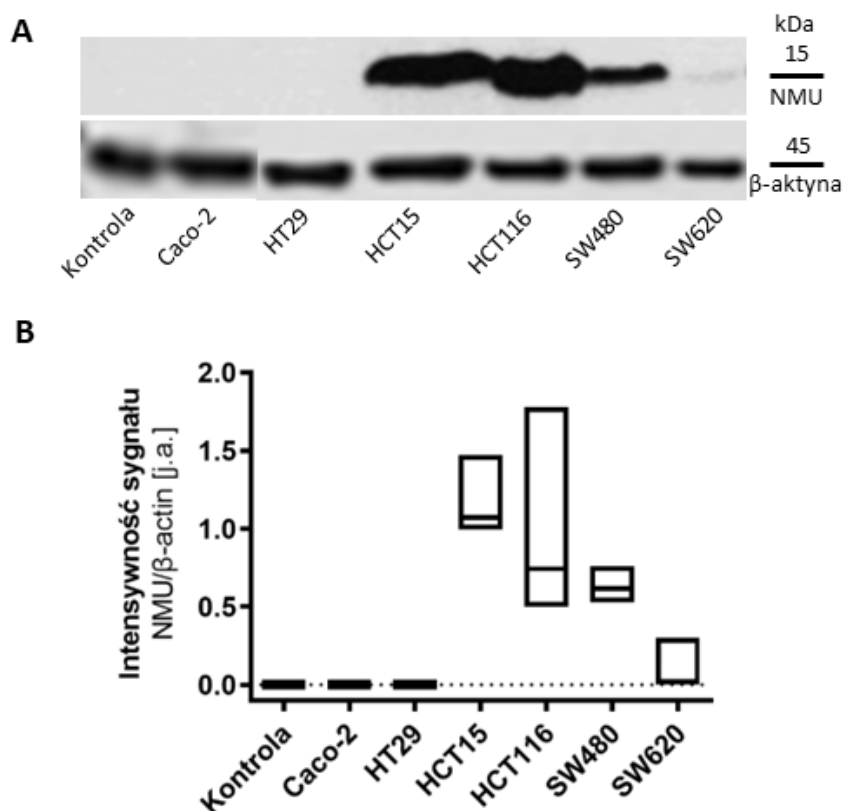
W celu określenia ekspresji *NMU* w linii nabłonka ludzkiego (linii kontrolnej; CCD 841 CoN) oraz 6 liniach RJG wyizolowano z nich mRNA, przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji, a następnie przeprowadzono łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) wykorzystując komercyjnie dostępne sondy TaqMan (Tabela 6). We wszystkich badanych liniach RJG zidentyfikowano ekspresję *NMU* (Ryc. 4). Otrzymane wyniki poziomu ekspresji *NMU* w komórkach RJG podzielono na dwie grupy względem mediany. Na tej podstawie wyodrębniono linie komórkowe z ekspresją *NMU* niższą od mediany ($2^{-\Delta Ct} < 0,000153$), czyli linie z niskim poziomem ekspresji *NMU*, do których należą komórki linii Caco-2, HT29 oraz SW620 oraz linie komórkowe z ekspresją *NMU* wyższą od mediany ($2^{-\Delta Ct} > 0,000153$) czyli linie charakteryzujące się wysokim poziomem mRNA kodującego *NMU*, w tym linie HCT15, HCT116 oraz SW480. W linii kontrolnej nie stwierdzono ekspresji *NMU*.



Rycina 4. Poziom ekspresji *NMU* w linii kontrolnej oraz w 6 liniach RJG. Linia przerywana wskazuje medianę poziomu ekspresji *NMU* we wszystkich badanych liniach RJG. Istotność statystyczną różnic poziomu ekspresji od zera oszacowano testem rang Wilcoxona. Wyniki przedstawiono jako medianę z przedziałem międzykwartylowym; (* $p \leq 0,05$; $n \geq 7$).

4.2. Ocena poziomu białka NMU w lizatach białkowych linii komórkowych RJG

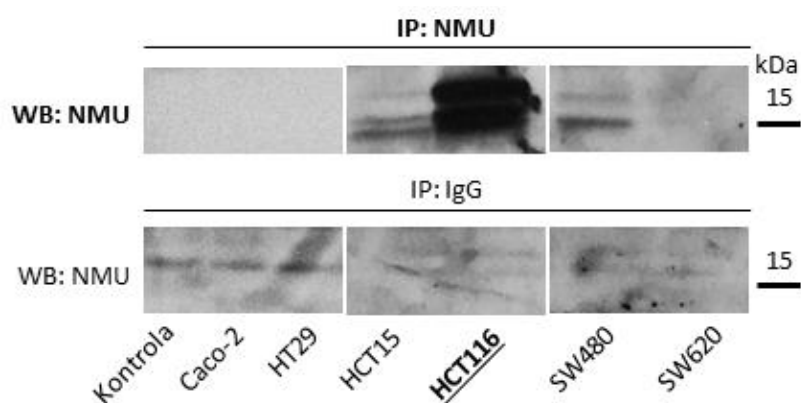
Obecność NMU w lizatach komórkowych przygotowanych z linii nabłonkowej oraz 6 linii RJG oceniono metodą Western immunoblotting. Do oceny poziomu białka NMU użyto króliczych przeciwciał anti-NMU firmy Genetex. Zastosowana metoda pozwoliła na wykrycie obecności NMU w 4 liniach komórkowych: HCT15, HCT116, SW480 oraz SW620 (Ryc. 5). W pozostałych liniach komórkowych, tj.: CCD 841 CoN, Caco-2 i HT29, nie zaobserwowano sygnału pochodzącego od NMU.



Rycina 5. Detekcja NMU w lizatach komórkowych linii kontrolnej oraz 6 linii RJG. (A) Reprezentatywny obraz poziomu NMU analizowany metodą Western immunoblotting. (B) Wynik analizy densytometrycznej intensywności sygnału. Wyniki intensywności prążków pochodzących od NMU znormalizowano względem kontroli nałożenia (β -aktyna). Wyniki przedstawiono w jednostkach arbitralnych (j.a.) jako medianę z przedziałem minimum-maksimum.

4.3. Identyfikacja białka NMU w medium pochodzącym z linii komórkowych RJG

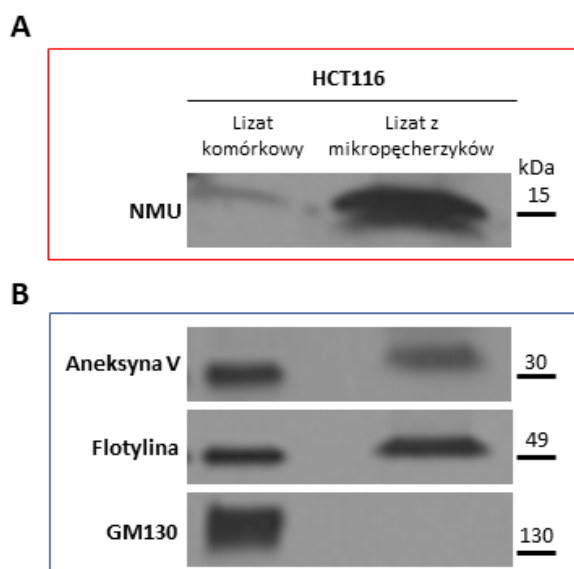
NMU jest małym białkiem wydzielanym z komórek. W celu potwierdzenia jego obecności w medium pochodzącym z linii nabłonkowej oraz 6 linii RJG przeprowadzono immunoprecypitację NMU przy użyciu króliczych przeciwciał anti-NMU firmy Abxexa. Zastosowana metoda pozwoliła na identyfikację NMU w medium pochodzącym z komórek o wysokiej ekspresji *NMU*, tj. HCT15, HCT116 oraz SW480. Najintensywniejszy sygnał pochodzący od NMU zaobserwowano w medium pochodzącym z linii komórkowej HCT116 (Ryc. 6). Produkt uzyskany na drodze immunoprecypitacji został poddany analizie spektrometrii mas, a otrzymane wyniki wykazały obecność peptydów pochodzących z dwóch form prekursorowych NMU, o długościach 174 i 158 aminokwasów. Analiza spektrometrii mas została wykonana komercyjnie w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.



Rycina 6. Reprezentatywny obraz poziomu NMU wydzielonego do medium pochodzącego przez linię kontrolną oraz 6 linii komórkowych RJG oznaczony metodą Western immunoblotting poprzedzoną immunoprecypitacją NMU.

4.4. Ocena poziomu białka NMU w mikropęcherzykach pochodzenia komórkowego izolowanych z medium pochodowlanego znad linii komórkowej HCT116

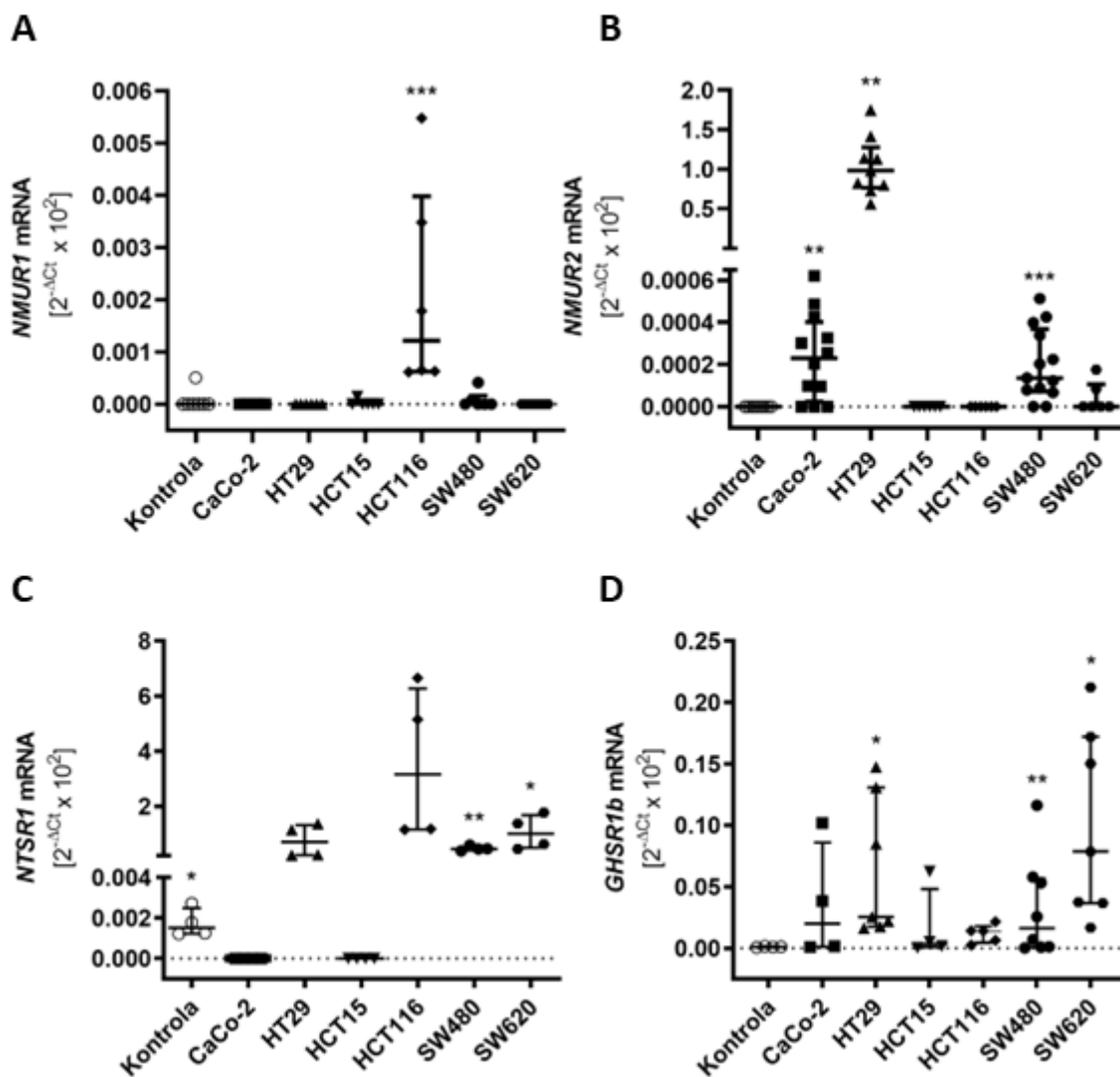
Z uwagi na ograniczoną wiedzę dotyczącą wydzielania NMU oraz istotne znaczenie mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych w przebiegu chorób nowotworowych, sprawdzono czy NMU może być wydzielane z komórek RJG jako zawartość mikropęcherzyków. Do badań wybrano linię komórkową HCT116, która charakteryzuje się największym poziomem NMU w lizatach komórkowych oraz w medium pochodowlanym. Do przygotowania medium pochodowlanego komórki hodowano w medium z dodatkiem surowicy pozbawionej egzosomów. Białko całkowite pochodzące z lizatu komórkowego, oraz z lizatu mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu i analizie metodą Western immunoblotting (Ryc. 7). Zastosowana metoda pozwoliła potwierdzić obecność NMU w mikropęcherzykach wydzielanych przez komórki linii HCT116. Kolejne analizy Western immunoblotting zostały wykonane w celu scharakteryzowania wyizolowanych mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Zastosowano w tym celu standardowo używane markery powierzchniowe błony komórkowej, flotylinę oraz aneksynę V, których obecność jest spodziewana w preparatach mikropęcherzykowych. Brak detekcji GM130 wykluczył obecność elementów aparatu Golgiego w uzyskanym preparacie pęcherzyków (Ryc. 7).



Rycina 7. Reprezentatywny obraz poziomu NMU (A) oraz białek markerowych (B) w mikropęcherzykach zewnątrzkomórkowych izolowanych z medium hodowlanego znad linii komórkowej HCT116 oznaczony metodą Western immunoblotting.

4.5. Ocena poziomu ekspresji receptorów dla NMU w liniach komórkowych RJG

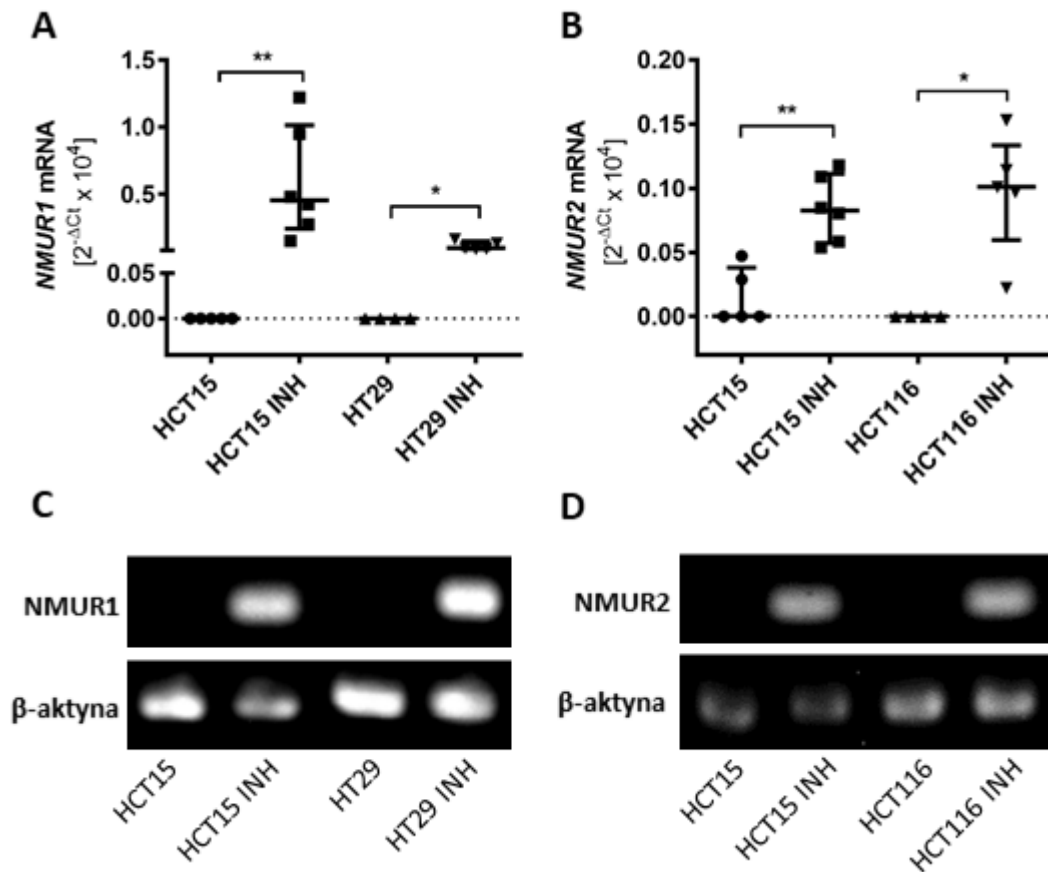
W celu weryfikacji, czy linia nabłonkowa oraz linie RJG mogą być aktywowane przez NMU wydzielane do medium hodowlanego, przeprowadzono analizę poziomu ekspresji genów dla głównych receptorów: *NMUR1*, *NMUR2* oraz dla podjednostek receptora alternatywnego: *NTSR1* i *GHSR1b*. W tym celu wykorzystano metodę qRT-PCR. Do przeprowadzenia reakcji w przypadku *NMUR1* oraz *NMUR2* wykorzystano komercyjnie dostępne sondy TaqMan (Tabela 6), natomiast w przypadku *NTSR1* oraz *GHSR1b* wykorzystano samodzielnie zaprojektowane startery (Tabela 6). Najwyższą i zarazem statystycznie różną od zera ekspresję *NMUR1* zaobserwowano w linii komórkowej HCT116 (Ryc. 8A). Ekspresję *NMUR2* statystycznie różną od zera potwierdzono w trzech liniach komórkowych: Caco-2, HT29 oraz SW480 (Ryc. 8B). W linii HCT15 nie zidentyfikowano ekspresji żadnego z receptorów. Ekspresję podjednostek alternatywnego receptora istotnie statystycznie różną od zera zarejestrowano w przypadku linii komórkowych CCD 841 CoN, SW480 i SW620 dla receptora *NTSR1* (Ryc. 8C) oraz HT29, SW480 i SW620 dla *GHSR1b* (Ryc. 9D). W przypadku pozostałych linii nie zaobserwowano zmian różnych od zera istotnych statystycznie. Na podstawie poniższych danych można stwierdzić, że jedynie w przypadku linii SW480 oraz SW620 udało się potwierdzić ekspresję obu genów, *NTSR1* oraz *GHSR1b*. Te linie mogą tworzyć dimer NTSR1/GHSR1b.



Rycina 8. Poziom ekspresji *NMUR1* (A), *NMUR2* (B), *NTSR1* (C) oraz *GHSR1b* (D) w linii kontrolnej oraz w 6 liniach RJG. Istotność statystyczną różnic poziomu ekspresji receptorów od zera oszacowano testem t-Studenta dla jednej próby lub testem Wilcozona w zależności od rozkładu danych. Wyniki przedstawiono jako medianę z przedziałem międzykwartylowym; (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; (A) $n = 6$, (B) $n \geq 6$, (C) $n = 4$, (D) $n \geq 4$).

4.6. Analiza poziomu mRNA kodujących NMUR1 oraz NMUR2 w liniach komórkowych RJG poddanych działaniu inhibitora metylacji DNA

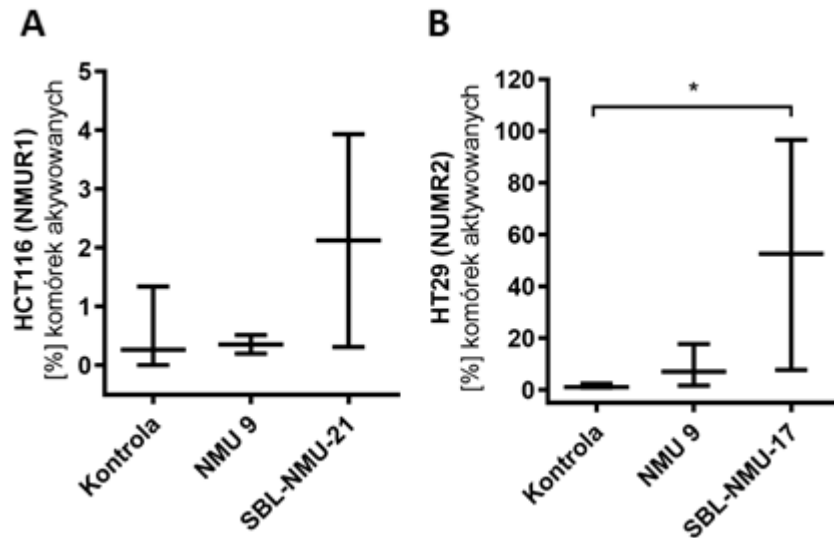
Komórki RJG wykazały znaczne różnice w ekspresji receptorów NMU. Brak danych na temat regulacji ekspresji *NMUR1* i *NMUR2* zainspirował analizę tej regulacji w badanych komórkach. Jednym z procesów regulujących ekspresję genów jest metylacja regionu promotorowego. Aby sprawdzić, czy różnice w ekspresji *NMUR1* oraz *NMUR2* w poszczególnych liniach komórkowych są wynikiem metylacji ich promotorów, przeprowadzono eksperyment z użyciem inhibitora metylacji (5-Aza-CdR), a następnie oceniono poziom mRNA dla obu receptorów metodą qRT-PCR (Ryc. 9A-B). Do eksperymentu wybrano linię HCT15, w której nie zaobserwowano ekspresji mRNA kodującego NMUR1 lub NMUR2 oraz 2 linie komórkowe: HCT116 charakteryzującą się największą ekspresją *NMUR1* i brakiem ekspresji *NMUR2* oraz HT29 charakteryzującą się największą ekspresją *NMUR2* i brakiem ekspresji *NMUR1*. We wszystkich liniach komórkowych inkubowanych z inhibitorem metylacji DNA zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji *NMUR1* oraz *NMUR2* w porównaniu do komórek kontrolnych, co świadczy o tym, że proces metylacji reguluje ekspresję obu receptorów. Produkty qRT-PCR zwizualizowano na Rycinie 9 C-D.



Rycina 9. Poziom ekspresji *NMUR1* (A) oraz *NMUR2* (B) po zastosowaniu inhibitora metylacji DNA (5-Aza-Cdr). Istotność statystyczną różnic poziomu ekspresji pomiędzy linią nietraktowaną oraz traktowaną oszacowano testem Manna-Whitneya. Wyniki przedstawiono jako medianę z przedziałem międzykwartylowym; (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; $n \geq 4$). (C, D) Reprezentatywny wynik rozdziału produktów w żelu agarozowym.

4.7. Wpływ NMU na aktywację receptorów NMUR1 oraz NMUR2 i uruchomienie ścieżek sygnałowych - mobilizacja wapnia wewnątrzkomórkowego

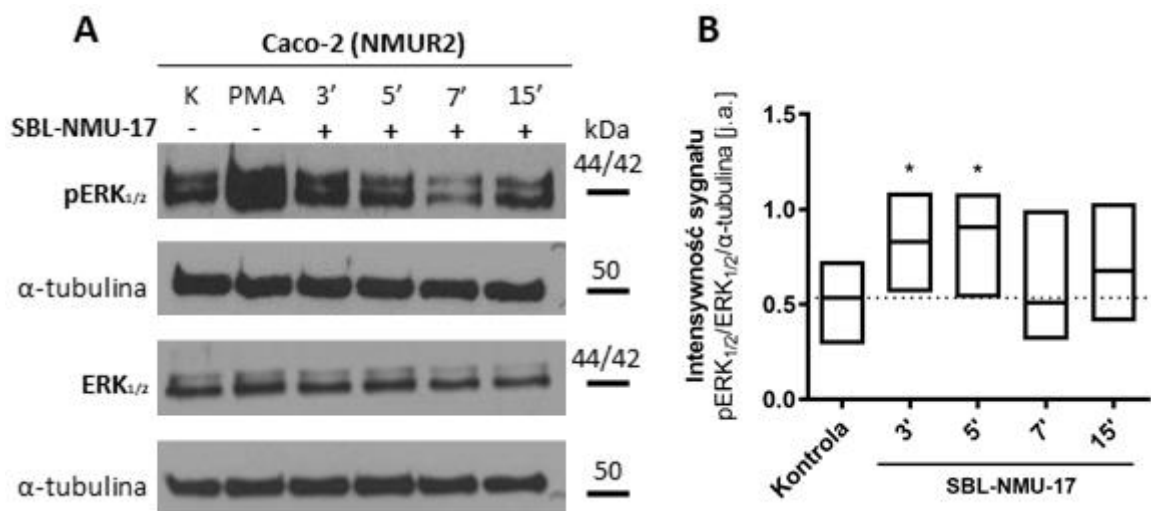
Jedną ze ścieżek sygnałowych uruchamianych w komórkach na skutek wiązania liganda do receptorów sprzężonych z białkami G jest ścieżka prowadząca do mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego. Przeprowadzone analizy wskazują, że wszystkie badane linie komórkowe RJG z wyjątkiem HCT15 wykazują ekspresję jednego z receptorów dla NMU. W celu sprawdzenia czy NMU wpływa na aktywację tego szlaku wybrano komórki HCT116 oraz HT29, które charakteryzowały się wysoką ekspresją odpowiednio *NMUR1* lub *NMUR2*. Linie wyznakowane sondą fluorescencyjną traktowano syntetycznym peptydem NMU-9 lub agonistą receptora NMUR1 – SBL-NMU-21 lub agonistą receptora NMUR2 – SBL-NMU-17. Wprowadzenie agonistów receptorów okazało się konieczne, z uwagi na trudności w detekcji zmian poziomu jonów Ca^{2+} w liniach, traktowanych NMU-9. Wybrani agoniści zostali scharakteryzowani pod względem stabilności oraz powinowactwa do receptorów dla NMU (De Prins i wsp. 2018). Zmiany w intensywności fluorescencji utrwalone w ciągu 60 sekund od dodania peptydu były proporcjonalne do rosnącego stężenia wapnia w cytozolu w wyniku jego wewnątrzkomórkowej mobilizacji. Reprezentatywne filmy zarejestrowane podczas eksperymentu zostały umieszczone w repozytorium: Przygodzka, Patrycja, 2021, "Calcium mobilisation upon NMURs activation in CRC cells", <https://doi.org/10.18150/XXYTZD>, RepOD, V1. Analiza zebranych danych pozwoliła zaobserwować zmiany w poziomie fluorescencji w przypadku obu linii komórkowych traktowanych agonistą, ale nie NMU-9. Sygnał zarejestrowany dla komórek linii HCT116 okazał się niewystarczający aby wykazać istotne statystycznie zmiany (Ryc. 10A).



Rycina 10. Mobilizacja jonów Ca^{2+} w wyniku aktywacji receptorów NMU. Wykresy przedstawiają procent komórek linii (A) HCT116 oraz (B) HT29 aktywowanych NMU-9, SBL-NMU-21 lub SBL-NMU-17. Istotność statystyczną różnic względem linii kontrolnej oszacowano testem Kruskala-Wallisa. Wyniki przedstawiono jako medianę z przedziałem międzykwartylowym (* $p \leq 0,05$; $n = 5$).

4.8. Wpływ NMU na aktywację receptora NMUR2 i uruchomienie ścieżek sygnałowych – aktywacja kinaz białkowych ERK_{1/2}

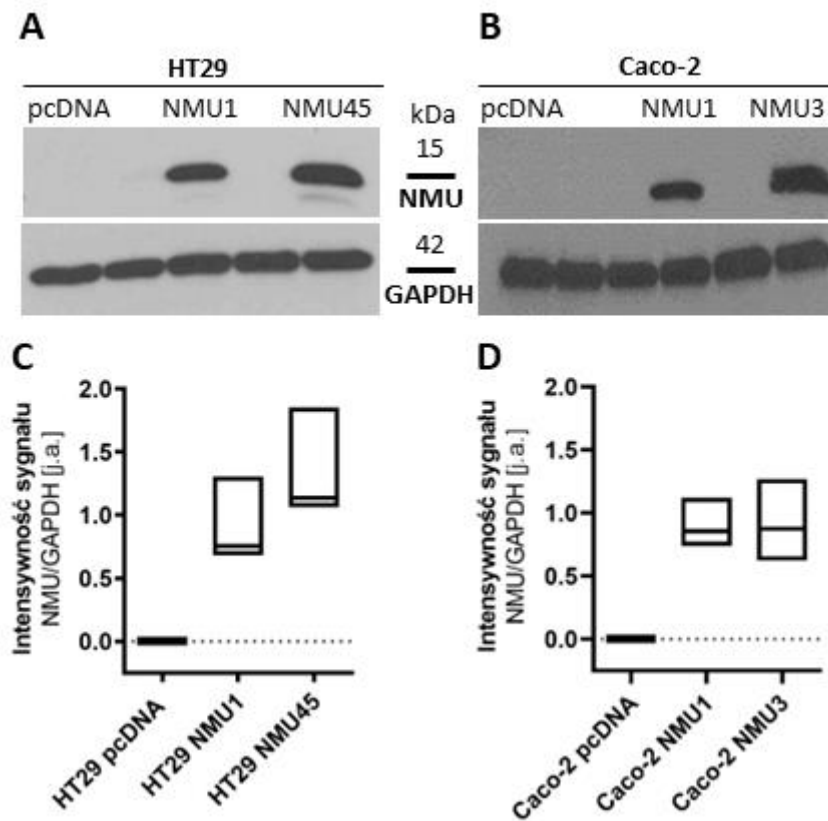
Do oceny aktywacji kinaz białkowych ERK_{1/2} wybrano komórki linii Caco-2, które jako jedyne z wybranego panelu linii RJG charakteryzują się brakiem mutacji w genach *BRAF* lub *KRAS*. Obecność mutacji we wspomnianych genach jest przyczyną stałej aktywacji kinaz białkowych ERK_{1/2} co mogłoby uniemożliwić detekcję dodatkowej aktywacji tej ścieżki przez NMU. Komórki Caco-2 poddano działaniu agonisty receptora NMUR2 – SBL-NMU-17, a następnie przeprowadzono analizę białek metodą Western immunoblotting z przeciwciałami anti-pERK_{1/2} oraz anti-ERK_{1/2}. Zastosowana metoda pozwoliła zarejestrować fosforylację kinaz białkowych ERK_{1/2} po 3 oraz 5 minutach od potraktowania komórek agonistą NMUR2 (Ryc. 11).



Rycina 11. Aktywacja szlaku kinaz białkowych ERK_{1/2} w linii komórkowej Caco-2 traktowanej agonistą receptora NMUR2 (SBL-NMU-17). (A) Reprezentatywny obraz zmian w poziomie kinaz białkowych pERK_{1/2} analizowany metodą Western immunoblotting. (B) Wynik analizy densytometrycznej intensywności sygnału. Linia przerywana wyznacza medianę sygnału pochodzącego od kontroli (mediana = 0,53). Wyniki intensywności prążków pochodzących od pERK_{1/2} przeliczono względem kontroli nałożenia białka (α-tubuliny) oraz formy ERK_{1/2}. Istotność statystyczną różnic względem mediany kontroli oszacowano testem t-Studenta z poprawką Bonferroniego dla porównań wielokrotnych. Wyniki przedstawiono w jednostkach arbitralnych (j.a.) jako medianę z przedziałem minimum-maksimum; (*p ≤ 0,05; n = 5).

4.9. Charakterystyka sublinii - ocena poziomu białka NMU w lizatach komórkowych sublinii HT29 oraz Caco-2 z nadekspresją NMU

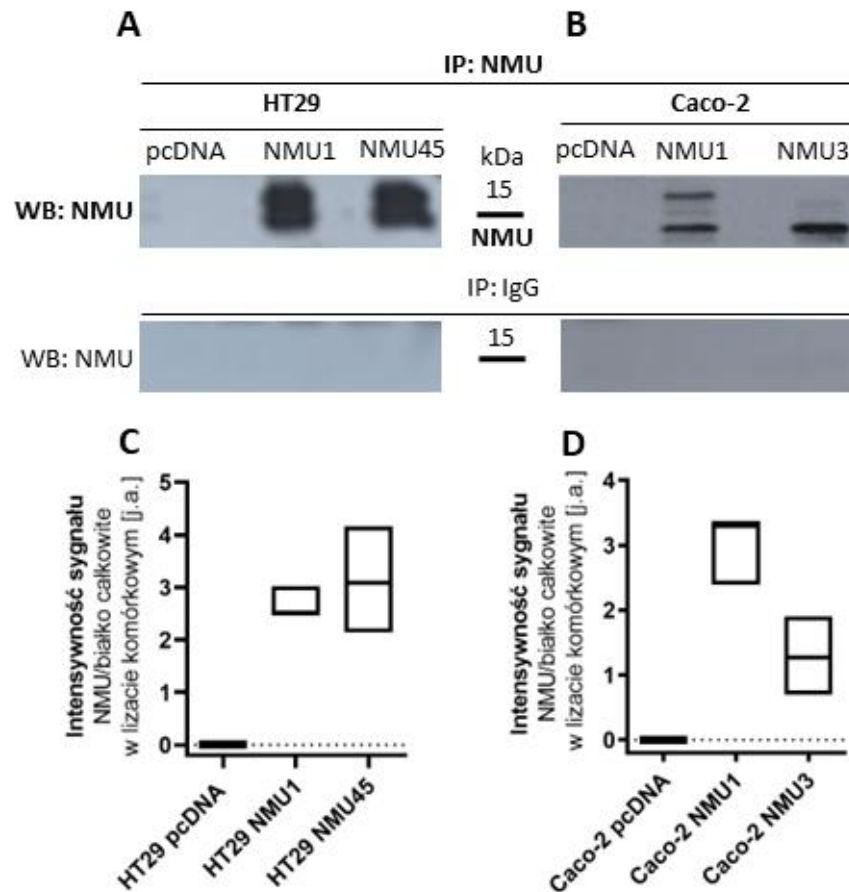
Przedstawione wyżej wyniki wskazują na możliwość autokrynnego oddziaływania NMU wydzielonego przez komórki RJG poprzez aktywację receptora NMUR2. W celu zbadania efektów fenotypowych wywołanych działaniem NMU przygotowano model badawczy w postaci sublinii RJG ze stabilną nadekspresją NMU. Na podstawie analizy poziomu ekspresji NMU, NMUR1, NMUR2 oraz obecności NMU w lizatach komórkowych i medium pochodzonym, do przygotowania sublinii wybrano linie komórkowe HT29 oraz Caco-2. Obie linie charakteryzują się niską ekspresją NMU oraz oekspresją NMUR2. Komórki zostały poddane transfekcji wektorem pcDNA 3.1/Hygro (+) zawierającym sekwencję kodującą NMU lub kontrolnym wektorem pcDNA 3.1/Hygro (+). Spośród wszystkich uzyskanych klonów, do dalszych badań wybrano dwie sublinie HT29 (HT29 NMU1, HT29 NMU45) oraz dwie sublinie Caco-2 (Caco-2 NMU-1, Caco-2 NMU3). W wyniku analizy Western immunoblotting w subliniach z nadekspresją NMU stwierdzono istotny wzrost obecności NMU w przypadku HT29 NMU1, HT29 NMU45, Caco-2 NMU1 oraz Caco-2 NMU3 w porównaniu do linii kontrolnych (HT29 pcDNA lub Caco-2 pcDNA) (Ryc. 12).



Rycina 12. Obecność białka NMU w subliniach HT29 oraz Caco-2. (A-B) Reprezentatywny obraz poziomu NMU analizowany metodą Western immunoblotting. (C-D). Wynik analizy densytometrycznej intensywności sygnału. Intensywność sygnału pochodzącego od NMU znormalizowano względem kontroli nałożenia białka (GAPDH). Wyniki przedstawiono w jednostkach arbitralnych (j.a.) jako medianę z przedziałem minimum-maksimum.

4.10. Charakterystyka sublinii - ocena poziomu białka NMU w medium pochodzącym z kultur sublinii HT29 oraz Caco-2 z nadekspresją NMU

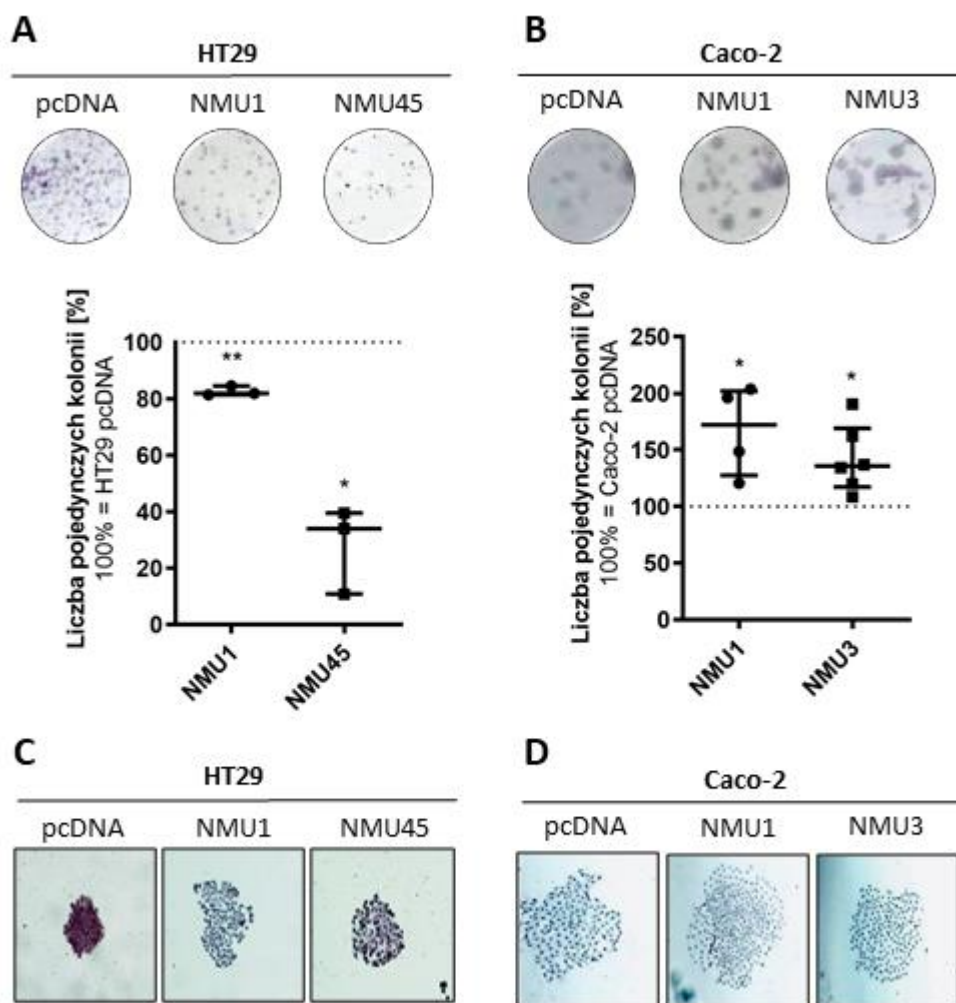
W kolejnym etapie medium pochodzące z kultur sublinii HT29 oraz Caco-2 z nadekspresją NMU poddano immunoprecypitacji w celu scharakteryzowania poziomu wydzielanego białka. Uzyskane wyniki po analizie Western immunoblotting, pozwoliły stwierdzić, że klony HT29 NMU1, HT29 NMU45 oraz Caco-2 NMU1, Caco-2 NMU3 wydzielają NMU do medium pochodzącego (Rycina 13 A-B).



Rycina 13. Detekcja białka NMU w medium pochodzącym z kultur sublinii HT29 oraz Caco-2. (A-B) Reprezentatywny obraz poziomu NMU analizowany metodą Western immunoblotting. (C-D) Wyniki przedstawiono w jednostkach arbitralnych (j.a.) jako medianę z przedziałem minimum-maksimum.

4.11. Analiza zdolności sublinii HT29 oraz Caco-2 z nadekspresją *NMU* do formowania kolonii

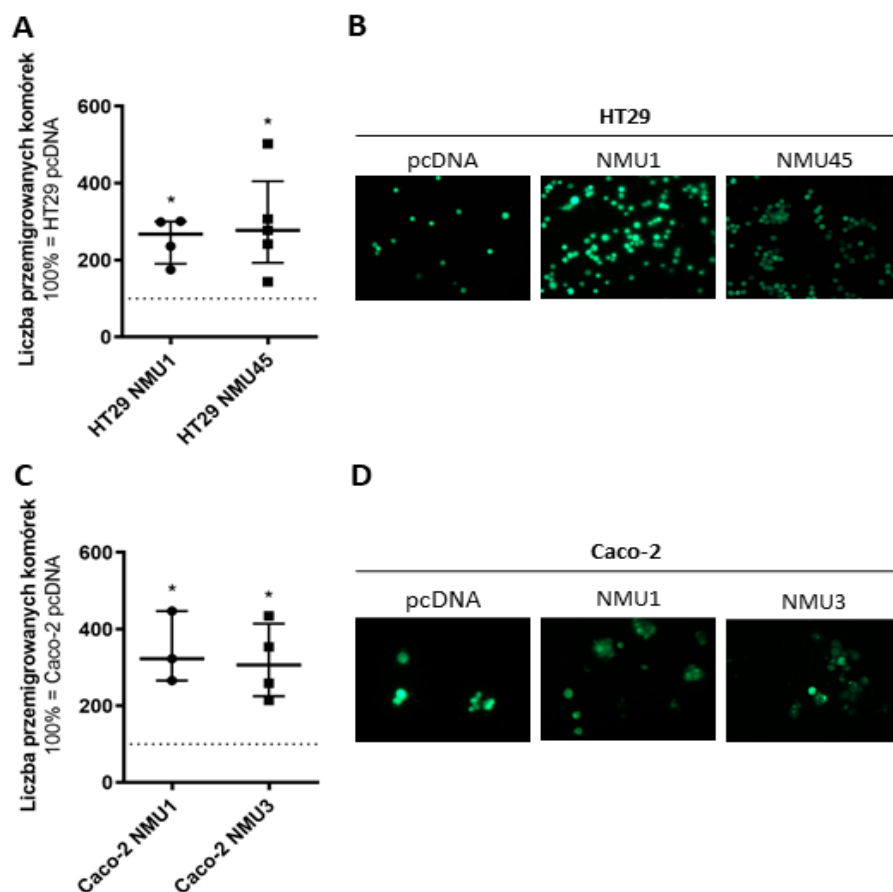
W kolejnych etapach badań prowadzono testy funkcjonalne, które pozwoliły ocenić autokryny wpływ wydzielanego *NMU* na fenotyp sublinii HT29 i Caco-2 oraz generowanie sygnałów wewnątrzkomórkowych zależnych od receptora *NMUR2*. W pierwszej kolejności przeprowadzono test formowania kolonii, który może świadczyć również o potencjale proliferacyjnym komórek. Wykonane zdjęcia posłużyły do oceny morfologii oraz zdolności do formowania kolonii z pojedynczej komórki. Kolonie zbudowane z powyżej 50 komórek, zostały zliczone, a analiza danych pozwoliła stwierdzić, że HT29 *NMU1* oraz HT29 *NMU45* nie tworzą tak licznych kolonii jak HT29 *pcDNA* (Ryc. 14A). Natomiast Caco-2 *NMU1* oraz Caco-2 *NMU3* mają większe zdolności do tworzenia kolonii w porównaniu do Caco-2 *pcDNA* (Ryc. 14B). Dodatkowo na wykonanych zdjęciach można zaobserwować różnice w morfologii kolonii sublinii HT29 z nadekspresją *NMU*, które są bardziej rozproszone, a pojedyncze komórki lepiej widoczne w porównaniu do HT29 *pcDNA* (Ryc. 14C). W przypadku sublinii Caco-2 nie zaobserwowano podobnych zmian morfologicznych (Ryc. 14D). Każda z zastosowanych linii inaczej reaguje na podwyższenie ekspresji *NMU*.



Rycina 14. Zdolność do formowania kolonii przez sublinie HT29 (A) oraz Caco-2 (B). Istotność statystyczną różnic pomiędzy subliniami a kontrolą oszacowano testem t-Studenta dla jednej próby. Wyniki przedstawiono jako medianę z przedziałem międzykwartylowym; (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; $n \geq 3$). (C-D) Morfologia kolonii utworzonych przez komórki sublinii z nadekspresją *NMU*.

4.12. Analiza zdolności migracyjnych sublinii HT29 oraz Caco-2 z nadekspresją *NMU*

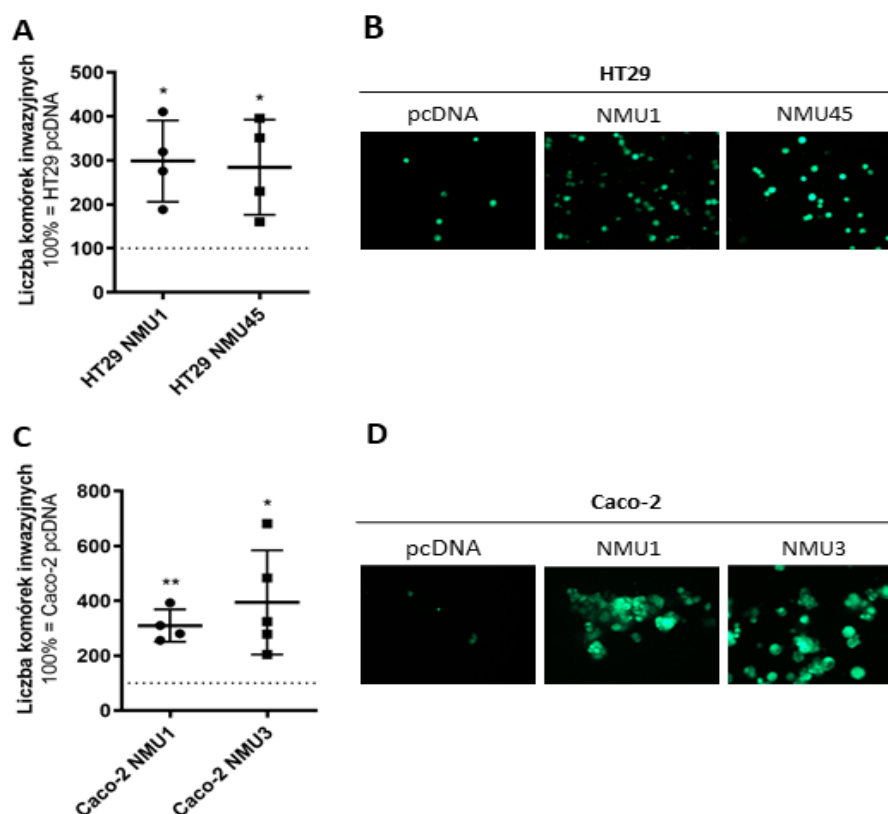
Aby ocenić wpływ nadprodukcji *NMU* na właściwości migracyjne komórek, sublinie HT29 oraz Caco-2 były analizowane w teście migracji przez filtry poliwęglanowe (średnica porów 8µm). Sublinie HT29 oraz Caco-2 wyznakowano komercyjnie dostępnym barwnikiem fluorescencyjnym – Cell Tracker. Tak wyznakowane komórki naniesiono na filtr i poddano inkubacji przez 3 godziny w gradiencie stężeń FBS. Pojedyncze komórki po przejściu przez filtr zostały policzone pod mikroskopem przez dwóch niezależnych obserwatorów. Zarówno w przypadku sublinii HT29, jak i Caco-2 liczba migrujących komórek z nadekspresją *NMU* była istotnie wyższa w porównaniu do liczby migrujących komórek kontrolnych (Ryc. 15).



Rycina 15. Zdolności migracyjne komórek sublinii HT29 (A) oraz Caco-2 (C). Wykresy przedstawiają procent migrujących komórek. Istotność statystyczną różnicy zdolności migracyjnych pomiędzy subliniami a kontrolą oszacowano testem t-Studenta dla jednej próby. Wyniki przedstawiono jako medianę z przedziałem międzykwartylowym; (* $p \leq 0,05$; $n \geq 3$). (B, D) Reprezentatywne zdjęcia wykonane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse TE 2000-U (powiększenie 100x).

4.13. Analiza zdolności inwazyjnych sublinii HT29 oraz Caco-2 z nadekspresją *NMU*

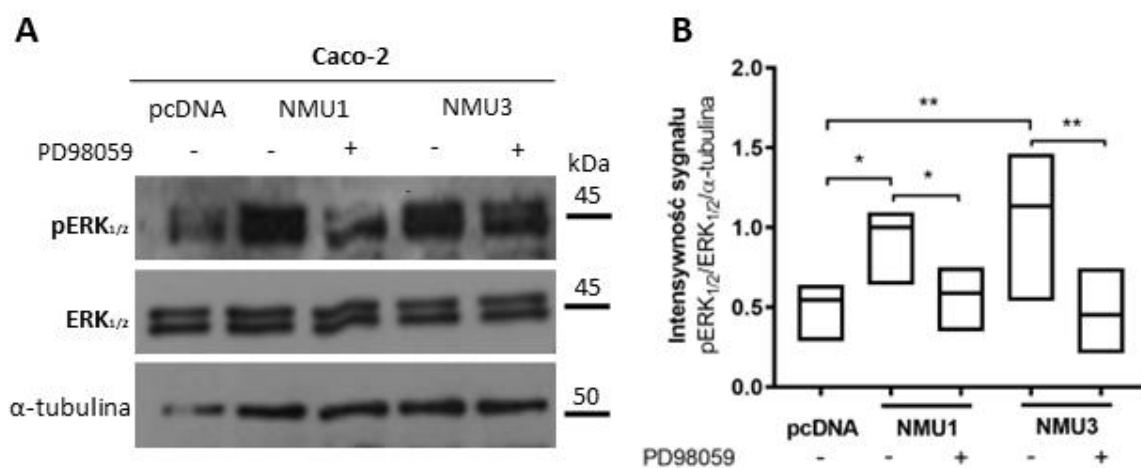
Analogicznie jak w przypadku migracji, sublinie HT29 oraz Caco-2 z nadekspresją *NMU* zostały poddane testowi pozwalającemu ocenić zdolności inwazyjne wybranych sublinii. W tym celu filtry poliwęglanowe o średnicy porów $8\mu\text{m}$ zostały wcześniej pokryte Matrigel'em, komercyjną mieszaniną imitującą skład i strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej. Komórki zostały naniesione na filtr. Inkubacja komórek prowadzona była 6 godzin w gradiencie stężeń FBS. Wykonane zdjęcia komórek, które przemigrowały przez filtr pokryty Matrigel'em oraz ich analiza, pozwoliły stwierdzić, że zarówno sublinie HT29, jak i Caco-2 z nadekspresją *NMU* migrują efektywniej przez Matrigel w porównaniu do linii kontrolnych, HT29 pcDNA oraz Caco-2 pcDNA (Ryc. 16).



Rycina 16. Zdolności inwazyjne komórek sublinii HT29 (A) oraz Caco-2 (C). Wykresy przedstawiają procent migrujących komórek. Istotność statystyczną różnicy zdolności inwazyjnych pomiędzy subliniami a kontrolą oszacowano testem t-Studenta dla jednej próby. Wyniki przedstawiono jako medianę z przedziałem międzykwartylowym; (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; $n \geq 4$). (B, D) Reprezentatywne zdjęcia wykonane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse TE 2000-U (powiększenie 100x).

4.14. Ocena wpływu inhibitora PD98059 na aktywację ścieżki sygnałowej kinaz białkowych ERK_{1/2} w komórkach sublinii Caco-2

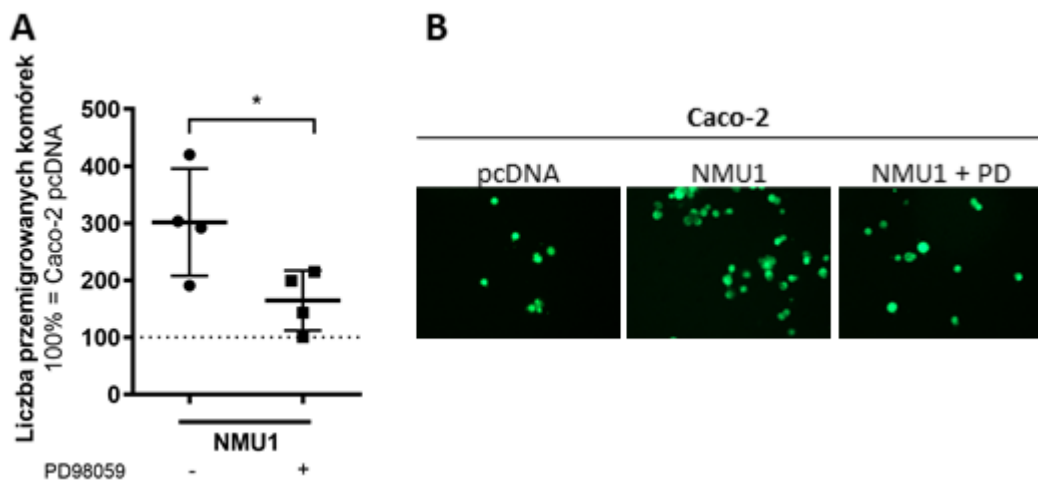
W przedstawionych w części 4.8 badaniach zidentyfikowano zwiększoną fosforylację kinaz ERK_{1/2} w komórkach Caco-2 pod wpływem inkubacji z agonistą NMUR2 (SBL-NMU-17). W celu potwierdzenia uzyskanych powyżej wyników aktywacja fosforylacji kinaz ERK_{1/2} została zbadana przy użyciu sublinii Caco-2 z nadekspresją *NMU*. Lizaty komórkowe sublinii Caco-2 poddano analizie Western immunoblotting. Otrzymane wyniki potwierdzają obserwacje zarejestrowane w przypadku linii Caco-2. W subliniach z nadekspresją *NMU*, poziom fosforylacji kinaz ERK_{1/2} jest wyższy niż w subliniach kontrolnych. Aby dodatkowo zweryfikować tą obserwację sublinie Caco-2 poddano działaniu PD98059, inhibitora szlaku MAPK, którego końcowym etapem jest fosforylacja kinaz ERK_{1/2}. Zgodnie z postawioną hipotezą zaobserwowałam redukcję w poziomie kinaz pERK_{1/2} w porównaniu z komórkami nietraktowanymi (Ryc. 17).



Rycina 17. Aktywacja szlaku kinaz białkowych ERK_{1/2} w subliniach Caco-2 traktowanych inhibitorem PD98059. (A) Reprezentatywny obraz zmian w poziomie kinaz białkowych pERK_{1/2} analizowanych metodą Western immunoblotting (B). Wynik analizy densytometrycznej intensywności sygnału. Intensywność sygnału pochodzącego od pERK_{1/2} przeliczono względem kontroli nałożenia białka (α-tubuliny) oraz formy ERK_{1/2}. Istotność statystyczną różnicy sygnału pomiędzy kontrolą a subliniami lub komórkami traktowanymi a nie traktowanymi PD98059 oszacowano jednoczynnikową analizą wariancji (ANOVA) oraz testem post hoc. Wyniki przedstawiono w jednostkach arbitralnych (j.a.) jako medianę z przedziałem minimum-maksimum; (* p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01; n ≥ 4).

4.15. Ocena wpływu inhibitora PD98059 na zdolności migracyjne komórek sublinii Caco-2

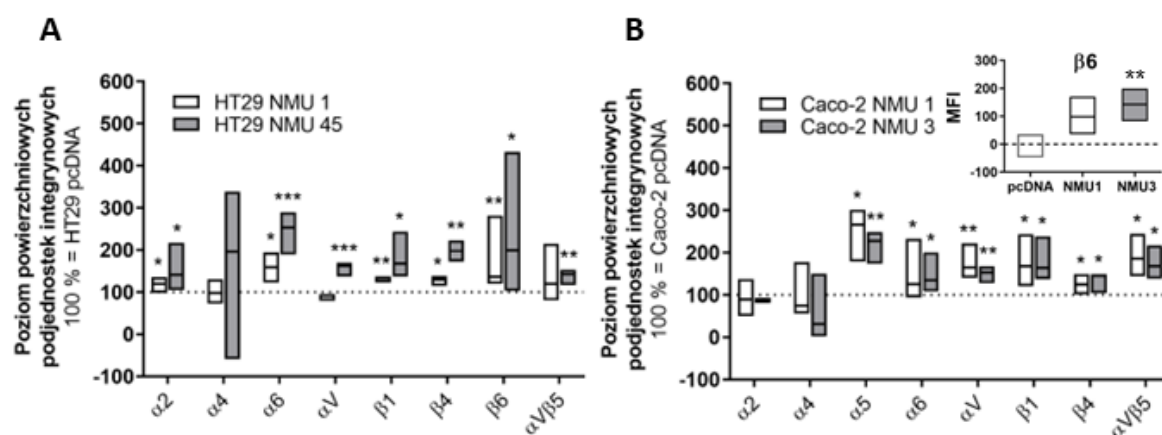
Aby sprawdzić, czy zahamowanie ścieżki sygnałowej MAPK może zredukować zwiększoną migrację spowodowaną działaniem NMU, komórki Caco-2 NMU1 poddano działaniu inhibitora PD98059, a następnie oceniono ich potencjał migracyjny w teście migracji przez filtry poliwęglanowe o średnicy porów $8\mu\text{m}$ zgodnie z procedurą opisaną w części 4.12. Analiza uzyskanych wyników pokazuje, że procent migrujących komórek Caco-2 NMU1 traktowanych PD98059 obniżył się w porównaniu do komórek nietraktowanych tym związkiem (Ryc. 18).



Rycina 18. Wpływ inhibitora PD98059 na zdolności migracyjne komórek sublinii Caco-2 (A). Wykres przedstawia procent migrujących komórek. Istotność statystyczną różnicy zdolności migracyjnej pomiędzy subliniami a kontrolą oszacowano testem t-Studenta. Wyniki przedstawiono jako medianę z przedziałem międzykwartylowym; (* $p \leq 0,05$; $n=4$). (B) Reprezentatywne zdjęcia wykonane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse TE 2000-U (powiększenie 100x).

4.16. Analiza obecności powierzchniowych podjednostek integrynowych zaangażowanych w proces migracji w subliniach HT29 oraz Caco-2 z nadekspresją *NMU*

Udowodniono, że zwiększenie poziomu *NMU* wydzielanego do środowiska prowadzi do zwiększenia zdolności migracyjnych oraz inwazyjnych tych komórek. Wiadomo, że takim zmianom w fenotypie komórek często towarzyszą zmiany w ekspresji powierzchniowych podjednostek integrynowych. W celu potwierdzenia powyższych informacji, komórki sublinii HT29 oraz Caco-2 z nadekspresją *NMU* przeanalizowano pod względem zmian w obecności na ich powierzchni wybranych podjednostek integrynowych: $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, αV , $\beta 1$, $\beta 4$, $\beta 6$, czy $\alpha V\beta 5$ (stosowane przeciwciała zostały zebrane w Tabeli 11) za pomocą cytometrii przepływowej. W przypadku większości analizowanych podjednostek integrynowych, zaobserwowano wzrost ich poziomu w obu subliniach z nadekspresją *NMU*. Wzrostu ekspresji αV oraz $\alpha V\beta 5$ nie zarejestrowano tylko w przypadku jednej sublinii HT29 (*NMU1*), a podjednostki $\beta 6$ tylko w przypadku jednej sublinii Caco-2 (*NMU1*). Zmiany tylko w jednym z przygotowanych klonów są prawdopodobnie spowodowane różnym poziomem wydzielania *NMU* do środowiska przez te komórki. W przypadku podjednostki $\alpha 4$, nie odnotowano statystycznie istotnych zmian pod wpływem nadekspresji *NMU* (Ryc. 19).



Rycina 19. Ocena poziomu powierzchniowych podjednostek integrynowych w subliniach HT29 (A) oraz Caco-2 (B). Istotność statystyczną różnic poziomu ekspresji pomiędzy subliniami a linią kontrolną oszacowano testem t-Studenta dla jednej próby lub testem Wilcozona w zależności od rozkładu danych. Insert (B) przedstawia intensywność fluorescencji dla podjednostki $\beta 6$, której detekcji nie wykazano w komórkach kontrolnych Caco-2 pcDNA. Wyniki przedstawiono w jednostkach MFI (ang. *median fluorescence intensity*), jako medianę z przedziałem minimum-maksimum; (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; $n \geq 3$).

5. Dyskusja

Wczesna diagnostyka oraz efektywne leczenie chorób nowotworowych w tym RJG, to jeden z głównych tematów badań prowadzonych na świecie w ostatnich latach. Sprzyja temu gwałtowny rozwój technik eksperymentalnych i bioinformatycznych. Stosowanie nowoczesnych narzędzi pozwala na pozyskiwanie precyzyjnych informacji o specyficznych mechanizmach związanych z progresją konkretnego nowotworu. Warto podkreślić, że nowotwory jelita grubego zajmują nadal czołowe miejsce pod względem zachorowalności, a także śmiertelności, dlatego istotne jest poszukiwanie nowych metod diagnostycznych identyfikujących RJG we wczesnych, przedinwazyjnych stadiach rozwoju. Pierwsze objawy występujące u pacjentów z RJG często przypominają inne, choroby takie jak: alergia, zatrucie pokarmowe lub hemoroidy. Brak specyficznych objawów, powoduje że są one powszechnie ignorowane, co prowadzi do późnego wykrycia choroby nowotworowej. Obecne metody diagnostyczne RJG opierają się głównie na kolonoskopii, będącej nadal złotym standardem diagnostycznym, a także dostępnych testach przesiewowych takich jak FOBT, czy FIT, które zostały opisane szerzej w rozdziale 1.6. Należy podkreślić, że nie są one wystarczające, ponieważ pozwalają głównie na wykrycie zaawansowanych, inwazyjnych, stadiów RJG, gdzie często już zaobserwowano przerzuty do pobliskich tkanek lub/i odległych organów. Brak skutecznej diagnostyki umożliwiającej wykrycie RJG we wczesnych stadiach choroby skutkuje najczęściej nieefektywnym leczeniem. Pomimo licznych doniesień opisujących nowe i bardziej skuteczne schematy terapeutyczne obejmujące zastosowanie m.in.: przeciwciał monoklonalnych, inhibitorów kinaz tyrozynowych, inhibitorów punktów kontrolnych, czy szczepionek przeciwnowotworowych, nadal najbardziej istotne wydaje się poszukiwanie markerów, które umożliwiłyby wczesną diagnozę RJG, a tym samym zwiększyły szanse na pozytywne wyniki leczenia. Najbardziej pożądanymi markerami wydają się być te, których zmiany w ekspresji wskazują na wczesne etapy zmiany fenotypu komórek RJG na bardziej migracyjny i/lub inwazyjny.

W 2016 roku, małe białko wydzielnicze, NMU, zostało po raz pierwszy zaproponowane jako potencjalny czynnik związany z nabywaniem fenotypu inwazyjnego przez komórki RJG. Analiza transkryptomyczna komórek HT29 z nadekspresją *SNAIL* pozwoliła zidentyfikować zmiany w ekspresji 334 genów, spośród, których *NMU* wykazywała drugi najwyższy poziom zmian w ekspresji (Przygodzka i wsp. 2016).

Rola NMU w przebiegu i rozwoju RJG nie została dotychczas zbadana. Dlatego w niniejszej pracy doktorskiej postanowiłam przeanalizować ekspresję NMU

i jej receptorów oraz ich znaczenie w procesach takich jak, migracja, czy inwazyjność, będących integralną częścią zmiany fenotypu komórek RJG na bardziej złośliwy.

Od momentu odkrycia NMU, najwięcej informacji zgromadzono na temat roli tego małego białka wydzielniczego w procesach fizjologicznych. W przypadku chorób nowotworowych najwięcej doniesień dotyczy identyfikacji zmian w ekspresji *NMU*, które związane były z procesem progresji wielu typów nowotworów. Jednocześnie nadal wiele aspektów dotyczących np.: regulacji ekspresji *NMU*, produkcji, wydzielania, oraz funkcji NMU, oraz jej oddziaływania z elementami mikrośrodowiska nowotworu pozostaje niewyjaśnionych.

Pierwsza praca dotycząca zmian ekspresji *NMU* w trakcie progresji nowotworowej dotyczyła raka jamy ustnej. Tkanki izolowane od pacjentów analizowano pod względem globalnej zmiany ekspresji genów. Ekspresja *NMU* była istotnie obniżona w tkankach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem w porównaniu do tkanek kontrolnych, tym samym po raz pierwszy zasugerowano, że NMU w chorobach nowotworowych może pełnić rolę białka supresorowego (Alevizos i wsp. 2001). Do podobnych wniosków doprowadziły wyniki badań płaskonabłonkowego raka przełyku oraz raka szyi i głowy, gdzie potwierdzono, że region promotorowy *NMU* w tkankach od pacjentów może ulegać metylacji, co obniża poziom białka (Yamashita i wsp. 2002, Tokumaru i wsp. 2004). W przypadku raka szyi i głowy analiza tkanek od pacjentów, wykonana przez innych badaczy, nie potwierdziła tych obserwacji, ponieważ ekspresja *NMU* w tkance guza była podwyższona w porównaniu do tkanek kontrolnych (Wang i wsp. 2018). W kolejnych latach przeanalizowano tkanki pochodzące od pacjentów z nowotworami jajnika, nerki, piersi, endometrium, pęcherza, płuc oraz trzustki, i wykazano, że ekspresja *NMU* była podwyższona u pacjentów z nowotworem w porównaniu do tkanek zdrowych (kontrolnych) oraz często skorelowana z obniżonym czasem przeżycia. Dodatkowo w przypadku nowotworu trzustki i jajnika zaobserwowano zwiększoną ekspresję receptora *NMUR2* w badanych tkankach (Zhang i wsp. 2019, Lin i wsp. 2015, Harten i wsp. 2011, Garczyk i wsp. 2017, Rani i wsp. 2014, Lin i wsp. 2016, Takahashi i wsp. 2006, Ketterer i wsp. 2009, Wang i wsp. 2016, Tang i Hu 2021, Zhang i wsp. 2021a). Te dane sprawiły, że NMU zaczęła być postrzegana jako białko towarzyszące progresji nowotworowej, jednak wiedza na temat aktywności i funkcji NMU w procesie rozwoju nowotworu na poziomie molekularnym nadal jest niewielka.

Przeprowadzona przez nasz zespół analiza ekspresji *NMU* i jej receptorów w tkankach RJG obejmowała dane zgromadzone w bazie TCGA, pochodzące z tkanek pobranych od 621 pacjentów w różnych stadiach RJG według klasyfikacji TNM. Ekspresja *NMU* była podwyższona we wszystkich analizowanych stadiach choroby w porównaniu do tkanek zdrowych, niezależnie od lokalizacji guza oraz stopnia zaawansowania (Przygodzka i wsp. 2021). Podwyższony poziom *NMU* na poziomie białka potwierdziliśmy za pomocą barwienia immunohistochemicznego w preparatach tkankowych od pacjentów z RJG (Przygodzka i wsp. 2022). Nasza dalsza analiza danych z bazy TCGA wykazała podwyższoną ekspresję *NMUR2* w przypadku tkanek nowotworowych w stadiach T2-T4. Natomiast, ekspresja *NMUR1* była obniżona we wszystkich badanych tkankach w porównaniu do tkanek kontrolnych. Nie udało nam się potwierdzić wyników dla *NMUR1* oraz *NMUR2* w barwieniu immunohistochemicznym, co jest spowodowane brakiem dostępności odpowiednich przeciwciał, które umożliwiłyby rozróżnienie obu receptorów. Dodatkowo próbki o wysokiej ekspresji *NMUR2* wykazywały obniżony poziom ekspresji *CDH1* (E-kadheryna) oraz zwiększony poziom ekspresji *MMP1* (ang. *Matrix MetalloPeptidase 1*), markera inwazyjności, co wskazuje, że wykazują one cechy komórek inwazyjnych. Ponadto nasza analiza pozwoliła również stwierdzić, że tkanki o wysokiej ekspresji *NMU* oraz *NMUR2*, częściej korelują z przerzutami do strefy okołonerwowej, co może być związane z gorszymi rokowaniami dla pacjentów. Zebrane przez nas wyniki sugerują, że wysoka ekspresja *NMU* oraz *NMUR2* związana jest z mniej odróżnicowanym i bardziej inwazyjnym fenotypem komórek, i może mieć znaczenie w progresji RJG (Przygodzka i wsp. 2021). Podobne obserwacje związane ze zwiększoną ekspresją *NMU* oraz *NMUR2* w próbkach od pacjentów opisano w przypadku nowotworu piersi, endometrium oraz trzustki (Lin i wsp. 2015, Garczyk i wsp. 2017, Ketterer i wsp. 2009).

Dane zebrane z tkanek pobranych od pacjentów z różnymi typami nowotworów skłoniły wielu badaczy do dokładniejszej analizy roli *NMU* w powstawaniu oraz rozwoju chorób nowotworowych. Badania *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych, potwierdzają ekspresję *NMU* w komórkach nowotworowych, podczas gdy kontrolne komórki nabłonkowe nie wykazują ekspresji *NMU* lub jest ona na niskim poziomie (Ketterer i wsp. 2009, Wu i wsp. 2007, Takahashi i wsp. 2006, Lin i wsp. 2016, Garczyk i wsp. 2017, Lin i wsp. 2015, Tang i Hu 2021). Wyniki, które zaprezentowałam w rozdziale 4.1. po raz pierwszy potwierdziły również ekspresję *NMU* w wybranych liniach komórkowych RJG. Różny poziom ekspresji *NMU* pomiędzy analizowanymi

liniami wynika zapewne z ich odmienności w sygnaturze genowej, przynależności do typu CMS, lokalizacji guza z którego zostały uzyskane oraz fenotypu. Najwyższym poziomem ekspresji *NMU* charakteryzują się linie o fenotypie mezenchymalnym oraz pochodzące z guza pierwotnego. Obecność białka udało mi się potwierdzić tylko w przypadku linii z wysoką ekspresją *NMU*. Jednocześnie nie jest wykluczone, że w pozostałych liniach RJG, białko jest również obecne, jednak jego detekcja wybraną metodą okazała się niemożliwa. Szereg doniesień naukowych, sugeruje, że produkcja *NMU* może być regulowana przez z białko *SNAI1*, *Myb*, czy długie niekodującym RNA - *LINC01555* lub *HAND2-AS1* (Przygodzka i wsp. 2016, Shetzline i wsp. 2013, Wang i wsp. 2019, Yang i wsp. 2018). Za pomocą immunoprecypitacji udokumentowałam, że *NMU* jest wydzielane do medium pohodowlanego, w najwyższym stopniu przez linię HCT116, która charakteryzuje się fenotypem mezenchymalnym. Stwierdziłam, że *NMU* w środowisku zewnątrzkomórkowym obecne jest w postaci różnych form pre-pro-peptydów. Informacje dotyczące wydzielania oraz powstawania aktywnej formy *NMU* są mało udokumentowane. Wiadomo, że *NMU* jest produkowana w postaci pre-pro-peptydów złożonych z 147, 149, 158 lub 174 aminokwasów, (Martinez i O'Driscoll 2015, Przygodzka i wsp. 2021). W badaniach prowadzonych przez nasz zespół udało się potwierdzić obecność w medium pohodowlanym form 174 i 158 AA, które mogą powstać w wyniku translacji odpowiednio transkryptu *NMU-201* lub *NMU-205*. Z powodu braku szczegółowych informacji dotyczących powstawania aktywnej formy *NMU-25*, istotne z perspektywy badania funkcji *NMU* może być przeprowadzenie eksperymentów, które pozwolą na szczegółowe poznanie etapów jej zewnątrzkomórkowego trawienia proteolitycznego. Białka wydzielnicze mogą być uwalniane jako zawartość mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych, wraz z lipidami oraz różnego rodzaju RNA. W powyższych badaniach potwierdziłam, że *NMU* jest wydzielana jako zawartość mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Podobne obserwacje uzyskano w przypadku raka piersi, tj. komórek linii HCC1954 z nadekspresją *NMU* oraz komórek linii EFM192A opornych między innymi na neratynib. Wymienione linie wykazywały zwiększone poziomy *NMU* transportowanego w mikropęcherzykach zewnątrzkomórkowych w porównaniu do linii kontrolnych (Martinez i wsp. 2017b). *NMU* wydzielane w ten sposób może przede wszystkim dłużej pozostawać aktywne poza komórką, bo jest chronione przed degradacją prowadzoną przez proteazy zewnątrzkomórkowe, i w ten sposób

może wpływać nie tylko na fenotyp komórek wydzielających oraz sąsiednich, ale również może być transportowane na większe odległości.

Regulacja procesów komórkowych przez NMU jest możliwa dzięki obecności receptorów na powierzchni komórek. Ekspresję *NMUR1* lub/i *NMUR2* zidentyfikowano w nowotworach trzustki, płuc, endometrium, piersi, jajnika oraz białaczce (Ketterer i wsp. 2009, Shetzline i wsp. 2013, Takahashi i wsp. 2006, Lin i wsp. 2016, Garczyk i wsp. 2017, Rani i wsp. 2016, Martinez i wsp. 2017a, Harten i wsp. 2011). W niniejszej pracy doktorskiej, ustaliłam, że wybrane linie RJG charakteryzują się różną ekspresją receptorów *NMUR1* lub *NMUR2*. Zbadane linie komórkowe RJG charakteryzują się ekspresją tylko jednego z badanych receptorów. Wyjątek stanowi linia HCT15, u której nie zaobserwowano ekspresji żadnego z badanych receptorów. Duże podobieństwo w budowie receptorów *NMUR1* oraz *NMUR2*, ich niska ekspresja, a także brak odpowiednich przeciwciał, uniemożliwiły ich detekcję na powierzchni komórek. Oprócz ekspresji *NMUR1* oraz *NMUR2*, potwierdziłam ekspresję genów *NTSR1* oraz *GHSR1b* kodujących podjednostki receptora alternatywnego. Obecność tego receptora najbardziej prawdopodobna jest w przypadku linii RJG: SW480 oraz SW620. W komórkach nowotworowych płuc, w których zidentyfikowano heterodimer *NTSR1/GHSR1b* zaobserwowano zwiększenie poziomu cAMP po traktowaniu NMU-25 (Takahashi i wsp. 2006). Moje badania obejmowały identyfikację ekspresji receptorów na poziomie mRNA, i dlatego nie można jednoznacznie stwierdzić, czy w liniach SW480 lub SW620, w których potwierdziłam ekspresję podjednostek receptora alternatywnego istnieje możliwość przekazywania sygnału pochodzącego od NMU. Zagadnienie to wymaga dalszych badań, ale jako wątek poboczny nie był przeze mnie kontynuowany.

Liczne doniesienia naukowe wskazują, że proces metylacji, związany z regulacją ekspresji genów, ma istotne znaczenie w rozwoju, progresji, a także generowaniu oporności na leczenie wielu nowotworów, w tym RJG. W 2015 roku Kamimae i wsp. przeanalizowali zmiany w metylacji DNA związane z różnymi stadiami RJG. W ramach w/w pracy udowodniono, że region promotorowy genu *NTSR1* jest silnie metylowany w zaawansowanych stadiach RJG, co skutkuje wyciszeniem jego ekspresji (Kamimae i wsp. 2015). Metylacja reguluje również ekspresję genu *NMUR1*, *NTSR1* oraz *GHSR* w przypadku pacjentów ze zdiagnozowanym płaskonabłonkowym nowotworem głowy i szyi (Misawa i wsp. 2020). Biorąc pod uwagę powyższe dane dotyczące metylacji *NTSR1*, *GHSR* oraz *NMUR1*, a także możliwość regulacji ekspresji *NMU* poprzez metylację w niektórych chorobach nowotworowych, sprawdziłam, czy brak ekspresji

NMUR1 lub *NMUR2* w liniach RJG jest wynikiem procesu metylacji. Otrzymane wyniki sugerują, że ekspresja tych receptorów jest zależna od procesu metylacji.

Moje badania pokazały, że komórki RJG wykazują zróżnicowany poziom ekspresji oraz wydzielania NMU. Dodatkowo komórki, w których wykazałam ekspresję receptorów dla NMU, scharakteryzowane są głównie jako typ CMS3 lub CMS4. Oba typy związane są ze niskim wskaźnikiem przeżywalności oraz słabą odpowiedzią na terapie przeciwnowotworowe. Biorąc pod uwagę te informacje, wydaje się, że NMU oraz jej receptory mogą być związane z procesem uzłośliwiania komórek RJG. Wiadomo, że wiązanie liganda w postaci NMU przez receptory GPCR, do których należą *NMUR1* lub *NMUR2* prowadzi do aktywacji sygnalizacji zależnej od jonów wapnia, wzrostu stężenia cAMP oraz aktywacji szlaku MAPK/ERK. Związek pomiędzy działaniem NMU, a regulacją szlaku MAPK/ERK pokazał Garczyk i wsp. (2017) po analizie transkryptomicznej komórek raka piersi, linii SKBR3 ze stabilną nadekspresją *NMU*. Dodatkowo traktowanie ludzką NMU komórek raka jajnika, linii SKOV-3 (nowotwór jajnika) z ekspresją *NMUR2* potwierdziło rolę tego receptora w regulacji aktywacji szlaku sygnalizacyjnego MAPK/ERK (Lin i wsp. 2015). Z kolei aktywację sygnalizacji komórkowej zależnej od jonów wapnia opisano w komórkach białaczki (K562) oraz komórek nowotworu nerki (RCC10 oraz RCC4) z ekspresją receptora *NMUR1* (Shetzline i wsp 2004, Harten i wsp. 2011). W związku z tym wybrane linie komórkowe z ekspresją *NMUR1* (HCT116) lub *NMUR2* (HT29) potraktowałam syntetyczną NMU-9 lub agonistami receptorów (SBL-NMU-21 dla *NMUR1* oraz SBL-NMU-17 dla *NMUR2*). W swoich badaniach użyłam zdefiniowane oraz wcześniej stosowane przez inne zespoły peptydy do badań *in vitro* sygnalizacji zależnej od NMU. NMU-9 zbudowana jest z 9 ostatnich aminokwasów ludzkiej NMU, które warunkują jej aktywność i charakteryzuje się odpowiednim powinowactwem względem receptorów, porównywalnym do aktywnej formy, NMU-25 (De Prins i wsp. 2018, Przygodzka i wsp. 2021, Przygodzka i wsp. 2022). Z kolei, agoniści SBL-NMU-21 oraz SBL-NMU-17 zostały pozyskane od grupy prof. Balleta specjalizującej się w syntezie i modyfikacjach chemicznych peptydów. Wprowadzone modyfikacje do peptydów pozwoliły zdefiniować te związki jako specyficzne ligandy względem poszczególnych receptorów. Mobilizację jonów wapnia oraz zmiany w fosforylacji kinaz białkowych ERK_{1/2} wykazałam tylko dla linii komórkowych charakteryzujących się ekspresją *NMUR2* i traktowanych agonistą dla tego receptora, podobnego efektu nie zaobserwowałam w przypadku zastosowania syntetycznej NMU-9. Można zatem przypuszczać,

że wprowadzone modyfikacje przyczyniły się do większej aktywności SBL-NMU-17 względem NMUR2 i agonista może być efektywnym narzędziem w badaniach sygnalizacji zależnej od NMU *in vitro* (De Prins i wsp. 2018). Dodatkowo badania naszego zespołu, pokazały, że poziom ekspresji *NMUR2* może mieć kluczowe znaczenie w badaniach sygnalizacji zależnej od receptora. Traktowanie syntetyczną NMU-9 lub SBL-NMU-17, linii komórkowej HEK293 z nadekspresją receptora *NMUR2* pozwoliło na detekcję zmian poziomu jonów wapnia oraz fosforylacji kinaz białkowych ERK_{1/2}. W porównaniu z linią HT29, poziom ekspresji *NMUR2* dla linii HEK293 był ok. 80 razy wyższy (Przygodzka i wsp 2021). Podobnie może być w przypadku badań dotyczących sygnalizacji zależnej od receptora NMUR1, w których brak mobilizacji jonów wapnia w komórkach po traktowaniu NMU-9 lub agonistą dla tego receptora (Ryc. 10) może być wynikiem nie wystarczająco wysokiego poziomu ekspresji receptora *NMUR1* w linii HCT116 (Ryc. 10). Nie mniej, moje badania po raz pierwszy doprowadziły do detekcji sygnału indukowanego przez NMU w komórkach RJG z endogenną ekspresją receptora NMUR2 .

Na podstawie wyników zaprezentowanych w rozdziałach 4.1. – 4.8. oraz dostępnej literatury wydaje się że, NMU oraz jej receptory, a w szczególności NMUR2 mogą stanowić istotny cel badań dotyczących zmiany fenotypu komórek nowotworowych na bardziej złośliwy, sprzyjający powstawaniu przerzutów. Rola NMU jako czynnika promującego fenotyp złośliwy w nowotworach endometrium, piersi oraz nerki została udokumentowana w kilku publikacjach (Lin i wsp. 2016, Yang i wsp. 2018, Garczyk i wsp. 2017, Harten i wsp. 2011). W dalszej części badań postanowiłam sprawdzić, czy wiązanie NMU z receptorem NMUR2, a tym samym pobudzenie sygnalizacji MAPK/ERK moduluje procesy związane z powstawaniem przerzutów, to jest: wzrost migracji i inwazyjności komórek nowotworowych. W tym celu wybrałam dwie linie charakteryzujące się niską ekspresją *NMU* oraz brakiem detekcji NMU na poziomie białka, a także ekspresją receptora *NMUR2*. Linie HT29 oraz Caco-2 po transfekcji plazmidem zawierającym sekwencję kodującą NMU zostały pozytywnie zweryfikowane pod względem obecności oraz wydzielania NMU. Wprowadzenie modeli linii komórkowych o zdefiniowanym genotypie i fenotypie oraz ze stabilną nadekspresją i wydzielaniem NMU stanowiło niezbędny element do oceny aktywności NMU w stosunku do komórek posiadających receptor NMUR2. Kontrolę do danego układu badawczego stanowiły komórki tej samej linii (HT29 lub Caco-2) transfekowane wektorem, niezawierającym sekwencji kodującej NMU. Sublinie z nadekspresją *NMU*

wykorzystałam do charakterystyki morfologicznej, oceny zdolności do formowania kolonii, a także zmian ich potencjału migracyjnego oraz inwazyjnego. W wyniku tych badań udowodniłam, że nadekspresja *NMU* w zależności od fenotypu komórek RJG różnym stopniu wpłynęła na morfologię oraz zdolność podziału tych komórek. Komórki HT29 to linia nabłonkowa, nie wykazująca cech inwazyjnych, z kolei komórki Caco-2 to linia o charakterze mezenchymalnym, silnie inwazyjna. Nadekspresja *NMU* w komórkach HT29 powodowała zmniejszenie ich zdolności do podziału oraz powstanie bardziej rozproszonych kolonii, których komórki wydają się tracić połączenia międzykomórkowe, przez co mogą prawdopodobnie sprawniej przemieszczać się (migrować). Garczyk i wsp. (2017) przeprowadzili podobne badania wykorzystując linię SKBR3 z nadekspresją *NMU* oraz ekspresją *NMUR2*. Zaprezentowane w/w pracy wyniki pokazują, że komórki linii SKBR3 zmniejszyły swoją zdolność do podziałów, jednocześnie zwiększając potencjał migracyjny (Garczyk i wsp. 2017). Natomiast w przypadku inwazyjnej linii Caco-2, nadekspresja *NMU*, nie wywołała zmian w morfologii kolonii, natomiast przyczyniła się do zwiększenia liczby tworzonych kolonii. Kolejne badania, które przeprowadziłam udowodniły, że nadekspresja *NMU* powoduje zwiększenie potencjału migracyjnego oraz inwazyjnego komórek RJG. Wykazałam również, że *NMU* stymuluje migrację poprzez aktywację szlaku MAPK/ERK. Wpływ *NMU* na migrację przedstawiono w kilku publikacjach dotyczących innych typów nowotworów, takich jak: rak jajnika, endometrium, piersi oraz trzustki, co świadczy o udziale *NMU* w procesach związanych z nabywaniem cech inwazyjnych przez komórki (Lin i wsp. 2016, Yang i wsp. 2018, Garczyk i wsp. 2017, Wang i wsp. 2019, Martinez i wsp. 2017a, Harten i wsp. 2011).

Istotną rolę w promowaniu progresji RJG odgrywają integryny, które stanowią dużą rodzinę białek powierzchniowych. Integryny oraz procesy od nich zależne, są zaangażowane w rozwój oraz progresję nowotworu, np.: proliferację komórek nowotworowych, inwazję lokalną oraz powstawanie przerzutów w odległych organach. Zwiększenie poziomu *NMU* w liniach komórkowych HT29 oraz Caco-2 spowodowało wzrost poziomu większości zbadanych powierzchniowych podjednostek integrynowych, których działanie opisano jako sprzyjające progresji różnych typów nowotworów, w tym RJG (Hamidi i Ivaska 2018, Su i wsp. 2020). Udowodniono, że podjednostka integrynowa $\alpha 2$ odgrywa istotną rolę w promowaniu przerzutów do wątroby w RJG (Yoshimura i wsp. 2009). Natomiast zwiększony poziom podjednostki αV jest związany z wyższym ryzykiem rozwoju inwazji okołonerkowej w RJG (Viana i wsp. 2013).

Podobnie zwiększenie poziomu podjednostki integrynowej $\alpha 5$ u pacjentów ze zdiagnozowanym RJG wpływa na jego rozwój oraz metastazę (Murillo i wsp. 2004, Nam i wsp. 2014, Nam i wsp. 2015, Yu i wsp. 2019).

Wyniki zgromadzone w niniejszej pracy doktorskiej po raz pierwszy pokazują związek NMU i jej receptorów z progresją RJG. Wybrane linie RJG w zależności od fenotypu charakteryzują się zróżnicowanym poziomem ekspresji *NMU* i jej receptorów, co może odzwierciedlać heterogenność i obecność różnych subpopulacji komórek w obrębie guza nowotworowego. Wydaje się, że najwyższa ekspresja NMU związana z fenotypem mezenchymalnym może być charakterystyczna dla subpopulacji komórek inwazyjnych obecnych w guzie i zaangażowanych w proces przerzutowania. Zróżnicowany poziom ekspresji receptorów *NMUR1*, *NMUR2* oraz receptora alternatywnego *NTSR1/GHSR1b* wskazuje, że komórki RJG są zdolne w różnym stopniu do generowania sygnałów wewnątrzkomórkowych zależnych od NMU. W moich badaniach potwierdziłam, że komórki RJG wykazujące nadekspresję *NMU* zwiększają swoje zdolności migracyjne oraz inwazyjne poprzez wiązanie z receptorem *NMUR2*, co koreluje z naszymi wynikami analiz próbek od chorych na RJG, które wykazują podwyższony poziom ekspresji *NMU* i *NMUR2* w tkankach nowotworowych, z charakterystycznymi markerami inwazyjności. Biorąc pod uwagę wszystkie zgromadzone informacje, wydaje się, że ocena poziomu ekspresji *NMU* oraz *NMUR2* może być istotna z punktu widzenia określenia stadium zaawansowania RJG oraz pozwoli określić, czy badane zmiany wykazują potencjał do powstawania przerzutów. Wyniki zaprezentowane przeze mnie w niniejszej pracy świadczą o zaangażowaniu NMU i jej receptorów w proces ułóżliwiania RJG, dlatego rozwijanie tego tematu wydaje się istotne, ponieważ może się przyczynić do wskazania NMU jako czynnika prognostycznego RJG.

6. Wnioski

W pierwszej części pracy doktorskiej uzyskane wyniki pozwoliły na scharakteryzowanie panelu komórek RJG pod względem ekspresji *NMU*, *NMUR1*, *NMUR2*, a także receptora alternatywnego *NSTRI/GHSR1b*, poziomu białka *NMU* w lizatach komórkowych i *NMU* wydzielanego do środowiska, oraz wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych zależnych od *NMU*

- Linie komórkowe RJG w zależności od fenotypu charakteryzują się różnym poziomem ekspresji *NMU* oraz jej receptorów,
- *NMU* jest wydzielana do środowiska przez komórki RJG, ponadto została zidentyfikowana jako białko obecne w mikropęcherzykach zewnątrzkomórkowych,
- Ekspresja receptorów *NMUR1* oraz *NMUR2* jest regulowana przez proces metylacji w komórkach RJG,
- Większość komórek RJG z badanego panelu posiada receptor dla *NMU*, a więc jest zdolna do generowania sygnalizacji zależnej od *NMU*,
- W komórkach RJG generowanie sygnału zależnego od receptora *NMUR2* prowadzi do mobilizacji jonów wapnia wewnątrzkomórkowego oraz fosforylacji kinaz białkowych ERK_{1/2}.

W drugiej części pracy doktorskiej skupiono się na zbadaniu wpływu *NMU* na funkcje komórek RJG i w tym celu wykorzystano komórki RJG z nadekspresją *NMU*.

- Działanie *NMU* wywołuje zmiany w zależności od fenotypu komórek RJG. W komórkach mniej inwazyjnych *NMU* uruchamia procesy podobne do tych zachodzących podczas EMT, a w komórkach o fenotypie mezenchymalnym stymuluje tworzenie nowych kolonii.
- Transdukcja sygnału na drodze *NMU* – *NMUR2* prowadzi do zwiększenia potencjału migracyjnego oraz inwazyjności komórek RJG poprzez aktywację kinaz ERK_{1/2}.
- Zmianom funkcjonalnym w komórkach RJG wywołanym działaniem *NMU* towarzyszy wzrost ekspresji większości podjednostek integrynowych co może stanowić jeden z mechanizmów działania *NMU* w RJG.

7. Streszczenie

Rak jelita grubego (RJG) jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów na świecie. Pomimo poznania mechanizmów molekularnych prowadzących do powstania oraz rozwoju RJG, nie opracowano dotychczas precyzyjnych metod diagnostycznych oraz efektywnych schematów terapii zapobiegających metastazie. Dlatego wciąż niezbędna jest identyfikację czynników, które są aktywne we wczesnych etapach powstawania zmian prowadzących do powstania przerzutów.

Neuromedyna U, małe białko wydzielnicze, w ostatnich latach zyskał zainteresowanie z uwagi na jego potencjalną rolę w rozwoju chorób nowotworowych. Udział NMU w progresji RJG, nie został dotychczas opisany, dlatego w niniejszej pracy doktorskiej, pt.: „Rola neuromedyny U (NMU) w regulacji potencjału migracyjnego komórek raka jelita grubego” postanowiłam zweryfikować hipotezę, że NMU może regulować potencjał migracyjny oraz inwazyjny komórek RJG. Do badań wykorzystano panel 6 linii komórkowych RJG wyizolowanych od pacjentów na różnych etapach zaawansowania choroby. Wybrane linie zbadano pod kątem ekspresji *NMU* oraz receptorów, *NMUR1* i *NMUR2*, a także receptora alternatywnego *NTSRI/GHSR1b*. Następnie sprawdzono obecność NMU w lizatach komórkowych, medium pochodzonym oraz w lizatach z mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Dodatkowo zbadano, czy poziom ekspresji *NMUR1* lub *NMUR2* zależy od procesu metylacji. Kolejno sprawdzono aktywację ścieżek sygnałowych charakterystycznych dla receptorów GPCR, które mogą być uruchamiane pod wpływem NMU.

Przeprowadzone badania pokazały, że komórki RJG charakteryzują się zróżnicowaną ekspresją *NMU* oraz receptorów dla NMU. Dodatkowo pokazano, że ekspresja *NMUR1* i *NMUR2* może być regulowana przez proces metylacji. NMU jest wydzielana na zewnątrz komórek w postaci różnych form pre-pro-peptydów oraz jako zawartość mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych. W komórkach RJG z ekspresją receptora *NMUR2* dochodzi do mobilizacji wewnątrzkomórkowych jonów wapnia oraz fosforylacji kinaz białkowych $ERK_{1/2}$ pod wpływem działania SBL-NMU-17 (agonista *NMUR2*).

Drugim etapem pracy była ocena zmian potencjału migracyjnego oraz inwazyjnego linii komórkowych RJG pod wpływem NMU. Do oceny zmian fenotypu komórek oraz badań funkcjonalnych zostały wykorzystane linie komórkowe z ekspresją *NMUR2* i stabilną nadekspresją *NMU*. Otrzymane wyniki wskazują, że pod wpływem NMU dochodzi do zmian fenotypu sublinii HT29 (fenotyp epitelialny),

i rozluźnienia połączeń między komórkami, jednocześnie obniżyła się ich zdolność do formowania kolonii. W przypadku sublinii Caco-2 (fenotyp mezenchymalny) nie zaobserwowano zmian w morfologii, ale nastąpił wzrost ich zdolności do formowania kolonii. Następnie udowodniono, że niezależnie od fenotypu, NMU powoduje zwiększenie potencjału migracyjnego oraz inwazyjnego komórek, poprzez wiązanie z NMUR2 oraz fosforylację kinaz białkowych ERK_{1/2}. Przedstawione badania potwierdzają również, że NMU jest zaangażowana w regulację poziomu powierzchniowych podjednostek integrynowych istotnych w progresji RJG.

Otrzymane wyniki sugerują, że NMU poprzez interakcje z NMUR2, aktywuje ścieżkę sygnałową MEK/ERK. NMU wydzielana do środowiska przez komórki RJG, powoduje zwiększenie ich potencjału migracyjnego oraz inwazyjnego w zastosowanym modelu. Wydaje się, że transdukcja sygnału NMU-NMUR2 jest jednym z istotnych mechanizmów komórkowych prowadzących do zmiany fenotypu komórek RJG na bardziej inwazyjny.

8. Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the most frequently diagnosed cancers in the world. Despite the knowledge of the molecular mechanisms leading to the formation and development of CRC, no precise diagnostic methods and effective treatment regimens to prevent metastasis have been developed so far. Therefore, it is still necessary to identify the factors that are active in the early stages of the formation of lesions leading to the formation of metastases.

Neuromedin U, a small secretory peptide, has gained interest in recent years due to its potential role in the development of cancer. The role of NMU in the progression of CRC has not been described so far, therefore in this Ph.D. thesis entitled "The role of neuromedin U (NMU) in the regulation of the migration potential of colorectal cancer cells", I decided to verify the hypothesis that NMU can regulate the migration and invasive potential of CRC cells. A panel of 6 CRC cell lines isolated from patients at various stages of the disease was used for the study. Selected lines were tested for the expression of *NMU* and the receptors, *NMUR1* and *NMUR2*, as well as the alternative receptor *NTSR1/GHSR1b*. Next, the presence of NMU in cell lysates, post-culture medium and lysates from extracellular microvesicles was checked. Additionally, it was investigated whether the expression level of *NMUR1* or *NMUR2* depends on the methylation process. Subsequently, the activation of signaling pathways characteristic of GPCR receptors, which can be activated under the influence of NMU, was checked.

The performed research showed that CRC cells are characterized by differential expression of *NMU* and its receptors. Additionally, it has been shown that the expression of *NMUR1* and *NMUR2* can be regulated by the methylation process. NMU is secreted outside the cells in the form of various forms of pre-pro-peptides and as the content of extracellular microvesicles. In CRC cells expressing the *NMUR2* receptor, intracellular calcium ions are mobilized and ERK_{1/2} protein kinases are phosphorylated influence of SBL-NMU-17 (NMUR2 agonist).

The second part of my Ph.D. thesis was the assessment of changes in the migration and invasive potential of CRC cell lines under the influence of NMU. Cell lines with *NMUR2* expression and stable *NMU* overexpression were used to assess changes in cell phenotype and functional studies. The obtained results indicate that the phenotype of the HT29 subline (the epithelial phenotype) is changed under the influence of NMU, and the connections between cells are loosened, while their ability to form colonies is reduced. In the case of the Caco-2 subline (mesenchymal phenotype), no change

in morphology was observed, but there was an increase in their ability to form colonies. Subsequently, it was proved that, regardless of the phenotype, NMU increases the migration and invasive potential of cells by binding to NMUR2 and phosphorylation of ERK_{1/2} protein kinases. The presented studies also confirm that NMU is involved in regulating the level of surface integrin subunits important in CRC progression.

The obtained results suggest that NMU, by interacting with NMUR2, activates the MEK/ERK signaling pathway. NMU secreted into the environment by CRC cells increases their migration and invasive potential in our model. Our study suggests, the transduction of the NMU-NMUR2 signal is one of the most important cellular mechanisms leading to the change of the phenotype of CRC cells to a more invasive.

9. Bibliografia

1. Aiyar N., Disa J., Foley J. J., Buckley P. T., Wixted W. E., Pullen M., Pullen M., Shabon U., Dul E., Szekeres P. G., Elshourbagy N. A., Sarau H. M., Appelbaum E., Bolaky J. (2004) Radioligand Binding and Functional Characterization of Recombinant Human NmU1 and NmU2 Receptors Stably Expressed in Clonal Human Embryonic Kidney-293 Cells. *Pharmacology*. 72 (1): 33-41.
2. Akkoca A. N., Yanik S., Özdemir Z. T., Cihan F. G., Sayar S., Cincin G., Cam A., Özer C. (2014) TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 7 (9): 2828-2835.
3. Al-Salama Z. T. (2021) Encorafenib: A Review in Metastatic Colorectal Cancer with a *BRAF V600E* Mutation. *Drugs*. 81: 849-856.
4. Alevizos I., Mahadevappa M., Zhang X., Ohyama H., Kohno Y., Posner M., Gallagher G. T., Varveres M., Cohen D., Kim D., Kent R., Dono R. B., Todd R., Yung C. M., Warrington J. A., Wong D. T. W. (2001) Oral cancer *in vivo* gene expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarray analysis. *Oncogene*. 20: 6196-6204.
5. Alhosaini K., Bahattab O., Qassam H., Challiss R. A. J., Willars G. B. (2018) Ligand-Specific Signaling Profiles and Resensitization Mechanisms of the Neuromedin U2 Receptor. *Molecular Pharmacology*. 94 (1): 674-688.68
6. Azadi A., Golchini A., Delazar S., Abarghooi K., Dehnavi S. M., Payandeh Z., Eyvazi S. (2021) Recent Advances on Immune Targeted Therapy of Colorectal Cancer Using bi-Specific Antibodies and Therapeutic Vaccines. *Biological Procedures Online*. 23 (13): 1-13.
7. Babic M., Romagnani C. (2018) The Role of natural Killer Group 2, Member D in Chronic inflammation and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*. 9: 1-6.
8. Basith S., Cui M., Macalino S. J. Y., Park J., Clavio N. A. B., Kang S., Choi S. (2018) Exploring G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) Ligand Space via Cheminformatics Approaches: Impact on Rational Drug Design. *Frontiers in Pharmacology*. 9: 128-154.
9. Bian J., Dannappel M., Wan C., Firestein R. (2020) Transcriptional Regulation of Wnt/ β -Catenin Pathway in Colorectal Cancer. *Cells*. 9: 1-29.
10. Biller L. H., Schrag D. (2021) Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of the American Medical Association*. 325 (7): 669-686.

11. Boland C. R., Goel A. (2010) Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 138 (6): 2073-2087.
12. Brighton P. J., Szekeres P. G., Willars G. B. (2004a) Neuromedin U and Its Receptors: Structure, Function, and Physiological Roles. *Pharmacological Reviews*. 56 (2): 231-248.
13. Brighton P. J., Szekeres P. G., Wise A., Willars G. B. (2004b) Signaling and Ligand Binding by Recombinant Neuromedin U Receptors: Evidence for Dual Coupling to $G\alpha_{q/11}$ and $G\alpha_i$ and an Irreversible Ligand-Receptor Interaction. *Molecular Pharmacology*. 66: 1544-1556.
14. Buccafusca G., Proserpio I., Tralongo A., Rametta G. S., Tralongo P. (2019) Early colorectal cancer: diagnosis, treatment and survivorship care. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 136: 20-30.
15. Cao H., Xu E., Liu H., Wan L., Lai M. (2015) Epithelial–mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathology - Research and Practice*. 211 (8): 557-569.
16. Chung Y-C., Wei W-C., Hung C-N., Kuo J-F., Hsu C-P, Chang K-J., Chao W-T. (2016) Rab11 collaborates E-cadherin to promote collective cell migration and indicates a poor prognosis in colorectal carcinoma. *European Journal of Clinical Investigation*. 46: 1002-1011.
17. Coebergh van den Braak R. R. J., ten Hoorn S., Sieuwerts A. M., Yuynman J. B., Smid M., Wilting S. M., Martens J. W. M., Punt C. J. A., Foekens J. A., Medema J. P., IJzermans J. N. M., Vermeulen L. (2020) Interconnectivity between molecular subtypes and tumor stage in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 20: 850-857.
18. Dass N. B., Bassil A. K., North-Laidler V. J., Morrow R., Aziz E., Tuladhar B. R., Sanger G. J. (2007). Neuromedin U can exert colon-specific, enteric nerve-mediated prokinetic activity, via a pathway involving NMU 1 receptor activation: Colonic motility effects of neuromedin U. *British Journal of Pharmacology*. 150 (4): 502-508.
19. de Matos M. B., Barbosa L. E., Tixeira J. P. (2020) Narrative review comparing the epidemiology, characteristics, and survival in sporadic colorectal carcinoma/Lynch syndrome. *Journal of Coloproctology*. 40: 73-78.
20. De Prins A., Martin C., Van Wanseele Y., Skov L. J., Tömböly C., Tourwé D., Caveliers V., Van Eeckhaut A., Holst B., Rosenkilde M. M., Smolders I. Ballet S.

- (2018). Development of potent and proteolytically stable human neuromedin U receptor agonists. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 144: 887-97.
21. De Prins A., Van Eeckhaut A., Smolders I., Tourwé D., Ballet S. (2020) Neuromedin U and Structural Analogs: An Overview of their Structure, Function and Selectivity. *Current Medicinal Chemistry*. 27 (39): 6744 - 6768.
 22. de'Angelis G. L., Bottarelli L., Azzoni C., de'Angelis N., Leandro G., Di Mario F., Gaiani F., Negri F. (2018) Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Bio Medica Atenei Parmensis*. 89: 97-101.
 23. Dhillon S. (2018) Regorafenib: A Review in Metastatic Colorectal Cancer. *Adis Drug Evaluation*. 78: 1133-1144.
 24. Dienstmann R., Vermeulen L., Guinney J., Kopets S., Tejpar S., Tabernero J. (2017) Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*. 17: 79-92.
 25. Fearon E. R., Vogelstein B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 61(5): 759-67.
 26. Feng M., Zhao Z., Yang M., Ji J., Zhu D. (2021) T-cell-based immunotherapy in colorectal cancer. *Cancer Letters*. 498: 201-209.
 27. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Mathers C., Parkin D. M., Piñeros M., Znaor A., Bray F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*. 144 (8): 1941-1953.
 28. Fischer J., Walker L. C., Robinson B. A., Frizelle F. A., Church J. M., Eglinton T. W. (2019) Clinical implications of the genetics of sporadic colorectal cancer. *ANZ Journal of Surgery*. 89 (10): 1224-1229.
 29. Fujii R., Hosoya M., Fukusumi S., Kawamata Y., Habata Y., Hinuma S., Onda H., Nishimura O., Fujino M. (2000) Identification of Neuromedin U as the Cognate Ligand of the Orphan G Protein-coupled Receptor FM-3. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 21068-21074.
 30. Galván J. A., Helbling M., Koelzer V. K., Tschan M. K., Berger M. D., Hädrich M., Schnüriger B., Karamitopoulou E., Dawson H., Inderbitzin D., Lugli A., Zlobec I. (2014) TWIST1 and TWIST2 promoter methylation and protein expression in tumor stroma influence the epithelial-mesenchymal transition-like tumor budding phenotype in colorectal cancer. *Oncotarget*. 6 (2): 874-886.

31. García-Aranda M., Redondo M. (2019) Targeting Receptor Kinases in Colorectal Cancer. *Cancers*. 11 (433): 1-24.
32. Garczyk S., Klotz N., Szczepanski S., Denecke B., Antonopoulos W., von Stillfried S., Knüchel R. Rose M., Dahl E. (2017). Oncogenic features of neuromedin U in breast cancer are associated with NMUR2 expression involving crosstalk with members of the WNT signaling pathway. *Oncotarget*. 8 (22): 36246-36265.
33. Georgakopoulos-Soares I., Chartoumpakis D., Kyriazopoulou V., Zaravinos A. (2020) EMT Factors and Metabolic Pathways in Cancer. 10: 499-519.
34. Ghosh D., Dutta A., Kashyap A., Upmanyu N., Datta S. (2021) PLP2 drives collective cell migration via ZO-1-mediated cytoskeletal remodeling at the leading edge in human colorectal cancer cells. *Journal of Cell Science*. 134:1-20.
35. Guinney J., Dienstmann R., Wang X, de Reyniès A., Schlicker A., Soneson C., Marisa L., Roepman P., Nyamundanda G., Angelino P., Bot M. B., Morris J. S., Simon I. M., Gerster S., Fessler E., De Sousa E Melo F., Missiaglia E., Ramay H., Barras D., Homicsko K., Maru D., Manyam G. C., Broom B., Boige V., Perez-Villamil B., Laderas T., Salazar R., Gray J. W., Hanahan D., Tabernero J., Bernards R., Friend S. H., Laurent-Puig P., Medema J. P., Sadanandam A., Wessels L., Delorenzi M., Kopetz S., Vermeulen L., Tejpar S. (2015) The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*. 21 (11): 1350-1363.
36. Hamidi H., Ivaska J. (2018) Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer*. 18 (9): 533-548.
37. Harada S., Morlote D. (2020) Molecular Pathology of Colorectal Cancer. *Advances in Anatomic Pathology*. 27 (1): 19-26.
38. Harten S. K., Esteban M. A., Shukla D., Ashcroft M., Maxwell P. H. (2011) Inactivation of the von Hippel-Lindau tumour suppressor gene induces Neuromedin U expression in renal cancer cells. *Molecular Cancer*. 10(1):89-96.
39. Hay E. D. (1958) The Fine Structure of Blastema Cells and Differentiating Cartilage Cells in Regenerating Limbs of Amblysto~a Larvae. *Blastema And Cartilage Cells*. 4 (5): 583-607.
40. Howard A. D., Wang R., Pong S-S., Mellin T. N., Strack A., Guan X-M., Zeng Z., Williams D. L., Feighner S. D., Nunes C. N., Murphy B., Stair J. N., Yu H., Jiang Q., Clements M. K., Tan C. P., McKee K. K., Hreniuk D. L., McDonald T.

- P., Lynch K. R., Evans L. F., Austin C. P., Caskey C. T., Van der Ploeg L. H. T., Liu Q. (2000) Identification of receptors for neuromedin U and its role in feeding. *Letters to Nature*. 406: 5-10.
41. Hwang K., Yoon J. H., Lee J. H., Lee S. (2021) Recent Advances in Monoclonal Antibody Therapy for Colorectal Cancers. *Biomedicines* 9 (39): 1-24.
 42. Itatani Y., Kawada K., Sakai Y. (2019) Transforming Growth Factor- β Signaling Pathway in Colorectal Cancer and Its Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*. 20 (23): 5822-5838.
 43. Janiszewska M., Primi M. C., Izard T. (2020) Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 295 (8): 2495-2505.
 44. Jeong K. Y., Park M., Sim J.-J., Kim H. M., (2020) Combination Antitumor Effect of Sorafenib via Calcium-Dependent Deactivation of Focal Adhesion Kinase Targeting Colorectal Cancer Cells. *Molecules*. 25 (22): 1-11.
 45. Jin K.-T., Chen B., Liu Y.-Y., Lan H.-R., Yan J.-P. (2021) Monoclonal antibodies and chimeric antigen receptor (CAR) T cells in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Cell International*. 21 (83): 1-15.
 46. Jung B., Staudacher J. J., Beauchamp D. (2017) Transforming Growth Factor β Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 152 (1): 36-52.
 47. Kamimae S., Yamamoto E., Kai M., Niinuma T., Yamano H., Nojima M., Yoshikawa K., Kimura T., Takagi R., Harada E., Harada T., Maruyama R., Sasaki Y., Tokino T., Shinomura Y., Sugai T., Imai K., Suzuki H. (2015) Epigenetic silencing of NTSR1 is associated with lateral and noninvasive growth of colorectal tumors. *Oncotarget*. 6 (30): 29975-29990.
 48. Kawauchi T. (2012) Cell Adhesion and Its Endocytic Regulation in Cell Migration during Neural Development and Cancer Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 13: 4564-4590.
 49. Ketterer K., Kong B., Frank D., Giese N. A., Bauer A., Hoheisel J., Korc M., Kleeff J., Michalski C. W., Friess H. (2009) Neuromedin U is overexpressed in pancreatic cancer and increases invasiveness via the hepatocyte growth factor c-Met pathway. *Cancer Letters*. 277 (1): 72-81.

50. Keum N., Giovannucci E. (2019) Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 16: 713-732.
51. Khaliq A.M., Erdogan C., Kurt Z., Turgut S.S., Grunvald M. W., Rand T., Khare S., Borgia J. A., Hayden D. M., Pappas S. G., Govekar H. R., Kam A. E., Reiser J., Turaga K., Radovich M., Zang Y., Qiu Y., Liu Y., Fishel M. L., Turk A., Gupta V., Al-Sabti R., Subramanian J., Kuzel T. M., Sadanandam A., Waldron L., Hussain A., Saleem M., El-Rayes B., Salahudeen A. A., Masood A. (2022) Refining colorectal cancer classification and clinical stratification through a single-cell atlas. *Genome Biology*. 23: 113-143.
52. Koveitypour Z., Panahi F., Vakilian M., Peymani M., Seyed Forootan F., Nasr Esfahani M., Ghaedi K. (2019) Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. *Cell & Bioscience*. 9: 97-111.
53. Krakhmal N. V., Zavyalova M. N., Denisov E. V., Vtorushin S. V., Perelmuter V. M. (2015) Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. *Acta Naturae*. 7: 17-28.
54. Kucharzewska P., Christianson H. C., Welch J. E., Svensson K. J., Fredlund E., Ringner M., Morgelin M., Bourseau-Guilmani E., Bengzon J., Belting M. (2013) Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110 (18): 7312-7317.
55. Li Q., Han L., Ruan S., Shen S., Cao Q., Cai X., Yan Y., Peng B., Hua Y. (2020) The prognostic value of neuromedin U in patients with hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 20: 1-11.
56. Lin T-Y., Huang W-L., Lee W-Y., Luo C-W. (2015) Identifying a Neuromedin U Receptor 2 Splice Variant and Determining Its Roles in the Regulation of Signaling and Tumorigenesis In Vitro. *PLoS ONE*. 10 (8): 1-19.
57. Lin T-Y., Wu F-J., Chang C-L., Li Z., Luo C-W. (2016) NMU signaling promotes endometrial cancer cell progression by modulating adhesion signaling. *Oncotarget*. 7(9): 10228-10242.
58. Lynch H. T., Lanspa S., Smyrk T., Boman B., Watson P., Lynch J. (1991) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I & II): Genetics, pathology, natural history, and cancer control, part I. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 53 (2): 143-160.

59. Malendowicz L., Ruciński M. (2021) Neuromedins NMU and NMS: An Updated Overview of Their Functions. *Frontiers in Endocrinology*. 12: 1-16.
60. Malki A., EIRuz R. A., Gupta I., Allouch A., Vranic S., Al Moustafa A-E. (2020) Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *International Journal of Molecular Sciences*. 22: 130-153.
61. Martinez V. G., O'Driscoll L. (2015) Neuromedin U: A Multifunctional Neuropeptide with Pleiotropic Roles. *Clinical Chemistry*. 61: 471-482.
62. Martinez V. G., Crown J., Porter R. K., O'Driscoll L. (2017a) Neuromedin U alters bioenergetics and expands the cancer stem cell phenotype in HER2-positive breast cancer. *International Journal of Cancer*. 140 (12): 2771-2784.
63. Martinez V. G., O'Neill S., Salimu J., Breslin S., Clayton A., Crown J., O'Driscoll L. (2017b) Resistance to HER2-targeted anti-cancer drugs is associated with immune evasion in cancer cells and their derived extracellular vesicles. *OncoImmunology*. 6: 1-10.
64. Mayor R., Etienne-Manneville S. (2016) The front and rear of collective cell migration. *Nature Reviews*. 17: 97-110.
65. Minamino N., Kangawa K., Matsuo H. (1985) Neuromedin U-8 and U-25: Novel uterus stimulating, and hypertensive peptides identified in porcine spinal cord. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 130 (3): 1078-1085.
66. Misawa K., Mima M., Satoshi Y., Misawa Y., Imai A., Mochizuki D., Nakagawa T., Kurokawa T., Oguro M., Ishikawa R., Yamaguchi Y., Endo S., Kawasaki H., Kanazawa T., Mineta H. (2020) Neuropeptide receptor genes GHSR and NMUR1 are candidate epigenetic biomarkers and predictors for surgically treated patients with oropharyngeal cancer. *Scientific Reports*. 10: 1-11.
67. Mojarad E. N., Kuppen P. J., Aghdaei H. A., Zali M. R. (2013) The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*. 6 (3): 120-128.
68. Morgado-Diaz J. A., Wagner M. S., Sousa-Squiavinato A., de-Freitas-Junior J., de Araújo M. W., Tessmann J. W., Rocha M. W. (2022) Epithelial-Mesenchymal Transition in Metastatic Colorectal Cancer. *Gastrointestinal Cancers*. Rozdział 3.
69. Murillo C. A., Rychahou P. G., Evers B. M. (2004) Inhibition of $\alpha 5$ integrin decreases PI3K activation and cell adhesion of human colon cancers. *Surgery*. 136 (2): 143-149.

70. Nabeshima K., Inoue T., Shimao Y., Okada Y., Itoh Y., Seiki M., Koono M. (2000) Front-Cell-specific Expression of Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase and Gelatinase A during Cohort Migration of Colon Carcinoma Cells Induced by Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor. *Cancer Research*. 60: 3364-3369.
71. Nam E-H., Lee Y., Moon B., Lee J. W., Kim S. (2015) Twist1 and AP-1 cooperatively upregulate integrin $\alpha 5$ expression to induce invasion and the epithelial–mesenchymal transition. *Carcinogenesis*. 36 (3): 327-337.
72. Nam E-H., Lee Y., Zhao X-F., Park Y-K., Lee J. W., Kim S. (2014) ZEB2–Sp1 cooperation induces invasion by upregulating cadherin-11 and integrin $\alpha 5$ expression. *Carcinogenesis*. 35 (2): 302-314.
73. Nie X., Liu H., Liu L., Wang Y-D., Chen W-D. (2020) Emerging Roles of Wnt Ligands in Human Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*. 10: 1341-1354.
74. Odoemelam C. S., Percival B., Wallis H., Chang M-W., Ahmad Z., Scholey D., Burton E., Williams I. H., Kamerlin C. L., Wilson P. B. (2020) G-Protein coupled receptors: structure and function in drug discovery. *RSC Advances*. 10 (60): 36337–36348.
75. Ogino S., Kawasaki T., Kirkner G. J., Loda M., Fuchs C. S. (2006) CpG Island Methylator Phenotype-Low (CIMP-Low) in Colorectal Cancer: Possible Associations with Male Sex and KRAS Mutations. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 8 (5): 582-588.
76. Ogino S., Kawasaki T., Kirkner G. J., Kraft P., Loda M., Fuchs C. S. (2007) Evaluation of Markers for CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) in Colorectal Cancer by a Large Population-Based Sample. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 9 (3): 305-314.
77. Pino M. S., Chung D. C. (2010) The Chromosomal Instability Pathway In Colon Cancer. *Gastroenterology*. 138 (6): 2059-2072.
78. Pretzsch E., Bösch F., Neumann J., Ganschow P., Bazhin A., Guba M., Werner J., Angele M. (2019) Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic Organotropism: Hematogenous versus Peritoneal Spread. *Journal of Oncology*. 2019: 1-13.
79. Przygodzka P., Papiewska-Pajak I., Bogusz H., Kryczka J., Sobierajska K., Kowalska M. A., Boncela J. (2016) Neuromedin U is upregulated by Snail at early

- stages of EMT in HT29 colon cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1860 (11): 2445-2453.
80. Przygodzka P., Soboska K., Sochacka E., Boncela J. (2019) Neuromedin U: A Small Peptide in the Big World of Cancer. *Cancers*. 11 (9): 1312-1327.
 81. Przygodzka P., Sochacka E., Soboska K., Pacholczyk M., Papiewska-Pająk I., Przygodzki T., Ballet S., De Prins A., Boncela J. (2021) Neuromedin U induces an invasive phenotype in CRC cells expressing the NMUR2 receptor. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 40 (1): 283-300.
 82. Raddatz R., Wilson A. E., Artymyshyn R., Bonini J. A., Borowsky B., Boteju L. W., Zhou S., Kouranova E. V., Nagorny R., Guavarrá M. S., Dai M., Lerman G. S., Vaysse P. J., Branchek T. A., Gerald C., Forray C., Adham N. (2000) Identification and Characterization of Two Neuromedin U Receptors Differentially Expressed in Peripheral Tissues and the Central Nervous System. *Journal of Biological Chemistry*. 275 (42): 32452-32459.
 83. Rani S., Corcoran C., Shiels L., Germano S., Breslin S., Madden S., McDermott M. S., Browne B. C., O'Donovan N., Crown J., Gogarty M., Byrne A. T., O'Driscoll L. (2014) Neuromedin U: A Candidate Biomarker and Therapeutic Target to Predict and Overcome Resistance to HER-Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer Research*. 74(14): 3821-33.
 84. Schillaci O., Fontana S., Monteleone F., Taverna S., Di Bella M. A., Di Vizio D., Alessandro R. (2017) Exosomes from metastatic cancer cells transfer amoeboid phenotype to non-metastatic cells and increase endothelial permeability: their emerging role in tumor heterogeneity. *Scientific Reports*. 7: 4711-4736.
 85. Scott R. E., Wille J. J. (1984) Mechanisms for the Initiation and Promotion of Carcinogenesis: A Review and a New Concept. *Mayo Clinic Proceedings*. 59: 107-117.
 86. Shan L., Qiao X., Crona J. H., Behan J., Wang S., Laz T., Bayne M., Gustafson E. L., Monsoma F. J., Hedrick J. A. (2000) Identification of a Novel Neuromedin U Receptor Subtype Expressed in the Central Nervous System. *Journal of Biological Chemistry*. 275 (50): 39482-39486.
 87. Shatkin G., Yeoman B., Birmingham K., Katira P., Engler A. J. (2020) Computational models of migration modes improve our understanding of metastasis. *APL Bioengineering*. 4 (4): 1-9.

88. Shetzline S. E., Rallapalli R., Dowd K. J., Zou S., Nakata Y., Swider C. R. (2004) Neuromedin U: a Myb-regulated autocrine growth factor for human myeloid leukemias. *Blood*. 104 (6): 1833-1840.
89. Simon K. (2016) Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical Interventions in Aging*. 11: 967-976.
90. Spaderna S., Schmalhofer O., Wahlbuhl M., Dimmler A., Bauer K., Sultan A., Hlubek F., Jung A., Strand D., Eger A., Kirchner T., Behrens J., Brabletz T. (2008) The Transcriptional Repressor ZEB1 Promotes Metastasis and Loss of Cell Polarity in Cancer. *Cancer Research*. 68 (2): 537-545.
91. Su C., Li J., Zhang L., Wang H., Wang F., Tao Y., Wang Y., Guo Q., Li J., Liu Y., Yan Y., Zhang J. (2020) The Biological Functions and Clinical Applications of Integrins in Cancers. *Frontiers in Pharmacology*. 11: 579068-579082.
92. Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 71 (3): 209-249.
93. Szekeres P. G., Muri A. I., Spinage L. D., Miller J. E., Butler S. I., Smith A., Rennie G. I., Murdock P. R., Fitzgerald L. R., Wu H-I., McMillan L. J., Guerrere S., Vawter L., Elshourbagy N. A., Mooney J. L., Bergsma D. J., Wilson S., Chambers J. K. (2000) Neuromedin U Is a Potent Agonist at the Orphan G Protein-coupled Receptor FM3. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 20247-20250.
94. Tabernero J., Grothey A., Van Cutsem E., Yaeger R., Wasan H., Yoshino T., Desai J., Ciardiello F., Loupakis F., Hong Y. S., Steeghs N., Guren T. K., Arkenau H-T., Garcia-Alfonso P., Elez E., Gollerkeri A., Maharry K., Christ-Bittel J., Kopetz S. (2020) Encorafenib Plus Cetuximab as a New Standard of Care for Previously Treated BRAF V600E–Mutant Metastatic Colorectal Cancer: Updated Survival Results and Subgroup Analyses from the BEACON Study. *Journal of Clinical Oncology*. 39: 273-284.
95. Takahashi K., Furukawa C., Takano A., Ishikawa N., Kato T., Hayama S., Zuzuki C., Yasui W., Inai., Sone., Ito., Nishimura H., Tsuchiya E., Nakamura Y., Daigo Y. (2006) The Neuromedin U-Growth Hormone Secretagogue Receptor 1b/Neurotensin Receptor 1 Oncogenic Signaling Pathway as a Therapeutic Target for Lung Cancer. *Cancer Research*. 66 (19): 9408-9419.

96. Tang Y., Hu C. (2021) NMU Is a Poor Prognostic Biomarker in Patients with Lung Adenocarcinoma. *Disease Markers*. 2021: 1-11.
97. Tapial S., Olmedillas-López S., Rueda D., Arriba M., Garcia J. L., Vivas A., Perez J., Pena-Couso L., Olivera R., Rodriguez Y., Garcia-Arranz M., Garcia-Olmo D., González-Sarmiento R., Urioste M., Goel a., Perea J. (2019) Cimp-Positive Status is More Representative in Multiple Colorectal Cancers than in Unique Primary Colorectal Cancers. *Scientific Reports*. 9: 10516-10527.
98. The Cancer Genome Atlas. (2012) Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 487: 330-337.
99. Toiyama Y., Yasuda H., Saigusa S., Tanaka K., Inoue Y., Goel A., Kusunoki M. (2013) Increased expression of Slug and Vimentin as novel predictive biomarkers for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 34 (11): 2548-2557.
100. Tokumaru Y., Yamashita K., Osada M., Nomoto S., Sun D-I., Xiao Y., Hoque M. O., Westra W. H., Califano J. A., Sidransky D. (2004) Inverse Correlation between Cyclin A1 Hypermethylation and p53 Mutation in Head and Neck Cancer Identified by Reversal of Epigenetic Silencing. *Cancer Research*. 64 (17): 5982-5987.
101. Toyota M., Ahuja N., Ohe-Toyota M., Herman J. G., Baylin S. B., Issa J-PJ. (1999) CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*. 6 (3): 120-128.
102. Tzavlaki K., Moustakas A. (2020) TGF- β Signaling. *Biomolecules*. 10: 1-38.
103. Van Cutsem E., Köhne C-H., Hitre, E., Zaluski J., Chien C-R. C., Makhson A., D'Haens G., Pintér T., Lim R., Bodoky G., Roh J. K., Folprecht G., Ruff P., Stroh C., Tejpar S., Schlichting M., Nippgen J., Rougier P. (2009) Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 60: 1408-1417.
104. Van Cutsem E., Yoshino T., Lenz H. J., Lonardi S., Falcone A., Limó M. L., Saunders M., Sobrero A., Park Y. S., Ferreiro R., Hong Y. S., Tomasek J., Taniguchi H., Ciardiello F., Stoehr J., Oum'Hamed Z., Vlassak S., Studeny M., Argiles G. (2018) Nintedanib for the treatment of patients with refractory metastatic colorectal cancer (LUME-Colon 1): a phase III, international, randomized, placebo-controlled study. *Annals of Oncology*. 29: 1955-1963.

105. Viana L. de S., Affonso R. J., Silva S. R. M., Denadai M. V. A., Matos D., Salinas de Souza C., Waisberg J. (2013) Relationship between the Expression of the Extracellular Matrix Genes SPARC, SPP1, FN1, ITGA5 and ITGAV and Clinicopathological Parameters of Tumor Progression and Colorectal Cancer Dissemination. *Oncology*. 84 (2): 81-91.
106. Vu T., Datta P. (2017) Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis. *Cancers*. 9(12): 171-93.
107. Wan M-I., Wang Y., Zeng Z., Deng B., Zhu B., Cao T., Li Y., Xiao J., Han Q., Wu Q. (2020) Colorectal cancer (CRC) as a multifactorial disease and its causal correlations with multiple signaling pathways. *Bioscience Reports*. 40: 1-15.
108. Wang L., Chen C., Li F., Hua Q-Q., Chen S., Xiao B., Dai M., Li M., Zheng A., Yu D., Hu Z. W., Tao Z. (2016) Overexpression of neuromedin U is correlated with regional metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports*. 14 (2): 1075-1082.
109. Wang X., Chen X., Zhou H., Qian Y., Han N., Tian X., Pan L., Li Y. (2019) The Long Noncoding RNA, LINC01555, Promotes Invasion and Metastasis of Colorectal Cancer by Activating the Neuropeptide, Neuromedin U. *Medical Science Monitor*. 25: 4014-4024.
110. Weisenberger D. J., Siegmund K. D., Campan M., Young J., Long T. I., Faasse M. A., Kang G. H., Widschwendter M., Weener M., Buchanan D., Koh H., Simms L., Barker M., Leggett B., Levine J., Kim M., French A. J., Thibodeau S. N., Jass J., Haile R., Larid P. W. (2006) CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nature Genetics*. 38 (7): 787-793.
111. Wieder T., Eigentler T., Brenner E., Rocken M. (2018) Immune checkpoint blockade therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 142: 1403-1414.
112. Wu J., Jiang J., Chen B., Wang K., Tang Y., Liang X. (2020) Plasticity of cancer cell invasion: Patterns and mechanisms. *Translational Oncology*. 14: 1-9.
113. Wu Y., McRoberts K., Berr S. S., Frierson H. F., way M., Theodorescu D. (2007) Neuromedin U is regulated by the metastasis suppressor RhoGDI2 and is a novel promoter of tumor formation, lung metastasis and cancer cachexia. *Oncogene*. 26: 765-773.

114. Xie Y-H., Chen Y-X., Fang J-Y. (2020) Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 5 (1): 22-52.
115. Yamashita K., Upadhyay S., Osada M., Hoque M. O., Xiao Y., Mori M., Sato F., Meltzer S. J., Sidransky D. (2002) Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2 (6): 485-495.
116. Yan X., Yan L., Liu S., Shan Z., Tian Y., Jin Z. (2015) N-cadherin, a novel prognostic biomarker, drives malignant progression of colorectal cancer. *Molecular Medicine Reports*. 12: 2999-3006.
117. Yang X., Wang C. C., Lee W. Y. W., Trovik J., Chung T. K. H., Kwong J. (2018) Long non-coding RNA HAND2-AS1 inhibits invasion and metastasis in endometrioid endometrial carcinoma through inactivating neuromedin U. *Cancer Letters*. 413: 23-34.
118. Ye Y., Liang Z., Xue L. (2020) Neuromedin U: potential roles in immunity and inflammation. *Immunology*. 162: 17-29.
119. Yoshimura K., Meckel K. F., Laird L. S., Chia C. Y., Park J-J., Olino K. L., Tsunedomi R., Harada T., Iizuka N., Hazama S., Kato Y., Keller J. W., Thompson J. M., Chang F., Romer L. H., Jain A., Iacobuzio-Donahue C., Oka M., Pardoll D. M., Schlick R. D. (2009) Integrin $\alpha 2$ Mediates Selective Metastasis to the Liver. *Cancer Research*. 69 (18): 7320-7328.
120. You S., Gao L. (2018) Identification of NMU as a potential gene conferring alectinib resistance in non-small cell lung cancer based on bioinformatics analyses. *Gene*. 678: 137-42.
121. Yu M., Chu S., Fei B., Fang X., Liu Z. (2019) O-GlcNAcylation of ITGA5 facilitates the occurrence and development of colorectal cancer. *Experimental Cell Research*. 382 (2): 111464-111474.
122. Zhang J-J., Hong J., Ma Y-S., Shi Y., Zhang D-D., Yang X-L., Jia C-Y., Yin J-Z., Jiang G-X., Fu D., Yu F. (2021a)
123. Zhang N., Ng A. S., Cai S., Li Q., Yang L., Kerr D. (2021b) Novel therapeutic strategies: targeting epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *The Lancet Oncology*. 22: 358-369.

124. Zhang S., Wang Q., Han Q., Han. H., Lu P. (2019) Identification and analysis of genes associated with papillary thyroid carcinoma by bioinformatics methods. *Bioscience Report*. 39: 1-8.
125. Zhang Z., Zheng S., Lin Y., Sun J., Ding N., Chen J., Zhong J., Shi L., Xue M. (2020) Genomics and prognosis analysis of epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 20 (1): 1135-1142
126. Zyśk L. R. (2014) Colorectal cancer - the social significance of changes in the epidemiology and treatment options in Poland. *Onkologia w praktyce klinicznej*. 10 (4): 212-223.

10. Alfabetyczny wykaz skrótów umieszczony w pracy

5-FU – 5-fluorouracyl; ang. *5-Fluorouracil*,
AA – kwas arachidonowy; ang. *Arachidonic Acid*,
Ab – ang. *Antibody*,
AC – cyklaza adenylowa; ang. *Adenylate Cyclase*,
AKT – ang. PKB, *Protein Kinase B*;
ALCAM – ang. *Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule*,
AMER1 – ang. *APC Membrane Recruitment Protein 1*,
AMPK – nazwa szlaku sygnałowego,
APC – ang. *Adenomatous Polyposis Coli*,
ARID1A – ang. *AT-rich Interaction Domain 1A*,
ATCC – Amerykańska Kolekcja Kultur Komórkowych; ang. *American Type Culture Collection*,
ATM – ang. *ATM Serine/Threonine Kinase*,
B7 – nazwa białka,
BAX – ang. *BCL2 Associated X Protein*,
BL – bufor lizujący,
BMP – ang. *Bone Morphogenetic Protein*,
BMP/SMAD – nazwa szlaku sygnałowego,
BRAF – ang. *B-Raf Proto-Oncogene*,
BSA – albumina surowicy bydlęcej; ang. *Bovine Serum Albumin*,
Ca²⁺ – jony wapnia,
CAE – antygen rakowo-płodowy surowicy; ang. *Serum Carcinoembryonic Antygen*,
CAFs – ang. *Cancer-associated Fibroblasts*,
cAMP – cykliczny adenozy-no-3',5'-monofosforan; ang. *cyclic Adenosine Monophosphate*,
CAR – ang. *Chimeric Antigen Receptor*,
CAR-T – ang. *Chimeric Antigen Receptor-T*,
CD4+ – nazwa limfocytów,
CD8+ – nazwa limfocytów,
CD80 – nazwa białka,
CD133 – and. *Prominin 1*,
CDC42 – ang. *Cell Division Control Protein 42*,
CDKN2A – ang. *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*,
CIMP – metylator wysp CpG; ang. *CpG Island Methylator Phenotype*,

CIN – niestabilność chromosomowa; ang. *Chromosomal Instability*,
c-MET – ang. *Tyrosine-Protein Kinase Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor*,
CMS – ang. *Consensus Molecular Subtypes*,
CRB3 – ang. *Crumbs Homolog 3*,
CTLA4 – ang. *Cytotoxic T Cell Antigen 4*,
DAG – 1,2-diacylglicerol; ang. *Diacylglycerol*,
DMEM – medium wzrostowe; ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*,
DPBS – buforowana fosforanem sól fizjologiczna wg Modyfikacji Dulbecco's; ang. *Dulbecco's Phosphate-buffered Saline*,
DR5 – ludzki receptor śmierci 5; ang. *Death Receptor 5*,
EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy; ang. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*,
EGF – naskórkowy czynnik wzrostu; ang. *Epidermal Growth Factor*,
EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu; ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*,
EMT – przejście epithelialno-mezenchymalne; ang. *Epithelial-to-Mesenchymal Transition*,
ErbB – ang. *Erythroblastosis Oncogene B*,
ERK1/2 – ang. *Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2*,
ESCC – rak płaskonabłonkowy przełyku; ang. *Esophageal Squamous Cell Carcinoma*,
EXO1 – ang. *Exonuclease 1*,
FAK/Src – nazwa ścieżki sygnałowej,
FAM123B – AMER1, ang. *APC Membrane Recruitment Protein 1*,
FAP – rodzinna polipowatość gruczolakowata; ang. *Familial Adenomatous Polyposis*,
FBS – bydlęca surowica płodowa; ang. *Fetal Bovine Serum*,
FDA – ang. *Food and Drug Administration*,
FGFR – ang. *Fibroblast Growth Factor Receptor*,
FGFR1 – ang. *Fibroblast Growth Factor Receptor 1*,
FGFR2 – ang. *Fibroblast Growth Factor Receptor 2*,
FGFR3 – ang. *Fibroblast Growth Factor Receptor 3*,
FIT – immunochemiczne badanie kału; ang. *Fecal Immunochemical Test*,
FIT-DNA – genetyczno-immunochemiczne badanie kału; ang. *Multitarget Stool DNA Testing*,
FLT3 – ang. *FMS-like Tyrosine Kinase 3*,
FOBT – badanie kału na krew utajoną; ang. *Fecal Occult Blood Test*,
FOLFIRI – folinian wapnia i irynotekanu,
FOLFOX – folinian wapnia i oksaliplatyny,
G9a – metylotransferaza,

GAPDH – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego; ang. *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*,

GHSR – receptor wydzielania hormonu wzrostu; ang. *Growth Hormone Secretagogue Receptor*,

GPCR – ang. *G-Protein Coupled Receptor*,

H3K4 – ang. *Histone H3 Lysine K4*,

H3K9 – ang. *Histone H3 Lysine K9*,

H3K27 – ang. *Histone H3 Lysine K27*,

HDACs – deacetylazy histonowe; ang. *Histone Deacetylases*,

Hedgehog – nazwa ścieżki sygnałowej,

HER – ang. *Human Epidermal Growth Factor Receptor*,

HER1 – ang. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 1*,

HER2 – ang. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*,

HER3 – ang. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 3*,

HER4 – ang. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 4*,

HGF – czynnik wzrostu hepatocytów; ang. *Hepatocyte Growth Factor*,

HGFR – c-MET, ang. *Hepatocyte Growth Factor Receptor*,

HOXB9 – ang. *Homeobox B9*,

HRP – peroksydaza chrzanowa; ang. *Horseradish Peroxidase*,

IBD – przewlekłe nieswoiste zapalenie jelit; ang. *Inflammatory Bowel Disease*,

IGF2 – ang. *Insulin-like Growth Factor 2*,

IGFR – insulinopodobny czynnik wzrostu 1; ang. *Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*,

IgG1 – ang. *Immunoglobulin G1*,

IgG2 – ang. *Immunoglobulin G2*,

IgG4 – ang. *Immunoglobulin G4*,

IP3 – trifosforan 1,4,5-inozytolu; ang. *1,4,5-Inositol trisPhosphate 3*,

JNK – ang. *c-Jun N-terminal Kinases*,

KRAS – ang. *KRAS Proto-Oncogene*,

LAMC2 – ang. *Laminin Subunit Gamma 2*,

LGL2 – ang. *Lethal Giant Larvae 2*,

LOH – utrata heterozygotyczności; ang. *Loss Of Heterozygosity*,

LSD1 – ang. *Lysine-Specific Demethylase 1*,

M – przerzut; ang. *Metastases*,

MAPK/ERK – nazwa szlaku sygnałowego,

MEK – ang. *Mitogen-activated Protein Kinase Kinase*,

MEM – medium wzrostowe; ang. *Minimum Essential Medium*,
MFI – ang. *median fluorescence intensity*,
MET – przejście mezenchymalno-epiteliane; ang. *Mesenchymal-to-Epithelial Transition*,
Mg²⁺ – jony magnezu,
MGMT – metylotransferaza O-6-metyloguaniny-DNA; ang. *O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase*,
MLH1 – ang. *MutL Homolog 1*,
MLH3 – ang. *MutL Homolog 3*,
MMP1 – ang. *Matrix MetalloPeptidase 1*,
MMP9 – ang. *Matrix MetalloPeptidase 9*,
MMR – naprawa źle sparowanych zasad DNA; ang. *DNA Mismatch Repair*,
MRGPRX2 – ang. *Mas-Related G Protein-Coupled Receptor-X*,
MSH2 – ang. *MutS Homolog 2*,
MSH3 – ang. *MutS Homolog 3*,
MSH6 – ang. *MutS Homolog 6*,
MSI – niestabilność mikrosatelitarna; ang. *MicroSatellite Instability*,
MT1-MMP – ang. *Membrane-type 1 Matrix Metalloproteinase*,
mTOR – nazwa szlaku sygnałowego; ang. *Mammalian Target of Rapamycin*,
N – węzeł chłonny; ang. Nodal,
NCAM – ang. *Neural Cell Adhesion Molecule 1*,
NF-κB – nazwa szlaku sygnałowego,
NK – ang. *Natural Killer*,
NKG2D – ang. *Natural Killer Group 2 Member D*,
NKG2DL – ang. *NKG2D Ligand*,
NMU – neuromedyna U; ang. *Neuromedin U*,
NMUR1 – receptor 1 neuromedyny U; ang. *Neuromedin U Receptor 1*,
NMUR2 – receptor 2 neuromedyny U; ang. *Neuromedin U Receptor 2*,
NMUR2S – ang. *Neuromedin U Receptor 2S*,
Notch – nazwa ścieżki sygnałowej,
NRAS – ang. *Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog*,
nRTK – niereceptorowe kinazy tyrozynowe; ang. *non-Receptor Tyrosine Kinases*,
NTSR1 – ang. *Neurotensin Receptor 1*,
NURP – peptyd prekursorowy NMU; ang. *Neuromedin U Precursor Related Peptide*,
OS – czas całkowitego przeżycia; ang. *Overall Survival*,

OUN – ośrodkowy układ nerwowy,
PBS – buforowana fosforanem sól fizjologiczna; ang. *Phosphate Buffered Saline*,
PD-1 – ang. *Programmed Cell Death Protein 1*,
PD-L1 – ang. *Programmed Death Ligand 1*,
PDGFR – receptor płytkochłonnego czynnika wzrostu; ang. *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*,
PFS – czas wolny od progresji; ang. *Progression-Free Survival*,
PI3K/AKT – nazwa szlaku sygnałowego,
PIGF – ang. *Placental Growth Factor*,
PIK3CA – ang. *PI3K Catalytic Subunit-α*,
PKA – kinaza białkowa A; ang. *Protein Kinase A*,
PLA2 – fosfolipaza A2; ang. *Phospholipase A2*,
PLC – fosfolipaza C; ang. *PhosphoLipase C*,
PLP2 – ang. *Proteolipid Protein 2*,
PMA – 12-mirystynian 13-octan forbolu, ang. *Phorbol 12-Myristate-13-Acetate*,
PMS1 – ang. *PMS Homolog 1*,
PMS2 – ang. *PMS Homolog 2*,
PTEN – ang. *Phosphatase And Tensin Homolog*,
Rac1 – ang. *Rac Family Small GTPase 1*,
Rab11 – nazwa białka,
RAS – ang. *Rat Sarcoma Virus*,
RAF – ang. *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*,
RET – ang. *Receptor Tyrosine-protein Kinase*,
RhoA – ang. *Ras Homolog Family Member A*,
RIPA – ang. *Radioimmunoprecipitation Assay Buffer*,
RJG – rak jelita grubego,
ROCK – ang. *Rho-associated Protein Kinase*,
RPMI1640 – medium wzrostowe; ang. *Roswell Park Memorial Institute*,
RTK – receptorowe kinazy tyrozynowe; ang. *Receptor Tyrosine Kinase*,
RT-PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym; ang. *Real-Time PCR*,
SMAD4 – ang. *SMAD Family Member 4*,
SNAI1 – ang. *Snail Family Transcriptional Repressor 1*,
SNAI2 – ang. *Snail Family Transcriptional Repressor 2*,
SOX9 – ang. *SRY-Box Transcription Factor 9*,

STAT3 – ang. *Signal Transducer And Activator Of Transcription 3*,
STR – krótkie powtórzenia tandemowe; ang. *Short Tandem Repeats*,
SUV39H – ang. *SUV39H1 Histone Lysine Methyltransferase*,
T – guz; ang. *Tumor*,
TAL1 – ang. *TAL BHLH Transcription Factor 1, Erythroid Differentiation Factor*,
TBS – roztwór soli fizjologicznej buforowany TRIS-em; ang. *Tris Buffered Saline*,
TCF4 – ang. *Transcription Factor 4*,
TCGA – ang. *The Cancer Genome Atlas*,
TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β ; ang. *Transforming Growth Factor- β* ,
TGF- β II – ang. *Transforming Growth Factor- β II*,
TGF- β R2 – ang. *Transforming Growth Factor β -Receptor II*,
TM4SF5 – ang. *Transmembrane 4 L Six Family Member 5*,
TNM – ang. *Tumor-Node-Metastases Classification*,
TP53 – ang. *Tumor Protein P53*,
TWIST1 – ang. *Twist Family BHLH Transcription Factor 1*,
TWIST2 – ang. *Twist Family BHLH Transcription Factor 2*,
VEGF – czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego; ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*,
VEGF-A – ang. *Vascular Endothelial Growth Factor A*,
VEGF-B – ang. *Vascular Endothelial Growth Factor B*,
VEGF-C – ang. *Vascular Endothelial Growth Factor C*,
VEGF-D – ang. *Vascular Endothelial Growth Factor D*,
VEGFR – receptor czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego; ang. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*,
VEGFR1 – ang. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1*,
VEGFR2 – ang. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*,
VEGFR3 – ang. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3*,
Wnt – nazwa ścieżki sygnałowej; ang. *Wnt/ β -catenin Pathway*,
ZEB1 – ang. *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*,
ZEB2 – ang. *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2*,
ZO-1 – ang. *Zonula Occludens-1*.

11. Chronologiczny wykaz rycin umieszczonych w pracy

	str.
Rycina 1. Model powstawania RJG (na podstawie: Malki i wsp. 2020).....	2
Rycina 2. Schemat powstania przerzutów w RJG (Cao i wsp. 2015, Pretzsch i wsp. 2019)	5
Rycina 3. Schemat aktywacji szlaków sygnałowych przez NMU (na podstawie: Przygodzka i wsp. 2019)	29
Rycina 4. Poziom ekspresji <i>NMU</i> w linii kontrolnej oraz w 6 liniach RJG	53
Rycina 5. Detekcja NMU w lizatach komórkowych linii kontrolnej oraz 6 linii RJG	54
Rycina 6. Reprezentatywny obraz poziomu NMU wydzielonego do medium pochodowlanego przez linię kontrolną oraz 6 linii komórkowych RJG oznaczony metodą Western immunoblotting poprzedzoną immunoprecypitacją NMU.....	55
Rycina 7. Reprezentatywny obraz poziomu NMU (A) oraz białek markerowych (B) w mikropęcherzykach zewnątrzkomórkowych izolowanych z medium hodowlanego znad linii komórkowej HCT116 oznaczony metodą Western immunoblotting.....	56
Rycina 8. Poziom ekspresji <i>NMUR1</i> (A), <i>NMUR2</i> (B), <i>NTSR1</i> (C) oraz <i>GHSR1b</i> (D) w linii kontrolnej oraz w 6 liniach RJG.....	58
Rycina 9. Poziom ekspresji <i>NMUR1</i> (A) oraz <i>NMUR2</i> (B) po zastosowaniu inhibitora metylacji DNA (5-Aza-Cdr)	60
Rycina 10. Mobilizacja jonów Ca^{2+} w wyniku aktywacji receptorów NMU.....	62
Rycina 11. Aktywacja szlaku kinaz białkowych $ERK_{1/2}$ w linii komórkowej Caco-2 traktowanej agonistą receptora NMUR2 (SBL-NMU-17).....	63
Rycina 12. Obecność białka NMU w subliniach HT29 oraz Caco-2.....	65
Rycina 13. Detekcja białka NMU w medium pochodowlanym znad sublinii HT29 oraz Caco-2.....	66
Rycina 14. Zdolność do formowania kolonii przez sublinie HT29 (A) oraz Caco-2 (B)...	68
Rycina 15. Zdolności migracyjne komórek sublinii HT29 (A) oraz Caco-2 (C)...	69
Rycina 16. Zdolności inwazyjne komórek sublinii HT29 (A) oraz Caco-2 (C)....	70
Rycina 17. Aktywacja szlaku kinaz białkowych $ERK_{1/2}$ w subliniach Caco-2 traktowanych inhibitorem PD98059.....	71
Rycina 18. Wpływ inhibitora PD98059 na zdolności migracyjne komórek sublinii Caco-2 (A).....	72
Rycina 19. Ocena poziomu powierzchniowych podjednostek integrynowych w subliniach HT29 (A) oraz Caco-2 (B).....	73

12. Chronologiczny wykaz tabel umieszczonych w pracy

	str.
Tabela 1. Szlaki sygnałowe zaangażowanych w rozwój i progresję RJG	7
Tabela 2. Proces transkrypcji i translacji NMU.....	25
Tabela 3. Charakterystyka linii raka jelita grubego.....	33
Tabela 4. Podłoża (media) stosowane w hodowli linii komórkowych.....	39
Tabela 5. Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji.....	42
Tabela 6. Sondy TaqMan oraz pary starterów wykorzystane podczas reakcji PCR w czasie rzeczywistym.....	43
Tabela 7. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym z użyciem sondy TaqMan...	44
Tabela 8. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym z użyciem zaprojektowanych starterów.....	44
Tabela 9. Skład <i>Halt Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail</i>	45
Tabela 10. Przeciwciała wykorzystane podczas Western immunoblotting.....	47
Tabela 11. Przeciwciała wykorzystane do oceny ekspresji powierzchniowej podjednostek integrynowych.....	52