

Warszawa, dnia 23 czerwca 2020 r.

Mgr inż. Anna Sobiepanek

Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków
Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

Streszczenie rozprawy doktorskiej
**„Zastosowanie metod bezznacznikowych
w diagnostyce i prognostyce czerniaka”**

Promotor: dr hab. inż. Tomasz Kobiela, prof. uczelni

Promotor pomocniczny: dr Małgorzata Milner-Krawczyk

Czerniak jest nowotworem złośliwym, który rozwija się z komórek barwnikowych skóry (melanocytów) odpowiedzialnych za produkcję melaniny. Jej zadaniem jest ochrona skóry przed promieniowaniem słonecznym czyli głównym czynnikiem ryzyka powodującym rozwój tego nowotworu. Biorąc pod uwagę, że czerniak szybko zyskuje zdolność do przerzutów i nie opracowano do tej pory skutecznego leczenia jego zaawansowanej postaci, nowe narzędzia diagnostyczne i prognostyczne znajdują się w centrum badań. Szczególnie istotna jest analiza ilościowa oceny prawdopodobieństwa wystąpienia czerniaka oraz jego przerzutów, co jest zależne od subiektywnej oceny histopatologa. Obecnie szeroko wprowadzane i stosowane są metody bezznacznikowe, które umożliwiają badanie materiału biologicznego, w tym analizę żywych komórek oraz tkanek. Opracowanie wiarygodnego systemu pomiarowego z poprawnie zdefiniowanymi interakcjami pomiędzy molekułami stanowi duże wyzwanie. Zatem szczegółowa wiedza na temat właściwości komórek normalnych, komórek z pierwotnych ognisk nowotworu oraz agresywnych komórek z przerzutów może pomóc w opracowywaniu nowych metod diagnostycznych i prognostycznych.

Zastosowanie rozpoznanych strukturalnych elementów komórki jako biomarkerów umożliwia opracowanie takich metod. W prezentowanej pracy głównym obiektem badań są glikany obecne na błonie komórkowej. Podczas progresji nowotworu komórki nieinwazyjne podlegają transformacji do komórek tworzących przerzuty w wyniku procesu nazwanego tranzycją epitelialno-mezenchymalną. Towarzyszą mu zmiany profilu glikozylacji wielu białek błony komórkowej, które odpowiadają za przyczepność, proliferację i migrację komórek. Do identyfikacji specyficznych reszt sacharydowych stosowane są lektyny różnego pochodzenia. Wykorzystanie wysoce specyficznych oddziaływań występujących pomiędzy lektynami i

glikanami na komórkach do badań wykonanych za pomocą metod bezznacznikowych może posłużyć do zaprojektowania nowych narzędzi diagnostycznych jak i terapeutycznych.

Celem pracy było (1) opracowanie metod rozróżniania komórek z kolejnych etapów progresji czerniaka na podstawie zmian w ich profilu glikozylacji wykorzystując w tym celu metody bezznacznikowe; (2) sprawdzenie, czy opracowana metodyka umożliwi prawidłową klasyfikację komórek wyizolowanych od pacjentów z potwierdzonymi przerzutami czerniaka oraz (3) badanie zmian w profilu glikozylacji komórek czerniaka pod wpływem wybranego związku biologicznie czynnego (endokannabinoid Anandamid) jako potencjalnego czynnika terapeutycznego.

W przeglądzie literatury przedstawiono ogólną charakterystykę czerniaka, która obejmuje jego opisane podtypy, epidemiologię, czynniki ryzyka, diagnostykę oraz przebieg leczenia. Scharakteryzowano najczęściej używane modele badawcze czerniaka wraz z danymi dotyczącymi opracowania tych modeli. Przedstawiono obecnie najczęściej używane metody stosowane do badania chorób nowotworowych uwzględniając wykorzystanie zarówno metod znacznikowych jak i bezznacznikowych. Ponadto opisano mechanizm procesu glikozylacji oraz funkcje układu endokannabinoidowego w komórkach, który jest obecnie uważany za potencjalny cel terapeutyczny przy chorobach nowotworowych.

Część badawcza pracy została podzielona na trzy części. W pierwszym rozdziale wyników przeprowadzono charakterystykę komercyjnych linii komórkowych wykorzystywanych jako modele do badań nad czerniakiem. Analizowano takie parametry jak szybkość wzrostu komórek, ich morfologię oraz właściwości mechaniczne za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM). Pierwszą podjętą próbą odróżnienia komórek czerniaka z różnych faz jego wzrostu było przeprowadzenie analizy za pomocą lektynoblottingu. Do badań wybrano lektynę Konkanawalinę A (Con A), która ma wysokie powinowactwo do mannozy i glukozy. Aby obserwować oddziaływanie pomiędzy lektyną i glikanami na komórkach w czasie rzeczywistym wykorzystano mikrowagę kwarcową z funkcją śledzenia dyssypacji energii (QCM-D). Zastosowano dwa typy pomiarów: komórki hodowane na sensorach (*ang. cell-based sensors*) oraz komórki w zawiesinie (*ang. suspension cell-based sensors*). Dla obu typów pomiarów określono najpierw kluczowe parametry mogące znacząco wpłynąć na analizowane wiązanie się lektyny do glikanów obecnych na komórkach i wybrano najlepsze parametry pomiarowe. Badania oddziaływania lektyn z glikanami na komórkach przeprowadzono dla 7 komercyjnych linii komórkowych, w tym na komórkach prawidłowych (melanocytach HEMa-LP), komórkach z poziomej fazy wzrostu czerniaka (WM35) oraz z pionowej fazy wzrostu czerniaka (WM115) jak również na komórkach metastatycznych

(WM266-4, MeWo, A375-P i G-361). Następnie przeprowadzono badania wykorzystujące opracowane procedury badawcze za pomocą QCM-D. Komórki z różnych stadiów czerniaka można było rozróżnić na podstawie obliczonego powinowactwa lektyny do glikanów obecnych na komórkach, a także nowo zdefiniowanego parametru VI (*ang. viscoelastic index*). Lektyna Con A wykazywała większe powinowactwo do glikanów obecnych na komórkach metastatycznych niż do glikanów komórek prawidłowych oraz komórek z poszczególnych faz wzrostu czerniaka. Parametr VI opisuje właściwości lepkościowe utworzonych kompleksów lektyna-glikan na komórkach i może wykazywać zmiany zachodzące w tym oddziaływaniu. Wartość VI uzyskano z surowych danych pomiarowych, które otrzymuje się poprzez przygotowanie zależności dyssypacji energii w funkcji częstotliwości rezonansowej (popularnie nazywane wykresami Df). Obliczenie wartości bezwzględnej dla nachylenia otrzymanej krzywej umożliwia podanie wartości parametru VI. Dzięki tym prostym obliczeniom rozróżniono wszystkie typy komórek (komórki prawidłowe, z fazy poziomej i pionowej oraz o dużym potencjale przerzutowym). Do porównania wyników wykorzystano również kilka innych technik badawczych takich jak: zmodyfikowany test ELISA z użyciem lektyny, mikrotermoforeza oraz pomiary za pomocą mikroskopu AFM, gdzie lektyna została wcześniej przyczepiona do ostrza. Wszystkie zebrane wyniki potwierdziły możliwość odróżnienia komórek czerniaka z różnych faz jego wzrostu, przy wykorzystywaniu do badań oddziaływań lektyn z glikanami obecnymi na powierzchni tych komórek. Co więcej, ustalona procedura badawcza wykorzystująca komórki w zawieszynie pozwalała na znacznie szybszą analizę tego oddziaływania. Pomimo ograniczonej liczby analizowanych linii komórkowych otrzymane wyniki wskazują, że wartość parametru VI oraz powinowactwo, można wykorzystać jako czynniki prognostyczne dla przebiegu czerniaka.

W drugim rozdziale wyników opisano sposób praktycznej weryfikacji metody opracowanej w rozdziale pierwszym wyników, w której komórki miały być wcześniej wysiewane na sensorze. Przystąpiono do optymalizacji procesu izolacji komórek od pacjentów z potwierdzonym przerzutem czerniaka. W tym celu nawiązano współpracę z naukowcami z Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego i uzyskano odpowiednią zgodę od Lokalnej Komisji Bioetycznej. Wykorzystując nową procedurę nieenzymatycznej izolacji komórek wyprowadzono pięć linii komórkowych z dwóch otrzymanych węzłów chłonnych (biopsja 1 - komórki M1, M7, M16 i M28; biopsja 2 - M9). Wyizolowane komórki na początku scharakteryzowano pod kątem ich szybkości wzrostu, morfologii oraz właściwości mechanicznych. Potwierdzono występowanie markerów typowych dla czerniaka we wszystkich założonych liniach komórkowych za pomocą barwienia

immunohistochemicznego (S-100 i HMB-45) i analizy qPCR (*MLANA*). Następnie przeprowadzono analizę oddziaływania lektyny z glikanami obecnymi na powierzchni komórek za pomocą pomiarów QCM-D, a wyniki potwierdzono za pomocą zmodyfikowanego testu ELISA z wykorzystaniem lektyny. Otrzymane wyniki potwierdziły użyteczność opracowanej procedury. Jednocześnie obserwowane różnice w wartościach VI i powinowactwa wykazały, że wyizolowane komórki mogą mieć różny potencjał przerzutowy (niski lub wysoki), co potwierdzają też wyraźne różnice w szybkości wzrostu tych komórek. Dzięki potwierdzeniu stosowalności procedury na komórkach pobranych od pacjentów, może ona być w przyszłości polecana do praktycznego wykorzystania jako dodatkowa procedura badawcza w diagnostyce i prognozowaniu rokowań dla pacjentów.

W ostatnim rozdziale wyników skupiłam się na próbie modyfikacji profilu glikozylacji komórek czerniaka w wyniku zastosowania związku o potencjalnej użyteczności w leczeniu nowotworów. Anandamid (AEA) został wybrany jako związek mający różnorodne działanie na komórki, w tym zaburzenia w pobieraniu glukozy i hamowanie szybkości migracji komórek. Wpływ AEA na profil glikozylacji komórek nie został dotychczas opisany. Potwierdzono działanie tego związku (dodanego w DMSO jako rozpuszczalniku) na badane komercyjne linie komórkowe czerniaka za pomocą testu MTT, barwienia komórek oraz pomiarów właściwości mechanicznych. Wybrano stężenie 1 μ M anandamidu którym potraktowano komórki, a następnie zbadano oddziaływanie lektyny z glikanami na powierzchni tych komórek. Wyniki uzyskane za pomocą metody QCM-D sugerują, że traktowanie komórek metastatycznych anandamidem może powodować zmiany w ich profilu glikozylacji. Aby potwierdzić ten wynik zbadano również szybkość migracji komórek po traktowaniu AEA oraz analizowano czy traktowanie komórek anandamidem może zmieniać ekspresję genów kodujących kluczowe enzymy szlaku biosyntezy glikanów (*GFAT-1* i *DMPI*). Otrzymane wyniki były spójne z tymi uzyskanymi z pomiarów przeprowadzonych za pomocą metody QCM-D.

Podsumowując, opracowano dwie procedury pomiarowe wykorzystujące komórki wysiane na sensorach oraz komórki w zawiesinie. Obie procedury pozwoliły na rozróżnienie komórek z różnych faz wzrostu czerniaka (melanocyty, komórki z poziomej i pionowej fazy wzrostu oraz komórki przerzutowe) za pomocą badania oddziaływania lektyny i glikanów znajdujących się na tych komórkach. Wyniki zostały potwierdzone za pomocą kilku innych metod badawczych. Ponadto analizowane parametry (wartość parametru VI oraz powinowactwo) mogą być obiecującymi nowymi czynnikami prognostycznymi czerniaka. Ustalony model badawczy został zweryfikowany przy użyciu komórek izolowanych od pacjentów z potwierdzonym przerzutem. Dodatkowo zmiana profilu glikozylacji komórek

metastatycznych traktowanych badanym związkiem aktywnym została zaobserwowana za pomocą opracowanej procedury badawczej (badanie QCM-D), a następnie potwierdzona z wykorzystaniem testu na migrację komórek oraz poprzez analizę ekspresji wybranych genów. Wyniki prezentowane w niniejszej pracy pokazują, że opracowany model badawczy wykorzystujący techniki bezznacznikowe do pomiaru oddziaływania lektyn z glikanami na powierzchni komórek, może potencjalnie stać się nowym narzędziem diagnostycznym i prognostycznym.

Słowa kluczowe:

czerniak, izolacja komórek, profil glikozylacji, lektyny, QCM-D, endokannabinoidy