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

Streszczenie

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

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

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

Założoną hipotezę zweryfikowano poprzez realizację kolejnych badań przeprowadzonych z wykorzystaniem:

- metody reakcji PCR w czasie rzeczywistym do oceny ekspresji genów;
- metod Western Immunoblotting do oceny poziomu wewnątrzkomórkowych białek, barwienia immunofluorescencyjnego do wizualizacji receptorów oraz immunoprecypitacji i Western Immuboblotting do oceny poziomu białek wydzielonych;
- nukleofekcji oraz selekcji klonalnej do otrzymania klonów HT29 ze stabilną nadekspresją NMU;
- komercyjnego zestawu Proteome Profiler do oceny poziomu wydzielonych cytokin;
- cytometrii przepływowej do oceny poziomu markerów różnicowania i polaryzacji makrofagów;
- testu migracji przez membranę lub testu zarastania rysy do oceny szybkości migracji komórek;
- testu tworzenia struktur pseudokapilarnych przez komórki śródbłonka na sztucznej macierzy zewnątrzkomórkowej Matrigel.

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

Badania możliwości oddziaływania NMU na komórki modelowe makrofagów potencjalnie obecnych w mikrośrodowisku RJG pozwoliły na stwierdzenie braku ekspresji *NMU* oraz obecności jednego rodzaju receptora dla NMU (*NMUR1*), którego ekspresję na najwyższym poziomie obserwowano w niespolaryzowanych makrofagach. Obserwacja aktywacji ścieżki sygnałowej MAPK wyrażonej przez zwiększenie fosforylacji kinaz ERK 1/2 potwierdziła również aktywność receptorów w tych komórkach. Na podstawie analizy efektów działania NMU na makrofagi stwierdzono, że promuje ona zmianę fenotypu makrofagów

w pronowotworowy fenotyp M2. NMU działała również chemotaktycznie względem makrofagów, a także zwiększała ich zdolności migracyjne i wpływała na profil cytokin wydzielanych przez te komórki (poprzez zwiększenie wydzielania CCL-2 i CXCL-12). Dodatkowo stwierdzono stymulujący wpływ medium znad makrofagów traktowanych NMU na migrację komórek RJG.

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

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

Łódź, dn. 21.01.2022 r.

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

Abstract

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

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

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

The abovementioned hypothesis was verified by the following methods:

- real-time PCR for assessing gene expression;
- Western Immunoblotting to assess the level of intracellular proteins, immunofluorescence staining for the visualization of receptors and immunoprecipitation and Western Immunoblotting to assess the level of secreted proteins;

- nucleofection and clonal selection to obtain HT29 clones with stable NMU overexpression;
- a Proteome Profiler analysis for the assessment of the secreted cytokines levels;
- flow cytometry to assess the level macrophage differentiation and polarization markers;
- a transmembrane migration test or a wound-healing assay to evaluate the cell migration rate;
- endothelial tube formation assay on an artificial extracellular matrix, Matrigel.

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

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

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

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

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

Łódź, dn. 21.01.2021 Sobaska