

Aleksandra Makowiecka „Wpływ żelsoliny i tymozyny $\beta 4$ na inwazyjność komórek czerniaka”.

Leczenie nowotworów a stanowi jedno z największych wyzwań współczesnej medycyny. Do najlepiej przebadanych należą nowotwory wywodzące się z nabłonka, takie jak nowotwory piersi czy płuc. W przeciwieństwie do nich komórki czerniaka to transformowane nowotworowo melanocyty pochodzenia neuroektodermalnego. Z tego powodu biologia czerniaka różni się od nowotworów pochodzenia epitelialnego, a mechanizmy stojące za jego rozprzestrzenianiem oraz agresywnością pozostają w dalszym ciągu nie w pełni wyjaśnione. Porównując ze sobą dwie linie komórkowe czerniaka, wywodzące się z guza o wzroście wertykalnym, zaobserwowano pomiędzy nimi istotne różnice w inwazyjności, czyli zdolności do zainicjowania powstania wtórnego ogniska chorobowego. Komórki badanych linii WM1341D i A375, różniły się zdolnością do ruchu zarówno na podłożu jak i w macierzy 3D, adhezją, elastycznością, stopniem zaawansowania przejścia epitelialno-mezenchymalnego oraz przejawianymi cechami nowotworowych komórek macierzystych. W każdym z tych procesów znaczącą rolę odgrywa cytoskielet aktynowy oraz szereg białek wiążących aktynę, które kontrolują dynamikę polimeryzacji. W badanych liniach komórkowych zaobserwowano wyraźne różnice w poziomie dwóch białek z tej grupy tj. żelsoliny (GSN) i tymozyny $\beta 4$ (T $\beta 4$). Poczynione obserwację nasunęły pytanie o ich rolę w inwazyjności komórek czerniaka.

W celu odpowiedzi na to pytanie zastosowano różnorodne techniki m.in. mikroskopowe, analizy ruchu oraz biologii molekularnej. W przypadku żelsoliny, było to dokonanie uszkodzenia kodującego ją genu z zastosowaniem techniki CRISPR-Cas9 (D10A). W komórkach pozbawionych żelsoliny zaobserwowano obniżenie zdolności do ruchu po podłożu oraz w środowisku 3D. Dodatkowo charakteryzowały się one gorszą adhezją zarówno do nieopłaszczonej powierzchni, jak i tej opłaszczonej białkami macierzy pozakomórkowej. Wykazano również obecność GSN w strukturach adhezyjnych, nie będących klasycznymi ogniskami adhezyjnymi. Zaobserwowano, że tworzy ona kompleksy z takimi białkami zaangażowanymi w adhezję komórek jak: winkulina, integryna $\beta 1$ oraz kinazy ILK i FAK. Dodatkowo komórki pozbawione żelsoliny odznaczały się wzrostem zdolności do formowania kolonii w agarze, jak również zwiększeniem poziomu białek związanych z macierzystością.

W przypadku eksperymentów zmierzających do określenia funkcji tymozyny $\beta 4$ w progresji czerniaka, posłużono się techniką interferencyjnego RNA w celu obniżenia poziomu ekspresji genu *TMBSX4*. W uzyskanych w ten sposób stabilnych klonach zaobserwowano zwiększenie zdolności do formowania ognisk adhezyjnych (FA). Wykazano, że T $\beta 4$ jest składową tych struktur, bowiem kolokalizuje z białkami markerowymi dla FA – winkuliną, integryną $\alpha V\beta 3$ oraz dodatkowo z kinazami ILK oraz FAK. Komórki o obniżonym poziomie T $\beta 4$ przejawiały ponadto zmiany w oddziaływaniu z podłożem. Charakteryzowały się one zwiększeniem zdolności migracyjnych oraz adhezyjnych do podłoża imitującego błonę podstawną. Za pomocą obrazowania z zastosowaniem mikroskopii sił atomowych wykazano w tych komórkach różnice zarówno w topografii powierzchni jak i ich wysokości. Poziom tymozyny $\beta 4$ korelował również ze stopniem zaawansowania przejścia epithelialno-mezenchymalnego w komórkach czerniaka. Zaobserwowano spadek poziomu dwóch białek markerowych tego procesu czyli SNAI1 oraz wimentyny. W stabilnych klonach z obniżonym poziomem ekspresji *TMBSX4* nastąpiły zmiany w morfologii komórek, w ich zdolności do ruchu w macierzy 3D oraz elastyczności. Jednocześnie komórki te odznaczały się obniżeniem możliwości formowania kolonii, przy jednoczesnym wzroście poziomu dwóch białek związanych z macierzystością.

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej wykazały, że żelsolina i tymozyna $\beta 4$ odgrywają ważną rolę w inwazyjności komórek czerniaka. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że wzrost poziomu T $\beta 4$ promuje progresję tego nowotworu. W przypadku GSN jej rola nie jest jednoznaczna. Z jednej strony brak tego białka hamuje ruch komórek, z drugiej jednak strony zwiększa ich macierzystość.