

Uniwersytet Jagielloński  
w Krakowie  
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

**Barbara Wyroba**

ADAM17 jako potencjalny cel terapii nowotworowych –  
jego rola we wzroście i przerzutowaniu mysiego  
czerniaka oraz analiza wpływu tego białka na komórki  
naczyní limfatycznych.

Promotor: Prof. dr hab. Joanna Bereta

Recenzenci: Prof. dr hab. Jacek Bigda, Prof. dr hab. Piotr Wiđlak

Kraków 2018

## *Podziękowania*

Chciałabym bardzo serdecznie podziękować Pani **Prof. dr hab. Joannie Berecie** za jej opiekę merytoryczną w całym okresie mojego naukowego rozwoju. Za jej wiedzę, rady, pomoc a także zrozumienie i wsparcie w wielu sytuacjach życiowych.

Dziękuję pracownikom Zakładu Biochemii Komórki, szczególnie **dr Renacie Mężyk-Kopeć**, za jej dobre słowa, motywowanie do działania zawsze kiedy tego potrzebowałam, wszelkie sugestie i pomoc w eksperymentach, a także **dr Monice Bzowskiej** i **dr Krystynie Stalińskiej** za ich naukowe i życiowe rady i pomoc w eksperymentach.

Dziękuję także doktorantom i studentom z którymi współpracowałam na co dzień, szczególnie **Karolinie W, Karolinie O, Edycie, Marii, Ali, Tomkowi, Jarkowi i Mateuszowi**, za atmosferę w pracy i pomoc w codziennej laboratoryjnej rzeczywistości, za wszelkie rady i dyskusję.

Bardzo dziękuję Panu **Prof. Victoriano Mulero** za możliwość pracy w jego laboratorium jak również za wszystkie pomysły, rady i wsparcie w eksperymentach dotyczących modelu danio pręgowane.

Dziękuję także moim przyjaciołom z poza laboratorium, bez których wsparcia nie powstałaby ta praca, szczególnie nieocenionemu **Michałowi Rudnikowi**, na którego pomoc mogłam liczyć w każdej sytuacji.

Dziękuję także **Edycie** i **Danie** za wsparcie w ostatnim etapie pisania tej rozprawy doktorskiej. Dzięki za liczne okazje do śmiechu i sprawianie, że codzienna praca jest wielką przyjemnością.

Dziękuję także moim **rodzicom, siostrze** i **Cici** za ich obecność, wsparcie i bycie zawsze po mojej stronie. Dziękuję wam, że jesteście.

Badania prezentowane w rozprawie były finansowane w ramach:

Projektu badawczego Polish –Swiss Research program PSPB 057/2010, stypendium Etiuda nr. 2016/20/T/NZ3/00531 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki oraz środków Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) przyznanego wydziałowi WBBiB, współfinansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Część wyników poniższej pracy zostało opublikowane w artykule: "ADAM17 Promotes Motility, Invasion, and Sprouting of Lymphatic Endothelial Cells.," *PLoS One*, vol. 10, no. 7, p. e0132661, Jan. 2015.

## SPIS TREŚCI

INDEKS NAJWAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW .....	8
WSTĘP TEORETYCZNY .....	9
1. Białko ADAM17 .....	9
1.1. Budowa i substraty białka ADAM17 .....	9
1.2. Biologiczna rola białka ADAM17 .....	12
1.2.1. Wpływ białka ADAM17 na proliferację komórek .....	12
1.2.2. Wpływ białka ADAM17 na migrację komórek .....	15
1.2.3. Wpływ białka ADAM17 na stan zapalny .....	16
1.3. Rola białka ADAM17 w progresji nowotworów .....	17
1.4. Białko ADAM17 jako potencjalny cel terapii antynowotworowych .....	19
2. Nowotwory .....	19
2.1. Drogi przerzutowania nowotworów .....	21
2.1.1. Angiogeneza .....	22
2.1.2. Limfangiogeneza .....	23
2.2. Czerniak .....	25
2.2.1. Rola białka ADAM17 w rozwoju i progresji czerniaka .....	27
3. Modele zwierzęce w badaniach nad nowotworami .....	28
3.1. Myszy .....	28
3.2. Danio przęgowane .....	31
CEL PRACY .....	34
MATERIAŁY I METODY .....	35
1. Linie komórek eukariotycznych: .....	35
2. Odczynniki do hodowli i stymulacji komórkowych .....	35
3. Lentiwirusowe sekwencje shRNA .....	36
4. Przeciwciała .....	37
5. Startery .....	38
6. Odczynniki do PCR i RT-qPCR .....	39
7. Odczynniki wykorzystywane w barwieniach komórkowych i tkankowych .....	39
8. Zestawy .....	39
9. Zwierzęta .....	39

10.	Inne odczynniki .....	40
11.	Hodowle komórkowe .....	40
12.	Transdukcja komórek lentiwirusami w celu wyciszenia ekspresji genu kodującego ADAM17.....	41
13.	Liza komórek do analizy Western blotting .....	42
14.	Elektroforeza białka techniką SDS-PAGE, transfer mokry białek na membranę PVDF oraz immunodetekcja białek metodą Western blotting .....	42
15.	Izolacja RNA z hodowli komórkowych.....	43
16.	Odwrotna transkrypcja i analiza ekspresji genów metodą ilościowego PCR.....	43
17.	Analiza ekspresji genów metodą PCR .....	44
18.	Analiza proliferacji komórek .....	44
19.	Analiza stymulacji komórek śródbłónka przez pożywki znad komórek B16F10.....	46
20.	Analiza ruchliwości komórek.....	47
21.	Analiza adhezji komórek .....	48
22.	Przygotowanie sferek z komórek LEC i B16F10 .....	49
23.	Ocena limfangiogennych właściwości komórek LEC.....	50
24.	Barwienie komórek w celu analizy cytometrycznej białek .....	50
25.	Analiza macierzy białkowych .....	51
26.	Test immunoenzymatyczny ELISA .....	51
27.	Warunki hodowli myszy.....	52
28.	Podawanie myszom komórek nowotworowych i przebieg eksperymentu .....	52
29.	Podawanie przeciwciał hamujących aktywność białka ADAM17 oraz kontroli izotypowej myszom zaszczepionych komórkami B16F10 .....	54
30.	Warunki hodowli danio pręgowanego .....	55
31.	Pozyskiwanie embrionów .....	55
32.	Barwienie i iniekcja komórek nowotworowych do embrionów danio pręgowane..	55
33.	Analiza wpływu komórek B16F10 na angiogenezę w modelu danio pręgowanego	56
34.	Analiza procesu migracji i przeżycia komórek B16F10w modelu danio pręgowane	57
35.	Izolacja surowicy z krwi.....	58
36.	Izolacja komórek z tkanek i guzów nowotworowych .....	58
37.	Barwienie imm. i analiza cytometryczna komórek immunologicznych w guzie .....	59
38.	Przygotowanie lizatów z tkanek.....	59
39.	Izolacja RNA z tkanek .....	60
40.	Reakcja PCR w celu wykrycia przerzutów w tkankach mysich.....	60

41.	Analiza immunochemiczna skrawków z nowotworów .....	61
42.	Analiza statystyczna.....	62
WYNIKI .....		63
CZEŚĆ I.....		63
1.	Stworzenie modelu komórkowego do badania roli białka ADAM17 w komórkach naczyń limfatycznych .....	63
2.	Wpływ wyciszenia białka ADAM17 na profil białkowy w komórkach LEC .....	65
3.	Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na proliferację komórek LEC.....	70
4.	Wpływ wyciszenia białka ADAM17 na zdolność migracji komórek LEC.....	72
5.	Wpływ ligandów HER1 i HER2 na migrację komórek LEC .....	74
6.	Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na właściwości komórek LEC w hodowli trójwymiarowej.....	78
7.	Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na adhezję komórek LEC do różnych podłoży .....	80
8.	Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na ekspresję integryn na błonie komórkowej i na poziom mRNA i białka BIG-H3.....	82
9.	Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na oddziaływania między komórkami LEC a innymi komórkami .....	88
CZEŚĆ II .....		91
10.	Stworzenie modelu komórkowego do badania wpływu białka ADAM17 na komórki nowotworowe B16F10 .....	91
11.	Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na proliferację komórek B16F10.....	95
12.	Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na zdolność migracji komórek B16F10 98	
13.	Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 w komórkach B16F10 na komórki śródbłonnków.....	100
14.	Wpływ białka ADAM17 na stymulację angiogenezy, migrację i przeżycie komórek B16F10 w modelu danio przegowanego .....	107
15.	Poziom przeciwciał hamujących aktywność białka ADAM17 w surowicy i w tkankach myszy .....	113
16.	Wpływ białka ADAM17 na nowotworową angiogenezę w modelu mysim.....	120
17.	Wpływ wyciszenia poziomu białka ADAM17 w guzie i jego otoczeniu na odpowiedź immunologiczną u myszy .....	123
DYSKUSJA.....		127
Badanie wpływu wyciszenia białka ADAM17 – modele komórkowe .....		127
Wpływ białka ADAM17 na wzrost i przerzutowanie nowotworów .....		130

Wpływ białka ADAM17 na proces angiogenezy.....	138
Wpływ białka ADAM17 na proces limfangiogenezy .....	141
Przeciwciała hamujące aktywność ADAM17 i ich znaczenie w terapii antynowotworowej .....	146
WNIOSKI.....	150
SUPLEMENT .....	152
STRESZCZENIE .....	159
ABSTRACT.....	161
SPIS ILUSTRACJI I TABEL .....	163
BIBLIOGRAFIA .....	165

## INDEKS NAJWAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW

ALCAM	<i>activated leukocyte cell adhesion molecule</i>	cząsteczka adhezji aktywowanych leukocytów
AREG	<i>amphiregulin</i>	amfiregulina
CD	<i>cluster of differentiation</i>	antygen różnicowania komórkowego
ECM	<i>extracellular matrix</i>	macierz zewnątrzkomórkowa
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	czynnik wzrostu naskórka
EPG	<i>epigen</i>	epigen
EREG	<i>epiregulin</i>	epiregulina
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>	czynnik wzrostu fibroblastów
HB-EGF	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>	czynnik wzrostu wiążący heparynę podobny do EGF
HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i>	receptor dla nabłonkowego czynnika wzrostu
IL	<i>interleukin</i>	interleukina
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>	międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna
NRG	<i>neuregulin</i>	neuregulina
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>	płytkopochodny czynnik wzrostu
TIMP	<i>tissue inhibitor metalloprotease</i>	tkankowy inhibitor metaloproteinaz
TGF	<i>transforming growth factor</i>	transformujący czynnik wzrostu
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>	czynnik martwicy nowotworów
TNFR	<i>tumor necrosis factor receptor</i>	receptor dla TNF
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>	cząsteczka adhezji komórkowej naczyń
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>	czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
VEGFR	<i>receptor for VEGF</i>	receptor dla VEGF

## WSTĘP TEORETYCZNY

Podstawowymi jednostkami funkcjonalnymi i strukturalnymi żywego organizmu są komórki. Ich właściwe funkcjonowanie zależy od setek białek współdziałających i oddziałujących na siebie nawzajem. Poznanie ich wszystkich funkcji nie jest możliwe na tym etapie rozwoju nauki i techniki. Mimo wszystko, od wielu lat, biologzy molekularni, biochemicy i bioinformatycy podejmują próby zrozumienia wpływu poszczególnych cząsteczek na homeostazę komórki i całego organizmu. Szczególną uwagę naukowców zwracają te białka, których ekspresja zmienia się w określonym procesie chorobowym. Pozwala to na odkrycie, które ze szlaków sygnałowych lub funkcji komórki mogą być zaburzone w danym schorzeniu. Budzi to nadzieje, że zahamowanie lub stymulacja danej molekuly, mogłaby ograniczyć objawy choroby czy nawet ją wyeliminować. Jednym z białek, nad którego funkcją i oddziaływaniami prowadzone są badania na całym świecie i na którym skupia się poniższa praca doktorska, jest metaloproteinaza ADAM17.

### 1. Białko ADAM17

#### 1.1. Budowa i substraty białka ADAM17

ADAM17 (białko zawierające domenę dezintegryny i metaloproteinazy, *A Disintegrin and Metalloproteinase domain-containing protein 17*), nazywane także TACE (*Tumor necrosis factor Alpha Converting Enzyme*) lub CD156b, to glikoproteina transbłonowa należąca do rodziny adamalizyn ADAM. Zbudowana jest z kilku domen: N-końcowej sekwencji sygnałowej, prodomeny, domeny metaloproteinazowej, domeny dezintegrynowej, regionu bogatego w cysteinę, domeny transbłonowej i ogona cytoplazmatycznego [1]. Białko to występuje w wielu tkankach, a jego ekspresja na poziomie mRNA zmienia się silnie od okresu rozwoju embrionalnego (najwyższa ekspresja w mózgu, płucach, wątrobie i nerkach) do etapu dorosłego organizmu (najwyższa ekspresja w sercu, w leukocytach, łożysku,

mięśniach szkieletowych, trzustce, śledzionie, grasicy, prostaty, jajnikach, jądrach) [2]. Do tej pory potwierdzono dwie funkcje białka ADAM17 – jako dezintegryny, która może oddziaływać z niektórymi integrynami i shedazy, która uwalnia z błony komórkowej domeny zewnątrzkomórkowe różnych białek.

Do tej pory zidentyfikowano już ponad 80 różnych substratów dla enzymu ADAM17, które znacząco różnią się między sobą strukturą i funkcją [3]. Jedną z istotnych cząsteczek uwalnianych z błony przez tę proteazę jest czynnik martwicy nowotworów – TNF, ale są to także różne czynniki wzrostu (m.in. czynnik wzrostu wiążący heparynę podobny do EGF – HB-EGF, transformujący czynnik wzrostu – TGF $\alpha$ , amfiregulina – AREG, neuregulina – NRG), receptory (m.in. TNFR1 i II, Notch-1, HER4, VEGFR2), cząsteczki adhezji komórkowej (m.in. L-selektyna, międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna – ICAM-1, cząsteczka adhezji komórkowej naczyń – VCAM, cząsteczka adhezji aktywowanych leukocytów – ALCAM, CD44) czy inne, nienależące do tych grup, białka [4], [5]. Poprzez ich proteolizę, ADAM17 stymuluje lub hamuje tak auto- jak i parakryny przekaz sygnału w komórce, przez co wpływa na liczne procesy - m.in. proliferację, migrację, adhezję, różnicowanie i regulowanie odpowiedzi układu odpornościowego [1], [3], [6]. Znane substraty białka ADAM17 przedstawiono w Tabeli 1.

Złuszczenia białek błonowych przez tę shedazę zachodzi w komórkach konstytutywnie na niskim poziomie. Istnieje jednak wiele jej regulatorów wywołujących silne i szybkie uwalnianie przez nią substratów z powierzchni komórek. Ostatnie badania pokazują, że kluczowa dla stymulacji aktywności białka ADAM17 jest obecność na błonie komórkowej fosfatydyloseryny (PS) [7]. Jej ilość jest skorelowana z uwalnianiem różnych substratów tej shedazy, wywołanym różnymi aktywatorami. Należą do nich m.in. aktywatory kinazy białkowej C (PKC), w tym powszechnie używany w tym celu ester forbolu (PMA - *Phorbol-12-myristat-13-acetate*), agoniści receptorów puryny 2 (P2), czynnik wzrostu fibroblastów 7 (FGF7) czy jonofory wapnia np. jonomycyna [1], [7], [8].

Złuszczenie z błony substratów szedazy ADAM17 może wpływać na wiele procesów w komórkach. Uwolnione z błony białko może połączyć się ze swoim receptorem i aktywować przez niego przekaz sygnału (np. ligandy dla receptorów ErBb) wpływając w ten sposób na proliferację, migrację czy przeżycie komórek. Z kolei złuszczenie receptorów dla różnych białek przez tę szedazę uniemożliwia ich połączenie się na błonie z ich ligandem co prowadzi do desensytyzacji komórek i np. ograniczenie ich aktywacji (jak się to dzieje w przypadku receptora dla CSF-1 na makrofagach). Złuszczone receptory mogą służyć także jako „pułapka” dla ich ligandów, uniemożliwiając ich połączenie z receptorami na powierzchni błony, co również prowadzi do ograniczania przekazu sygnału w komórkach [1].

Badania wskazują, że ADAM17 ma również zdolność oddziaływania z integrzynami  $\alpha 5\beta 1$  oraz  $\alpha 6\beta 1$ . Może przez to wpływać na procesy adhezji i migracji komórek, jednak efekt tego oddziaływania zależy jest czy łączy się z integrzyną w pozycji cis czy trans (odpowiednio na tej samej lub sąsiedniej komórce na której występuje) [9]–[11].

**Tabela 1 Substraty białka ADAM17.** Opracowano na podstawie [3], [12]

<i>Cytokiny i czynniki wzrostu</i>		<i>Receptory</i>			<i>Cząsteczki adhezyjne</i>	<i>Inne</i>
AREG	LTA	ACE-2	GPVI	p75TNF-RII	ALCAM	APP
CSF-1	Notch-1	CD137 (4-1BB)	HER4	p75NRT	CD44	CA IX
CX3CL1	NRG	CD154	HGFR (C-MET)	PTPRF	DCD62L	CD163
DLL-1	Pref1	CD16	IGFR2	PTPRZ	DSG2	GLP1
EPG	SEMMA4D	CD30	IL-1RII	SDC1 I 4	EpCAM	GP
EREG	TGF $\alpha$	CD40	IL-23R	SORCS1 i 3	ICAM-1	KL
FLT-3L	TMEFF2	CD89	IL-6R $\alpha$	SORL1	JAM-A	LYPD3
GP1BA	TNF	CD91	LOX-1	SORT1	kolagen XVII	MICA i B
HB-EGF	TRANCE	CSF1R	NEO-1	TIM-3	L1-CAM	MUC-1
Jag 1	Vasorin	EPCR	Notch1	VEGFR1 i 2	L-selektyna	PMEL17
KL-1 i 2		GHR	NPR		NCAM	PRNP,PrPc
LAG-3		GPIba	NTRK1		Nektyna 4	PTP $\alpha$
LP alfabet		GPV	p55TNF-RI		VCAM-1	TROP-2

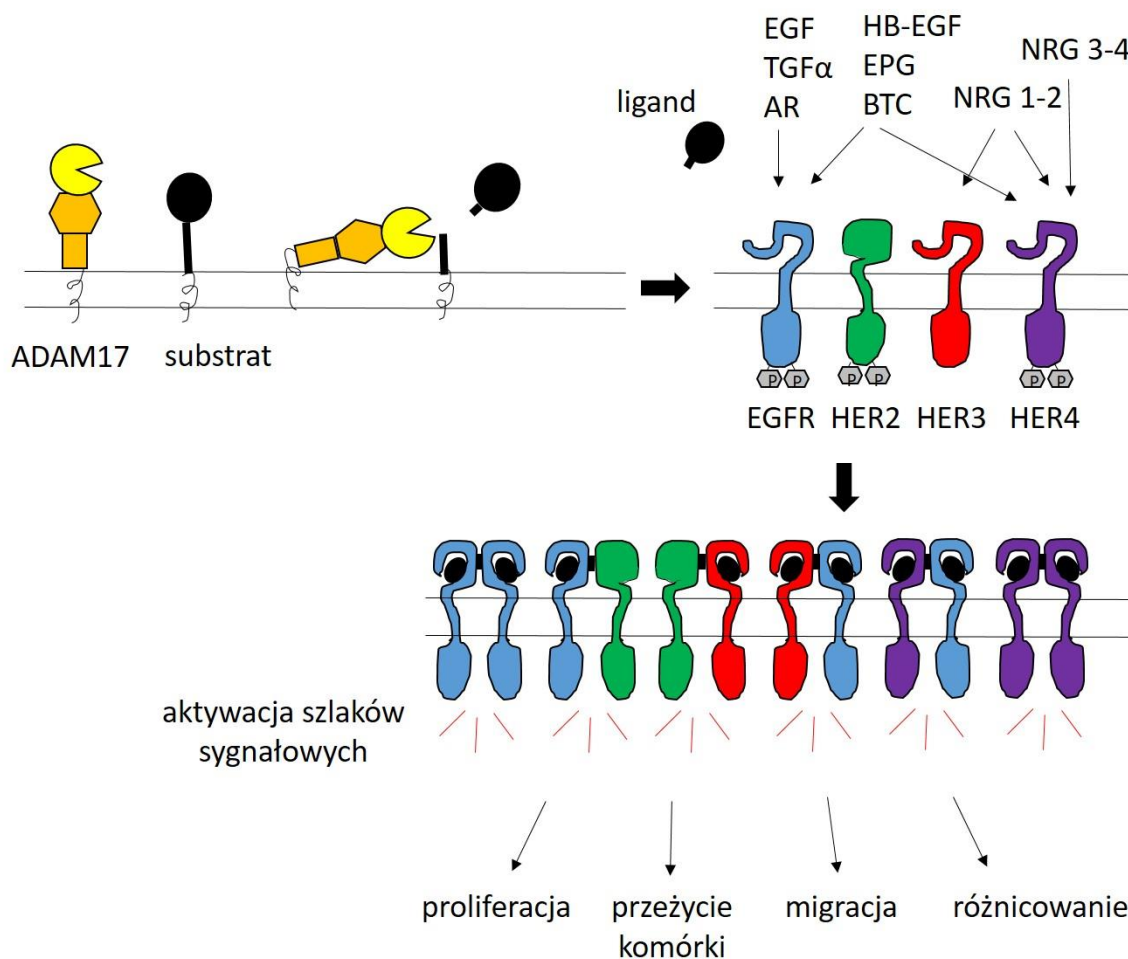
## 1.2. Biologiczna rola białka ADAM17

### 1.2.1. Wpływ białka ADAM17 na proliferację komórek

Białko ADAM17 oddziałuje na proliferację głównie poprzez uwalnianie z błony komórkowej ligandów dla receptorów z rodziny ErbB (*erythroblastic leukemia viral oncogene homolog*)/HER (*human epidermal growth factor receptor*). W jej skład wchodzi cztery błonowe receptory z rodziny kinaz tyrozynowych: EGFR/HER1, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 oraz ErbB4/HER4. Występują one w formie nieaktywnych monomerów, które pod wpływem związania liganda ulegają dimeryzacji homo- lub heterologicznej, co prowadzi do przekazania sygnału do wnętrza komórki [13], choć najnowsze badania wskazują na to, że dla pełnej aktywacji receptorów z rodziny EGFR dimeryzacja jest niewystarczająca – do efektywnego pobudzenia ścieżek sygnałowych dochodzi dopiero po ich oligomeryzacji [14], [15]. Czterema głównymi szlakami przekazu sygnału są te, w których uczestniczą: kinazy aktywowane mitogenami (MAPK), kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K), fosfolipaza C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) oraz kinaza tyrozynowa typu Janus (JAK). Skomplikowany wzór uruchamiania poszczególnych ścieżek zależy od wielu czynników: od rodzaju ligandów, które w pewnym stopniu determinują skład dimerów/oligomerów receptorów, od poziomu ekspresji poszczególnych receptorów w błonie, od obecności białek pomocniczych i białek poszczególnych ścieżek sygnałowych [16]. Efekty zawsze promują przeżywanie komórek, ale poprzez zmiany w syntezie różnych białek i aktywację różnych enzymów mogą włączać różne programy komórkowe wzmożoną migrację, proliferację lub różnicowanie (**Rysunek 1**). Same ligandy dla receptorów mogą wykazywać powinowactwo do tylko jednego receptora (np. czynnik wzrostu naskórka – EGF, TGF $\alpha$ , AR i EREG dla receptora EGFR) lub do wielu receptorów (NRG 1 i 2 dla receptorów HER3 i HER4 czy HB-EGF, epigen (EPG) i  $\beta$ -cellulina dla receptorów EGFR i HER4). Obecnie nie jest znany żaden ligand dla ErbB2, jednak jego struktura sprzyja dimeryzacji z innymi receptorami [13]. Badania dowodzą także, że receptor ten może być też aktywowany w sposób niezależny od liganda. Przy jego nadekspresji

występuje jego homodi- i homooligomeryzacja, co skutkuje przekazem sygnału [17].

Czynniki wzrostowe produkowane są jako białka błonowe, aby móc więc przyłączyć się do receptorów z rodziny EGFR konieczne jest ich uwolnienie z błony komórkowej. Część z nich jest substratami białka ADAM17. Dowodów na wpływ tej szedazy na przekaz sygnału przez receptory ErbB dostarczyły zwierzęta transgeniczne z jego nokautem. W pierwszym takim stworzonym modelu mysim (myszy TACE  $\Delta$ Zn/ $\Delta$ Zn), w genie *Adam17* sekwencję kodującą fragment centrum aktywnego zastąpiono kasetą kodującą gen oporności na antybiotyk selekcyjny). Fenotyp tych zwierząt był bardzo zbliżony do tego jaki obserwuje się u myszy z nokautem EGFR [18]. Ze względu na brak przeżywalności myszy z nokautem *Adam17* (śmierć od 17,5 dnia od zapłodnienia do pierwszych dni po urodzeniu) eksperymenty prowadzono na pobranych od tych zwierząt komórkach. Badania potwierdziły, że brak aktywności białka ADAM17 hamuje uwalnianie z komórek TGF $\alpha$ , co silnie ogranicza dimeryzację i aktywację receptorów EGFR [19]. Dalsze prace wykazały, że w myszach TACE  $\Delta$ Zn/ $\Delta$ Zn nie dochodzi do uwalniania innych ligandów z rodziny EGF, co prowadzi do ograniczonej aktywacji EGFR i defektów rozwojowych; brak rozpuszczalnej formy HB-EGF skutkuje defektami w rozwoju płuc i serca [20]–[22] a brak rozpuszczalnej formy AREG powoduje defekty w rozwoju gruczołów sutkowych [23].



**Rysunek 1. Schemat uwalniania z błony komórkowej substratów białka ADAM17 i ich działanie na receptory ErbB - dimeryzację i aktywację. Receptor HER3 na bardzo niewielką zdolność fosforylacji, natomiast HER2 nie ma obecnie znanych substratów. Przedstawiono tylko główne ligandy dla receptorów oraz niektóre możliwości dimeryzacji receptorów.**

Oprócz działania przez receptory EGFR, ADAM17 może wpływać na proliferację także innymi sposobami. Pokazano, że uwalnianie HB-EGF z błony komórkowej keratynocytów, może prowadzić do translokacji jego C-końca do jądra komórkowego, co daje bezpośredni sygnał do podziałów [24]. Innym sposobem jest jego wpływ na drogi sygnałowe hamujące proliferację. Przykładem tego mechanizmu jest złuszczenie TGF $\beta$ R1, jednego z receptorów TGF $\beta$ , co ogranicza działanie antyproliferacyjne tego białka [25].

Zaobserwowano również, że białko ADAM17 może wpływać na zahamowanie podziałów komórkowych. Dzieje się tak np. w komórkach poduszeczek

wsierdziowych, kiedy uwalnia on z błony HB-EGF, hamujący w tym przypadku proliferację, jednocześnie promując różnicowanie [22].

### **1.2.2. Wpływ białka ADAM17 na migrację komórek**

Białko ADAM17 poprzez uwalnianie substratów aktywujących receptory ErbB wpływa nie tylko na proliferację komórek, ale także na ich migrację. Przemieszczanie się komórek jest niezwykle istotne w bardzo wielu procesach zachodzących w organizmie m.in. podczas embriogenezy a po okresie życia embrionalnego także w gojeniu się ran czy procesach związanych z odpowiedzią immunologiczną [1]. W trakcie rozwoju embrionalnego migracja to kluczowe zjawisko konieczne do właściwego kształtowania się zarodka, a później tkanek i organów. Nieco inaczej niż w dorosłym organizmie, nie polega na interakcjach indywidualnych komórek z ich otoczeniem, ale bardziej na ruchu całej grupy silnie oddziałujących na siebie komórek [26]. Pokazano, iż stymulacja białka ADAM17 w embrionalnych mysich fibroblastach powoduje uwalnianie czynników wzrostu, które działając poprzez receptory ErbB wpływają na ich migrację [27]. Oprócz tego, substratami ADAM17 są także białka adhezyjne, które wpływają na zdolność komórek do oddziaływania pomiędzy sobą i macierzą zewnątrzkomórkową. Poprzez ich uwalnianie z błony, zwiększa się potencjał komórek do migracji. Są to takie białka jak kadheryny N i E, adhezyny VCAM-1 i ALCAM, L1-CAM, L-selektyna, CD44. Wpływ złuszczenia tych białek na zwiększenie migracji komórek, szczególnie w komórkach nowotworowych potwierdzono w wielu badaniach [4], [6], [28]–[30]. Istnieją jednak także doniesienia, które pokazują, że obniżona ekspresja niektórych białek adhezyjnych na komórkach guza powoduje przeciwny efekt [31], [32]. Rolę niektórych substratów enzymu ADAM17, szczególnie istotnych w kontekście rozwoju czerniaka, omówiono poniżej w punkcie 2.2.1.

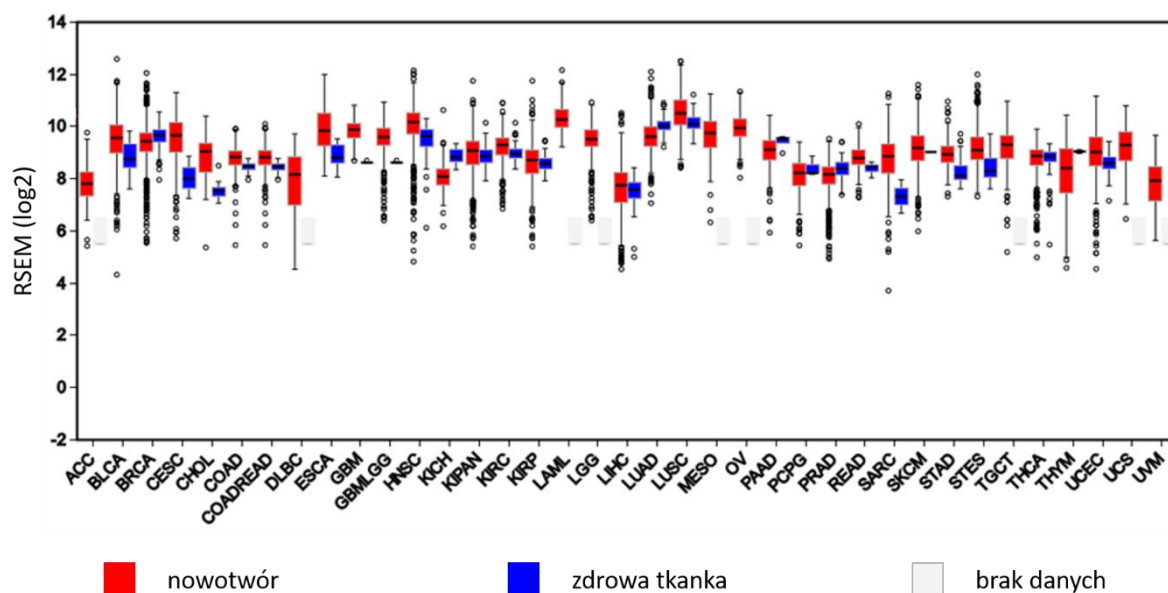
### 1.2.3. Wpływ białka ADAM17 na stan zapalny

ADAM17 pełni istotną rolę w procesach zapalnych. Substrat, dzięki któremu białko to zostało zidentyfikowane jako szedaza – TNF [33], [34], to jedna z głównych cytokin prozapalnych. Niskie, konstytutywne uwalnianie tego białka gwałtownie wzrasta po aktywacji komórek czynnikami stymulującymi aktywność ADAM17. Dojrzała, rozpuszczalna, uwolniona z błony forma TNF powoduje stymulację odpowiedzi zapalnej i modulację odpowiedzi immunologicznej. Cytokina ta wpływa na proliferację i różnicowanie limfocytów B i T, promuje cytotoksyczność komórek NK, limfocytów cytotoksycznych i makrofagów. Ma także działanie chemotaktyczne i aktywuje monocyty i neutrofile. Dodatkowo także indukuje uwalnianie wielu kolejnych białek prozapalnych:  $IFN\gamma$  przez limfocyty oraz IL-1, IL-6,  $IFN\beta$  przez makrofagi [1]. Wpływ ADAM17 na stan zapalny nie ogranicza się jednak tylko do działania TNF. Stwierdzono, że spośród jego substratów około 20 ma wpływ na ten proces. Przykładowo, poprzez uwalnianie specyficznego receptora dla interleukiny 6, który łączy się z IL-6, następuje aktywacja szlaków prozapalnych także w tych komórkach, które nie posiadają tego receptora na swojej powierzchni a jedynie receptor dla niego partnerski – gp130 [6]. Dzięki temu zjawisku, wrażliwość na tę cytokinę wykazują również progenitorowe komórki hematopoetyczne, limfocyty T, embrionalne komórki macierzyste, komórki mięśni gładkich, mezenchymalne czy komórki śródbłonnków [35].

Dodatkowo ADAM17 jest zaangażowany w oddziaływanie komórek immunologicznych z śródbłonkiem naczyń krwionośnych podczas migracji leukocytów do miejsca zapalenia. Poprzez uwalnianie takich molekuł jak L-selektyna, VCAM-1, ICAM-1, JAM-A m.in. umożliwia diapedezę leukocytów [6], [36]. Podwyższoną ekspresję białka ADAM17 stwierdzono u pacjentów z różnymi chorobami związanymi ze stanem zapalnym np. w sepsie (w leukocytach), nieswoistym zapaleniu jelita (komórkach epitelialnych), łuszczycy (komórkach tłuszcznych) czy stwardnieniu rozsianym (komórki monojądrzaste krwi) [1].

### 1.3. Rola białka ADAM17 w progresji nowotworów

Zwiększoną ekspresję ADAM17 na poziomie mRNA (**Rysunek 2**) i/lub białka w porównaniu do zdrowej tkanki obserwuje się w wielu typach nowotworów. Pośród najczęściej wymienianych są nowotwory piersi [37]–[41], płuc [42], [43], prostaty, jajników [41], trzustki [44], żołądka [45], [46] i jelita grubego [47]. Zależność pomiędzy poziomem białka ADAM17 w nowotworach, a ich wielkością, stopniem zaawansowania i przerzutowaniem (do węzłów chłonnych) stwierdzono m.in. w niedrobnokomórkowym raku płuc, nowotworze głowy i szyi oraz piersi [38], [48], [49].



**Rysunek 2. Poziom mRNA *Adam17* w różnych typach nowotworów w porównaniu do zdrowej tkanki.** Dane, uzyskane metodą RNAseq, pochodzą z bazy FireBrowse, w której zgromadzono wyniki ok 14 tys. pacjentów pochodzących z 37 kohort badawczych. Rozwinięcie skrótów typów nowotworów i liczbę pacjentów zamieszczono w Tabeli 1sup.

Istnieje kilka mechanizmów przez jakie białko ADAM17, ze względu na swoje liczne substraty, mogłoby wpływać na progresję nowotworów. W licznych badaniach pokazano, że przy jego nadekspresji obserwowane jest między innymi:

- zwiększenie aktywacji receptorów ErbB poprzez większe uwalnianie ich ligandów (TGF $\alpha$ , AREG, HB-EGF, betacellulina, EREG, EPG, NRG) [6] lub

- poprzez wpływanie na poziom ich ekspresji (jak w przypadku EGFR) [43] co może prowadzić do nasilenia proliferacji i migracji komórek nowotworowych,
- zwiększone uwalnianie białek adhezyjnych z powierzchni komórek nowotworowych lub śródbłonka (m.in. N-kadheryny, CD44 czy E-kadheryny,) co może powodować zwiększoną migrację i proliferację komórek a także ułatwiać proces metastazy [50],
  - uwalnianie z występujących na powierzchni limfocytów T i komórkach NK białek takich jak MICA i MICB (*MHC class I chain related gene*) co może ograniczyć ich działanie na komórki nowotworowe na skutek braku oddziaływania z receptorem NKG2D na ich powierzchni [31], [51],
  - zwiększone złuszczenie białek kostymulatorowych takich jak np. CD40 (z błony makrofagów) i CD154 (CD40L, z błony limfocytów T i komórek NK) co prowadzi może do hamowania ich aktywacji [3],
  - poprzez uwalnianie z błony aktywowanych już limfocytów T, białka należącego do rodziny TNF: 4-1BB, które w formie nierozpuszczalnej promuje aktywację innych komórek układu immunologicznego: limfocytów T pomocniczych, limfocytów B, monocytów i makrofagów, wyciszenie odpowiedzi immunologicznej [3],
  - poprzez stymulację ekspresji oraz sekrecji z komórek takich białek jak czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego VEGFA, aktywacja procesów odpowiedzialnych za angiogenezę, co w rezultacie może wpłynąć na ułatwiony rozwój guza i jego przerzutowanie [4], [36], [52].

Wzmoczoną ekspresję ADAM17 stwierdzono również w ludzkich liniach nowotworowych wykorzystywanych w badaniach naukowych: nowotworach piersi MDA-MB-435 oraz MCF-7 [39] oraz prostaty: MDA PCa 2b, LNCaP-C33, -C51, -C81, -Pro5, -Ln3, -C4-2, PC3, DU145 [48]. Znaczenie enzymu ADAM17 w stymulacji proliferacji i migracji komórek różnych linii nowotworowych udowodniano wielokrotnie [4], [30], [53]–[57].

#### 1.4. Białko ADAM17 jako potencjalny cel terapii antynowotworowych

Białko ADAM17, ze względu na swoje rozległe działanie, a także często występującą nadekspresję w komórkach guza, jest interesującym celem terapii antynowotworowych. Stworzenie jego specyficznego inhibitora nie jest jednak łatwe. Terapie mające na celu zahamowanie jego aktywności często działają także na inne białka z rodziny ADAM lub metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (MMP) ze względu na podobieństwo ich domeny katalitycznej. Powoduje to liczne efekty uboczne potencjalnego leku. Jest jednak druga strona medalu. Ze względu na częściową redundancję enzymów o aktywności szedaz zahamowanie aktywności tylko proteazy ADAM17 w wielu przypadkach może nie przynieść spodziewanych efektów. Wynika to z możliwej kompensacji braku działania białka ADAM17 przez inne metaloproteazy, które mogą uwalniać z błony komórek te substraty co ADAM17 [58]. Badania z wykorzystaniem myszy z warunkowymi nokautami *Adam17* lub myszy z hipomorficznymi allelami *Adam17* pozwoliły jednak na ustalenie listy białek, dla których ADAM17 jest podstawową szedazą a brak jej aktywności bardzo silnie ogranicza ich uwalnianie z błony *in vivo*. Wśród tej grupy znajdują się TGF $\alpha$ , HB-EGF, AREG, L-selektyna, a więc białka, które mogą stanowić kluczowy element w rozwoju i przerzutowaniu niektórych nowotworów [12]. Dlatego też prace nad stworzeniem terapeutycznych inhibitorów białka ADAM17 są kontynuowane. Badania prowadzone są na czterech typach związków. Są to: syntetyczne inhibitory o małej masie cząsteczkowej, oczyszczone lub syntetyczne fragmenty prodomeny ADAM17, zmodyfikowane inhibitory metaloproteinaz (TIMP) oraz przeciwciała monoklonalne [59].

## 2. Nowotwory

Nowotwory to jedna z najczęstszych przyczyn zgonów ludzi na świecie. Szacuje się, że każdego roku na tę chorobę zapada ponad 14 milionów osób i jest ona powodem śmierci prawie 8,8 miliona osób rocznie. Według prognoz epidemiologicznych

w ciągu najbliższych 15 lat nastąpi podwojenie tych liczb [60]. W Polsce, chorobę nowotworową wykrywa się każdego roku u blisko 160 tys. osób, przy czym szacuje się, że jest to powód zgonu ok 92,5 tys. ludzi rocznie [61]. Przy tak zatrważających statystykach, nie dziwi, że od wielu lat nowotwory są przedmiotem intensywnych badań, zarówno pod względem mechanizmów ich powstawania jak i możliwości ich leczenia. Komórki nowotworowe posiadają szereg mutacji powodujących zmiany w ich funkcjonowaniu w porównaniu do prawidłowych komórek i gwarantujące ich wzrost i przeżycie. Część z tych zmian przedstawiono poniżej.

- Uniezależnienie się od zewnętrznych sygnałów pozwalających na proliferację. Jest to możliwe np. ekspresję czynników wzrostowych i autokrynną stymulację podziałów komórkowych, modyfikację (nadaktywność) szlaków sygnałowania wewnątrzkomórkowego (które odpowiadają za przekaz sygnału do podziałów do jądra komórkowego), czy zwiększenie wrażliwości na sygnały z zewnątrz poprzez nadekspresję receptorów dla czynników wzrostu (hiperwrażliwość) [62].
- Nieograniczony potencjał proliferacyjny w komórkach nowotworowych m.in. dzięki ekspresji telomerazy, co zapobiega skracaniu się telomerów i uszkodzeniu chromosomów [63].
- Zdolność do wyłączenia programu apoptozy, które wynika z mutacji w genach kodujących białka supresorowe (np. p53, RB1, BRCA1, pTEN) lub zmiany w ekspresji czy funkcjonowaniu białek proapoptotycznych i/lub receptorów stymulatorów apoptozy [64].
- Niewrażliwość na sygnały pochodzące z otoczenia dotyczące hamowania wzrostu, co wynika ze zmian w cyklu komórkowym, modyfikacji poziomu ekspresji białek odpowiedzialnych za przejście komórki w stan spoczynku czy kontrolujących podziały komórkowe [62].

Co bardzo ważne w kontekście rozwijania nowych terapii antynowotworowych – najczęstszą przyczyną śmierci osób z nowotworami nie są guzy pierwotne, ale ich przerzuty do innych narządów. Metastaza komórek nowotworowych jest możliwa dzięki kolejnym mutacjom, szczególnie takim, które umożliwiają im migrację do a następnie z naczynia krwionośnego lub limfatycznego, transport przez układ krwionośny i/lub limfatyczny, a także zdolność do przeżycia i wzrostu w nowej niszy [65], [66]. Jako że wzrostowi guza towarzyszy powstawanie nowych naczyń (a więc dróg przerzutowania), to poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za angiogenezę (tworzenie nowych naczyń krwionośnych) i limfangiogenezę (tworzenie nowych naczyń limfatycznych) wydaje się niezwykle istotne w kontekście pracy nad nowymi terapiami antynowotworowymi.

## **2.1. Drogi przerzutowania nowotworów**

Przerzutowanie komórek nowotworowych jest skomplikowanym procesem, na który wpływa zdolność komórek do proliferacji i migracji a także aktywność proteaz związanych z błoną komórkową i wydzielanych przez komórki nowotworowe do środowiska. Drogami przerzutowania są zarówno istniejące już naczynia krwionośne i limfatyczne, jak i te powstałe na skutek działania czynników proangio- i prolimfoangiogennych, produkowanych podczas procesu onkogenezy i wzrostu nowotworów [67]–[70]. Czynniki te to przede wszystkim cytokiny z grupy czynników wzrostu śródbłonna naczyń: VEGF oznaczone literami od A do F wiążące się do receptorów VEGFR 1, 2 i 3. Po związaniu liganda, receptory dimeryzują i generują sygnał, który pobudza komórki śródbłonkowe do proliferacji i migracji w kierunku guza. Dla VEGFA, głównego czynnika stymulującego rozwój naczyń krwionośnych, podstawowym receptorem generującym sygnał aktywatorowy jest VEGFR-2. Funkcjonalnym odpowiednikiem VEGFA jest w limfangiogenezie VEGFC i w mniejszym stopniu VEGFD wiążące się do receptora VEGFR-3 na komórkach śródbłonna naczyń limfatycznych. Angiogeneza i limfangiogenezę nie są całkowicie odrębnymi procesami. Receptor VEGFR-3 występuje czasami na śródbłonku naczyń

krwionośnych [71], a receptor VEGFR-2 może oddziaływać, choć z mniejszym powinowactwem, także z VEGFC i -D, które w tym przypadku będą indukować neowaskularyzację [72].

Wykazano także, że VEGFA może odgrywać rolę w limfangiogenezie, gdyż VEGFR-2 może także ulegać ekspresji w śródbłonku limfatycznym [73]. VEGFA pełni także funkcję chemoatraktanta dla monocytów i makrofagów wykazujących ekspresję VEGFR-1. Komórki te mogą wydzielać do środowiska guza nie tylko czynniki proangiogenne, ale również w prolimfangiogenne [73], [74].

### **2.1.1. Angiogeneza**

Krew dostarcza komórkom tlen i składniki odżywcze. Dlatego powstawanie naczyń krwionośnych to proces niezbędny do prawidłowego rozwoju organizmu. Na komórki śródbłonka naczyń działają zarówno stymulatory ich wzrostu i migracji jak i inhibitory tego procesu. Zaburzenie równowagi pomiędzy tymi czynnikami może prowadzić do niekontrolowanej neowaskularyzacji, co obserwuje się w takich schorzeniach jak choroby nowotworowe, przewlekłe stany zapalne czy degeneracja plamki żółtej [75]. Angiogeneza jest procesem bardzo istotnym we wzroście i przerzutowaniu guzów. Nowotwór, bez bezpośredniego dostępu do naczyń krwionośnych, pobiera substancje potrzebne do życia na drodze dyfuzji, a zatem może urosnąć maksymalnie do średnicy ok 1–2 mm<sup>3</sup>. Po osiągnięciu takiego rozmiaru, gdy komórki wciąż się dzielą, te umiejscowione we wnętrzu nowotworu ulegają nekrozie lub apoptozie. Nadmierne nagromadzenie produktów przemiany materii i pogłębiająca się hipoksja otoczenia powoduje stabilizację i gromadzenie się czynnika HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-induced factor-1 $\alpha$ ) [76]. Czynniki ten bezpośrednio lub pośrednio wpływa na wydzielanie z komórek nowotworowych wielu czynników proangiogennych m.in.: VEGFA, czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), EGF, płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), HB-EGF, IL-8, angiopoetyny, prostaglandyny E, które indukują proliferację komórek śródbłonka, ich migrację i przebudowę naczyń. Angiogeneza stymulowana jest także przez inne komórki

w otoczeniu guza. Na ten proces wpływają w dużym stopniu same komórki śródbłonna, makrofagi i fibroblasty związane z nowotworem poprzez wydzielanie czynników proangiogennych ( np. VEGF, EGF, FGF), czy adipocyty przez wydzielanie cytokin prozapalnych (promując dalszy napływ makrofagów) i stanowiąc źródło kwasów tłuszczowych potrzebnych proliferującym komórkom naczyń krwionośnych [70]. Komórki nowotworowe, fibroblasty i komórki towarzyszące nowotworowi wydzielają dodatkowo proteazy, które lokalnie degradują białka macierzy zewnątrzkomórkowej i błony podstawnej. Proces ten powoduje uwalnianie się z nich kolejnych czynników stymulujących rozwój naczyń krwionośnych np. FGF, rodziny białek VEGF oraz insulinopodobnego czynnika wzrostu – IGF-1, i jest konieczny, aby umożliwić komórkom śródbłonna migrację [70], [76].

Nowe naczynia w guzie i wokół guza, powstające dość chaotycznie i w szybkim tempie, nie mają tak dobrze zorganizowanej struktury jak te prawidłowe. Mają one zwykle zmienną średnicę, nieregularne odgałęzienia, mniej perycytów, a przez to zwiększoną przepuszczalność. Ta wadliwa struktura może powodować z jednej strony ich niedrożność, z drugiej wysięk płynu do tkanki nowotworowej [76].

### **2.1.2. Limfangiogeneza**

Limfangiogeneza to proces powstawania nowych naczyń limfatycznych, obserwowany głównie podczas embriogenezy. Może występować jednak także postnatalnie, przy procesach takich jak naprawa tkanek, stan zapalny czy wzrost nowotworów [72], [77]. Limfangiogeneza stymulowana jest przede wszystkim przez wspomniane wcześniej czynniki wzrostu VEGFC i -D oddziałujące na receptor VEGFR-3, a także przez: czynnik wzrostu hepatocytów (HGF), angiopoetynę 1 i 2, FGF 1 i 2, PDGF, adrenomedullinę oraz endotelinę 1 [72], [78]. Naczynia limfatyczne wokół guza są dogodną drogą przerzutowania dla komórek nowotworowych – najpierw do węzłów chłonnych, a stamtąd do innych miejsc organizmu, także za pośrednictwem układu krwionośnego, gdyż główne naczynia układu limfatycznego łączą się z kątami żylnymi systemu krwionośnego). Układ limfatyczny posiada szereg cech

sprzyjających przeżyciu i aktywności komórek ze względu na jedną ze swoich funkcji jaką jest transport komórek immunologicznych [79]. Są to między innymi: niewielka szybkość przepływu płynów w naczyniu, co redukuje naprężenia ścinające (WSS, *wall shear stress*) czy wysokie stężenie kwasu hialuronowego o właściwościach ochronnych dla transportowanych komórek, odpowiadającego także za integralność naczyń [79], [80], [81].

Naczynia limfatyczne ulegają licznym zmianom pod wpływem czynników wydzielanych przez komórki nowotworowe: zmieniają nieco swoją morfologię i zaczynają proliferować. Zwiększa się przez to powierzchnia naczyń mająca kontakt z komórkami nowotworowymi, co może ułatwiać ich migrację [82].

Komórki guza mogą przedostawać się do naczyń limfatycznych na drodze różnych oddziaływań. Ważną rolę w tym procesie odgrywają chemokiny – substancje o właściwościach chemotaktycznych, których funkcją jest aktywacja i „zwabianie” komórek układu odpornościowego do miejsc, w których toczy się proces zapalny czy też kierowanie ich do węzłów chłonnych [80]. Dzięki ekspresji receptorów dla chemokin, komórki nowotworowe mogą dostać się do naczyń limfatycznych i do węzłów chłonnych. Przykładem jest oddziaływanie receptora CXCR4, normalnie występującego na komórkach dendrytycznych, ale ulegającego też ekspresji w wielu typach nowotworów z chemokiną CXCL12 produkowaną przez komórki śródbłonna naczyń limfatycznych. Co ciekawe, ekspresja tej chemokiny w naczyniach wokół nowotworu jest znacznie podwyższona w porównaniu do prawidłowych naczyń limfatycznych [83], co sugeruje istnienie wzajemnych oddziaływań komórek guza i śródbłonna limfatycznego. Podobną oddziaływanie stwierdzono w przypadku chemokiny 19 i 21 i ich receptora CCR7, normalnie występującego na części limfocytów T i B i komórek dendrytycznych, którego ekspresję stwierdzono na komórkach nowotworowych m.in. szyjki macicy, okrężnicy, żołądka, piersi u pacjentów z przerzutami do węzłów chłonnych [72], [82].

## 2.2. Czerniak

Czerniak to nowotwór wywodzący się z melanocytów, komórek wytwarzających i przechowujących melanicę. Chociaż najczęściej występuje na skórze, może pojawić się wszędzie tam gdzie występują melanocyty np. w siatkówce oka czy w obrębie błon śluzowych ust i nosa. Najczęściej rozwija się pod wpływem promieniowania UV, które może powodować mutacje w genach kodujących białka, także tych regulujących proliferację i apoptozę komórek [84]. Szczególnie często stwierdza się mutacje wpływające na drogę sygnałową RAS/RAF/MAPK (kinazy białkowe aktywowane mitogenem) [85], [86]. Ze względu na fakt, że aż u 10% pacjentów stwierdzono historię rodzinną występowania tego nowotworu, możliwe, że jego występowanie ma pewne podłoże genetyczne [84]. Wczesne wykrycie czerniaka pozwala na wyleczenie dużej części pacjentów poprzez wycięcie nowotworu. Jednak, jako że nowotwór ten charakteryzuje się nie tylko szybkim wzrostem, ale także przerzutowaniem nawet we wczesnym stadium rozwoju, szacuje się, że globalnie jest powodem śmierci co najmniej 55 tys. ludzi rocznie [87]. Przerzuty czerniaka są często odporne na radio-, chemo- czy immunoterapię. Oprócz tych występujących w bliskim otoczeniu guza pierwotnego (tzw. przerzuty satelitarne oraz przerzuty do najbliższych węzłów chłonnych), pojawiają się najczęściej przerzuty do płuc, wątroby, kości i mózgu [84].

Bardzo duże znaczenie w rozwoju czerniaka odgrywa zaburzenie homeostazy mikrośrodowiska skóry, tworzonego m.in. przez: melanocyty, keratynocyty, fibroblasty, komórki śródbłonkowe oraz komórki układu odpornościowego.

Transformacja nowotworowa może wynikać m.in. z:

- zaburzenia kontaktu keratynocytów i melanocytów:

Melanocyty i keratynocyty oddziałują na siebie poprzez różne białka adhezyjne. Proliferacja melanocytów jest kontrolowana przez keratynocyty, jednak aby była możliwa, musi dojść do chwilowego zerwania kontaktu fizycznego między tymi komórkami. Zaburzenia w ich kontakcie mogą wywołać dodatkowe, niekontrolowane podziały melanocytów, niezależnie od sygnałów pochodzących od keratynocytów

[84]. Głównym białkiem adhezyjnym między tymi typami komórek jest kadheryna E. Różny stopień zahamowania ekspresji tego białka obserwuje się w większości czerniaków. Jest on również markerem złośliwego charakteru nowotworu i jego inwazyjności [88].

- zaburzenie kontaktu melanocytów z fibroblastami:

Obniżenie ekspresji E-kadheryny często powoduje zmiany w poziomie N-kadheryny. Zwiększona ekspresja tego białka promuje kontakt melanocytów z fibroblastami i komórkami śródbłonna. Fibroblasty mogą wpływać na proliferację nieprawidłowych melanocytów poprzez wydzielanie czynników wzrostu i tworzenie odpowiedniego podścieliska dla tych komórek. Dodatkowo mogą promować także proces przerzutowania m.in. poprzez wydzielanie proteaz (np. MMP) trawiących macierz zewnątrzkomórkową, co ułatwia migrację komórek nowotworowych czy poprzez wydzielanie czynników proangiogennych jak VEGF-A [84], [89].

- wpływu nieprawidłowych melanocytów na komórki prawidłowe:

Istniejące już komórki czerniaka, mogą powodować transformację nowotworową prawidłowych melanocytów. Wynika to prawdopodobnie ze wytwarzanego przez nie mikrośrodowiska. Proces ten może być powodem tak szybkiego wzrostu tego typu nowotworu i jego inwazyjności [90].

- wpływu czynnika HIF-1 na melanocyty:

Czynnik HIF-1 ma duże znaczenie dla transformacji nowotworowej melanocytów. Jego ekspresja może być wywołana przez niedotlenienie, ale także mutacje genetyczne, UV czy metale ciężkie. Uaktywniony, powoduje w melanocytach szereg zmian, przede wszystkim zahamowanie procesu apoptozy (hamowanie aktywności p53), zmniejszenie ekspresji E-kadheryny (przez aktywację jej inhibitora – białka SNAIL) czy aktywację szlaków sygnałowych MAPK i PI3K (pobudzanie proliferacji komórek) [84].

### 2.2.1. Rola białka ADAM17 w rozwoju i progresji czerniaka

Również w czerniakach, tak jak w innych wspomnianych wcześniej różnych typach nowotworów, obserwuje się nadekspresję białka ADAM17. Co więcej, wykazano korelację między progresją i stopniem zaawansowania choroby a poziomem białka ADAM17 w komórkach nowotworowych [91]–[93]. Stwierdzono także, że współczynnik sześcioletniego przeżycia u pacjentów z niskim poziomem tego enzymu w guzach wynosił 67%, podczas gdy u tych z wysoką ekspresją, tylko 47% [92]. Wraz z zaawansowaniem choroby w osoczu pacjentów wzrastał także poziom substratu białka ADAM17 – TNF-u, co może m.in. wynikać ze zwiększonej aktywności tej szedazy [91], [94].

W badaniach *in vitro* pokazano, że oprócz uwalniania z błony czynników wzrostu napędzających proliferację i migrację komórek czerniaka [95], białko ADAM17 może także wpływać na jego migrację i przerzutowanie. Przypuszcza się, że wynika to z jego roli jako szedazy dla cząsteczek adhezji międzykomórkowej, których rozpuszczalne formy lub których ograniczenie ilości na błonie komórkowej, może wpływać na te procesy.

- L1-CAM – To białko odpowiedzialne za adhezję komórek oraz ich oddziaływanie z macierzą zewnątrzkomórkową. Uwalniane jest z powierzchni komórek m.in. przez metaloproteinazy ADAM17 i ADAM10 [1]. Jego nadekspresję stwierdzono u pacjentów z zaawansowaną formą czerniaka i skorelowano ją z jego potencjałem metastatycznym [96]. Rozpuszczalna forma L1-CAM poprzez oddziaływanie z integryną  $\alpha v \beta 3$  może promować migrację komórek czerniaka przez śródbłonek [97].
- ALCAM – Poziom ekspresji tego białka adhezji międzykomórkowej jest jednym z markerów progresji czerniaka, a jego najwyższy poziom obserwuje się w komórkach przerzutujących [98]. W komórkach raka jajnika potwierdzono, że poziom rozpuszczalnej formy ALCAM jest skorelowany z aktywnością ADAM17,

której zahamowanie prowadzi do ograniczenia migracji i przerzutowania komórek nowotworowych [55].

- ICAM-1 – Białko to występuje zwykle na komórkach śródbłonna oraz immunologicznych, ale jego zwiększoną ekspresję obserwuje się też w komórkach czerniaka. Zwiększony poziom rozpuszczalnej formy tej cząsteczki jest skorelowany ze wzmożonym ryzykiem progresji nowotworu i przerzutowania [99]. Uwalnianie rozpuszczalnej formy ICAM-1 z komórek nowotworowych ogranicza ich interakcję z limfocytami [100]. Jednocześnie istnieją badania, w których wykazano, że wysoki poziom ICAM-1 na powierzchni jego komórek przyczynia się pośrednio do aktywacji szlaku PI3K/AKT co z kolei może wpłynąć na mniejszą wrażliwość komórek nowotworowych na działanie limfocytów cytotoksycznych [101]. Nie jest więc pewne, czy złuszczenie tego białka z błony komórek nowotworowych przez ADAM17 będzie sprzyjać czy też ograniczać rozwój nowotworu.

### **3. Modele zwierzęce w badaniach nad nowotworami.**

#### **3.1. Myszy**

Myszy jako model biologiczny posiadają szereg zalet. Są niewielkie, stosunkowo łatwe w hodowli i utrzymaniu oraz mają szybki cykl życiowy. W badaniach nad nowotworami zwierzęta te wykorzystywane są w wielu celach. Jest to m.in.: poznawanie mechanizmów związanych z tworzeniem i rozwojem guzów, poznawania funkcji poszczególnych genów i białek istotnych w tym procesie, poszukiwania nowych markerów nowotworowych i potencjalnych celów terapii, a także testowanie nowych terapeutyków [102].

W tego typu badaniach, myszom podawane są komórki nowotworowe. Wstrzykuje się je ortotopowo, czyli do miejsca, które jest naturalnym środowiskiem rozwoju danego typu nowotworu) lub heterotopowo – poza ten obszar, najczęściej podskórną. Pierwszy z tych sposobów pozwala otrzymać wyniki bliższe

rzeczywistości, jako że warunki rozwoju i oddziaływania z komórkami są podobne do tych jakie występują przy nieindukowanym rozwoju danego guza. W niektórych przypadkach jednak łatwiej jest badać pewne zjawiska kiedy guz rośnie podskórnie i umożliwia łatwe pomiary jego wzrostu i innych parametrów [103].

Bardzo powszechnie stosowanymi szczepami myszy, szczególnie w kontekście skuteczności terapii antynowotworowych są myszy SCID (brak limfocytów B i T) oraz NUDE (brak limfocytów T). Ze względu na niedobory odporności możliwe jest podanie im ludzkich komórek nowotworowych, nie powodując przy tym ich odrzucenia jako obcych gatunkowo. Jednocześnie, brak w pełni funkcjonalnego układu odpornościowego powoduje, że wyniki uzyskane przy stosowaniu tych modeli nie odzwierciedlają rzeczywistości, w której nowotwór wchodzi w rozmaite relacje z komórkami układu odpornościowego, który może je niszczyć lub wspomagać ich wzrost [104]. Choć w myszach z niedoborami odporności dochodzi do nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, lecz brak odpowiedzi swoistej może zaburzać relacje układ odpornościowy – nowotwór.

Dlatego coraz częściej wykorzystywane są tzw. myszy humanizowane, w których komórki lub tkanki zastępowane są ich ludzkimi odpowiednikami. M.in. stworzono model, w którym z podanych zwierzętom ludzkich hematopoetycznych komórek macierzystych rozwinął się funkcjonalny układ odpornościowy. Mysiom takim można przeszczepić fragmentów ludzkich tkanek lub podać komórki, które nie zostaną rozpoznane jako obce gatunkowo. Pozwala to m.in. na badanie oddziaływania całego układu immunologicznego na komórki nowotworów [105]–[107].

Podawane myszom komórki nowotworowe pochodzą z wyprowadzonych linii nowotworowych lub bezpośrednio od pacjentów (modele PDX - patient-derived xenograft). Wszczepienie fragmentu guza lub części jego komórek pobranych od pacjenta stanowi dobry model do badania skuteczności terapii w danym typie nowotworu i odzwierciedla jego zróżnicowanie. Pozwala też lepiej poznać mechanizmy i oddziaływania jakie w nim zachodzą. Model ten nie jest jednak wolny od wad. Komórki nowotworowe pobrane od pacjenta w nowym środowisku bardzo

szybko mogą zmienić swój fenotyp lub może dojść do selekcji danej grupy komórek. Podawane są one do myszy przeważnie heterotropowo, co również może wpływać na różnice w rozwoju guza czy jego wrażliwości na terapię w porównaniu do tego co obserwuje się u człowieka [105]. Dodatkowym problemem jest fakt, że w przeważającej liczbie badań myszom podaje się na raz dużą ilość komórek nowotworowych. Nie oddaje to sytuacji jaka ma miejsce przy rozwoju guzów u ludzi, kiedy jest to proces etapowy, dużo wolniejszy. Wpływa to nie tylko na sposób wzrostu podanego myszom guza, ale także na jego ukrwienie i oddziaływanie z układem immunologicznym. Jako rozwiązanie tego problemu podejmowane są próby wszczepiania np. pojedynczych komórek lub stworzonych z ich niewielkiej ilości sfer, zawieszonych w gęstej substancji (np. matrigelu) aby zatrzymać je w miejscu podania. Eksperymenty takie wymagają jednak dużej ilości czasu, a u części zwierząt komórki nowotworowe mogą w ogóle nie podjąć proliferacji [108], [109].

Innym rozwiązaniem tego problemu są badania na mysich modeli ludzkich nowotworów (tzw. myszy GEM – *genetically-engineered mice*). Tworzone są one metodami inżynierii genetycznej poprzez: wprowadzenie do ich genomu transgenu, który ulega integracji w konkretnie określonym miejscu (myszy knock-in) lub przypadkowym miejscu, inaktywacji danego genu (myszy knock-out) w całym organizmie lub jedynie określonej tkance lub typie komórek (conditional knock-out). Czasem hamowana jest także ekspresja lub degradowane jest mRNA dla danego genu (myszy knock down) [102], [106]. Zwierzęta takie pozwalają nie tylko badać rolę określonych białek i procesów na rozwój nowotworów, ale przede wszystkim mogą stanowić model do badania rozwoju ludzkich guzów, których powstawanie związane jest np. z konkretną mutacją genetyczną. Guzy pojawiają u takich zwierząt spontanicznie lub wywołane są określonym czynnikiem, bez konieczności podawania im komórek nowotworowych. Pozwala to śledzić m.in. częstość występowania guza, początki i kolejne etapy jego rozwoju czy tempo jego wzrostu [102].

### 3.2. Danio pręgowane

Danio pręgowane to gatunek niewielkiej, mierzącej od ok. 2,5- 4 cm, tropikalnej ryby pochodzący z południowej Azji. Choć wykorzystywana jest ona zwykle w charakterze ozdobnej ryby akwariowej, znalazła zastosowanie w badaniach naukowych (po raz pierwszy jako organizm modelowy wykorzystana została pod koniec lat 60. XX wieku). Danio pręgowane posiada szereg zalet, które wpływają na jego rosnącą popularność w badaniach biologicznych. Są to m.in.:

- wielkość – są małe, ale żywotne i wytrzymałe,
- sposób hodowli – są tańsze w utrzymaniu niż myszy, mają dużo mniejsze wymagania przestrzenne i hodowlane,
- bardzo niewielkie ograniczenia prawne przy prowadzonych na nich badaniach,
- tempo rozwoju – rozwój embrionalny następuje w ciągu kilkadziesiątu godzin, a za osobniki dorosłe uważa się te mające ok. 3 miesiące,
- ilość potomstwa – składają jaja w dużych ilościach w ok. tygodniowych odstępach, co dostarcza dużo materiału do badań,
- jajorodność, co ułatwia badania nad rozwojem embrionalnym,
- wygląd osobników – zarodki, embriony, a także dorosłe osobniki z odpowiednią mutacją są przezroczyste, co pozwala na łatwą obserwację organów wewnętrznych, naczyń krwionośnych, czy rozwoju i metastazy nowotworów,
- poznany genom – w pełni zsekwencjonowany w 2013 roku, co pozwoliło na stworzenie mutacji w ponad 14 tys. genów w celu badania ich roli,
- podobieństwo genetyczne – podobna struktura genetyczna jak u ssaków, występowanie co najmniej 70% ortologów genów ludzkich i danio pręgowanego, a co więcej 84% genów związanych z chorobami u ludzi ma swoje odpowiedniki u danio,
- bardzo łatwa modyfikacja genetyczna na poziomie zarodka i embrionu,
- wyjątkowe zdolności regeneracyjne (szczególnie serca) co pozwala na badanie podstaw procesów naprawy tkanek i gojenia się ran [110]–[112].

Wykorzystywanie modelu danio przegowane do badań nad chorobami człowieka ma pewne oczywiste ograniczenia. Niektóre organy ważne u ludzi, u danio w ogóle się nie rozwijają (gruczoł sutkowy, prostata) lub są znacznie mniej rozwinięte (nerki) [113]. W genomie tej ryby występuje wiele zduplikowanych genów, co może prowadzić do ich innej aktywności bądź znaczenia (np. w przypadków genów supresorowych nowotworów), wiele genów także różni się budową [113]. Kolejnym utrudnieniem jest niewielka baza dostępnych handlowo przeciwciał, co znacząco ogranicza badania związane z ekspresją białek w tym modelu. Mimo wszystko, wykorzystanie tego organizmu w badaniach ma coraz więcej zwolenników, przede wszystkim ze względu na stosunkową niską cenę eksperymentów i ilość informacji jaką można z nich uzyskać. Pozytywne i rokujące wyniki potwierdzone są najczęściej na modelu mysim. Obecnie, danio przegowane wykorzystuje się przede wszystkim w badaniach nad rozwojem embrionalnym, neurobiologią, regeneracją, toksykologią oraz nowotworami [110]–[113].

Danio przegowane jako model zwierzęcy używany jest w zdywersyfikowanych badaniach nowotworowych wykorzystujących różne stadia rozwoju tej ryby. W stadium embrionalnym i pierwszych dniach życia wykonywane są doświadczenia z zakresu stabilności genetycznej i zaburzeń cyklu komórkowego, a także badania dotyczące komórek macierzystych. Ze względu na brak rozwiniętej jeszcze odporności swoistej, wykonywane są także badania nad implantowanymi do embrionów ssaczymi komórkami nowotworowymi. Dotyczą one zdolności do rozwoju guza w nowej niszy, przemieszczania się jego komórek w organizmie, angiogenezy nowotworowej oraz skuteczności substancji chemicznych i modyfikacji genetycznych w zwalczaniu nowotworów. Komórki nowotworowe o potencjale do przerzutowania, poprzez migrację przez naczynia krwionośne, są w stanie stworzyć mikroprzerzuty w czasie nawet do 24 godzin od ich iniekcji do embrionu. Takiej zdolności nie mają wstrzykiwane komórki prawidłowe lub nowotworowe, które nie przerzutuują [114].

Eksperymenty, z wykorzystaniem embrionów danio przegowanego, dotyczące proliferacji, migracji, potencjału metastatycznego czy wrażliwości komórek nowotworowych na leki, były wykonywane m.in. na komórkach nowotworów: płuc, trzustki, jajnika, piersi, prostaty, wątroby, glejaka, czerniaka, siatkówczaka i białaczek [115]. W stadium młodzieńczym tej ryby badane są pierwsze momenty onkogenezy i progresji nowotworów (w modelach transgenicznym lub w modelach opartych na indukowanej mutagenezie). W dorosłych osobnikach badane są procesy nowotworzenia i metastazy, porównywane są profile DNA i RNA nowotworów u ryb i ludzi [113].

U danio przegowanego obserwowany jest proces samoistnego nowotworzenia, jest on jednak stosunkowo rzadki oraz występuje w większości u starszych już osobników. Aby móc badać ten proces na większą skalę generowane są modele transgeniczne z nadekspresją różnych typów onkogenów lub takie, w których hamowana lub ograniczana jest aktywność supresorów. Modele te obejmują m.in.: czerniaki, nowotwory trzustki, wątroby, białaczki, mięsaki, nerwiaki zarodkowe [113]. Szczególnie dużo badań prowadzi się nad rozwojem i przerzutowaniem czerniaków. Ciemny kolor melanocytów w melanosomach i brak transportu melaniny do keratynocytów (jak u ssaków) stanowi godny zaufania marker umożliwiający przyżyciowe obrazowanie tych komórek, również podczas nowotworzenia i przerzutowania. Dodatkowo mutacje genów odpowiadających za pigmentację, różnicowanie i funkcję melanocytów wywołują te same efekty jak u ssaków, co sprawia, że danio przegowane jest dobrym modelem zarówno do badań genetycznych nad tym nowotworem jak i tych nad skutecznością różnych terapeutyków w jego leczeniu [116].

## CEL PRACY

Badania nad białkiem ADAM17, jego substratami i funkcją trwają w Zakładzie Biochemii Komórki od wielu lat. Jednym z wątków badawczych, które podjęto, była próba określenia jego roli w rozwoju nowotworów. Przeprowadzone dotychczas eksperymenty wykazały, iż ograniczenie ekspresji białka ADAM17 prowadzi do spowolnienia tempa wzrostu mysiego nowotworu jelita [4]. Jednak oprócz samej wielkości guza, w kontekście leczenia pacjentów i oceny stopnia zaawansowania choroby nowotworowej, niezwykle istotna jest jego zdolność do przerzutowania. W poniższej pracy skupiono się więc na procesach towarzyszących wzrostowi guzów: angiogenezie oraz limfangiogenezie (które prowadzą do powstania dróg rozprzestrzeniania się w organizmie komórek nowotworowych), a także zdolności samych komórek nowotworowych do przerzutowania w zależności od poziomu ekspresji białka ADAM17.

Celem poniższej pracy było więc:

1. Określenie wpływu białka ADAM17 na komórki naczyń limfatycznych i proces limfangiogenezy.
2. Zbadanie roli białka ADAM17 we wzroście i przerzutowaniu mysiego czerniaka.
3. Sprawdzenie, czy zahamowanie aktywności białka ADAM17 w środowisku guza nowotworowego wpływa na jego rozwój i metastazę.

## MATERIAŁY I METODY

### 1. Linie komórek eukariotycznych:

- B16F10 – linia czerniaka mysiego, wyprowadzona ze szczepu myszy C57BL/6J, ATCC CRL-6475.
- hLEC – linia ludzkich komórek śródbłonka naczyń limfatycznych (*human dermal lymphatic endothelial cell line*) były darem od prof. Dentscho Kerjaschki (Uniwersytet Medyczny w Wiedniu, Austria). Komórki zostały przez twórców unieśmiertelnione przy pomocy białkowej podjednostki telomerazy jako populacja komórek śródbłonkowych, spośród których wyselekcjonowano komórki naczyń limfatycznych.
- MBE – linia mysich komórek śródbłonka włóściwek mózgu była darem od dr. Roberta Auerbacha (Uniwersytet Wisconsin, Madison, USA).
- MSI – linia mysich, unieśmiertelnionych komórek śródbłonka trzustki – ATCC CRL-2279.
- Caco-2 - linia nowotworowych ludzkich komórek nabłonka jelita – ATCC HTB-37.
- MCF-7 – linia nowotworowych ludzkich komórek nabłonka płuc – ATCC HTB-22.
- THP-1 – linia nowotworowa ludzkich monocytów – ATCC TIB-202.

### 2. Odczynniki do hodowli i stymulacji komórkowych

- Pożywki do hodowli komórkowych: DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) z dodatkiem glukozy 4,5g/l i L-glutaminą oraz EGM2 (*Endothelial Growth Medium*) – Lonza.
- Dodatki do pożywek: płodowa surowica wołowa (*fetal bovine serum, FBS*), suplementy do pożywki dla komórek śródbłonka (*Endothelial BulletKit*) – Lonza, albumina – Bioshop, transferyna – Sigma.

- Antybiotyki: puromycyna – Sigma, Penicylina-streptomycyna – Bioshop,
- VEGFC (dar od prof. Melody Schwarz, EPFL Lozanna)
- Odczynniki używane przy hodowlach trójwymiarowych (3D): agar o niskiej temperaturze topnienia, metyloceluloza - Sigma, kolagen – Gibco, matrigel – BD Bioscience
- Odczynniki używane przy trawieniu tkanek mysich przeznaczonych do hodowli: kolagenaza C, DNaza I – Sigma
- Inne odczynniki: akutaza - Promega, tripsyna/EDTA 10× stężona – Sigma, DMSO – Bioshop
- Naczynia do hodowli komórkowych, pipety serologiczne – BD Bioscience

### 3. Lentiwirusowe sekwencje shRNA

Wykorzystane w badaniach lentiwirusy zawierające sekwencje shRNA (Mission shRNA) kupiono w firmie Sigma (**Tabela 2**). Jako kontrolę wykorzystano lentiwirus zawierający sekwencję, która nie odpowiada żadnemu genowi pochodzącemu spośród znanych gatunków organizmów (SHC216V).

**Tabela 2. Zestawienie lentiwirusowych sekwencji shRNA**

Nazwa	Sekwencja	Specyficzność gatunkowa
<i>mshRNA 1</i> TRCN0000031953	CCGGGCGACACACTTAGAAACATTACTCGAGT AATGTTTCTAAGTGTGTCGCTTTTTG	mysz
<i>mshRNA 2</i> TRCN0000031949	CCGGCGCGACTTGAGAAGCTTGATTCTCGAGA ATCAAGCTTCTCAAGTCGCGTTTTTG	mysz
<i>shRNA 1</i> TRCN0000294262	CCGGGAAGGTGAATCTAGCTTATTTCTCGAGAA ATAAGCTAGATTCACCTTCTTTTTG	człowiek
<i>shRNA 2</i> TRCN0000311680	CCGGCCAGCAGCATTTCGGTAAGAAACTCGAGT TTCTTACCGAATGCTGCTGGTTTTTG	człowiek
<i>shRNA 3</i> TRCN0000286913	CCGGCCTATGTCGATGCTGAACAAACTCGAGTT TGTCAGCATCGACATAGGTTTTTG	człowiek

#### 4. Przeciwciała

Stosowane podczas badań przeciwciała wraz z metodami badawczymi do jakich je używano zebrano w tabeli (Tabela 3).

**Tabela 3. Zestawienie używanych w pracy przeciwciał.**

<i>Target</i>	<i>Rodzaj/ /sprzęgnięte z</i>	<i>Używane rozcień/ stężenie</i>	<i>Firma</i>	<i>Metoda</i>
<i>Przeciwciała I-rzędowe</i>				
hADAM17	Królicze, P, IgG	1:5000	Abcam	WB <sup>2</sup> (u.w.) <sup>3</sup>
hHER1	Królicze, M <sup>1</sup> , IgG	1:100 000	Abcam	WB (u.w.)
hHER2	Królicze, P, IgG	1:1000	Abcam	WB (u.w.)
h integryna α1	Mysie, M, IgG	2 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology	C
kontrola izotypowa m/h β-aktyna	Mysie, IgG1κ Królicze, M, IgG	2 µg/ml 1:5000	eBioscience CellSignaling Tech	C WB (u.w.)
mADAM17	Królicze, P, IgG	1:3000	Thermo Scientific	WB (u.w.)
mBIG-H3	Mysie, M, IgG	1:1000	Proteintech	WB
mHB-EGF	Mysie, M, IgG	1.5 µg/ml	MyBioSource	WB
mCD31	Chomicze, IgG	0,5 µg (n.p.) <sup>4</sup>	Sigma	ICH
mLyve-1	Królicze, P, IgG	0,2 µg (n.p.)	Abcam	ICH
mCD45	Rat, IgG2b/Brilliant Violet 650	0,2 µg (n.p.)	BioLegend	C
mCD3	Rat, IgG2b/Alexa Fluor 594	0,2 µg (n.p.) <sup>4</sup>	BioLegend	C
mCD4	Rat, IgG2b/, FITC	0,2 µg (n.p.) <sup>4</sup>	BioLegend	C
mCD8a	Rat, IgG2b/ PerCp/Cy5.5	0,6 µg (n.p.) <sup>4</sup>	BioLegend	C
mCD25	Rat, IgG2b/BV5-10A	0,2 µg (n.p.) <sup>4</sup>	BioLegend	C
FoxP3	Rat, IgG2b/APC	0,2 µg (n.p.) <sup>4</sup>	BioLegend	C
mCD16/CD32	Rat, IgG2,	0,2 µg (n.p.) <sup>4</sup>	BioLegend	C
mADAM17 A9(B8)	Ludzkie, IgG2	10 µg/g – <i>in vivo</i> , 200 ng/ml, <i>in vitro</i>	Dr. Hang Fai Kwok (Makao)	BA
Kontrola izotypowa izolowana z osocza osoby chorej na białaczkę	Ludzkie, IgG2	10 µg/g – <i>in vivo</i> 200 ng/ml <i>in vitro</i>	Sigma-Aldrich	BA

<i>Target</i>	<i>Rodzaj/ /sprzęgnięte z</i>	<i>Używane rozcień/ stężenie</i>	<i>Firma</i>	<i>Metoda</i>
<i>Przeciwciała II-rzędowe</i>				
Anty-królicze	Kozie, IgG /peroksydaza chrzanowa (HRP)	1:40000	Sigma-Aldrich	WB
Anty-mysie	Kozie, Ig/ peroksydaza chrzanowa (HRP)	1:20000	BD Pharminogen	WB
Anty-mysie	Kozie/FITC	1:100	Jackson Immuno Research Lab.	C
Anty-chomicze	Królicze, IgG/ Alexa fluor 546	1:100	BD	C
Anty-królicze	Kozie/FITC	1:200	BD	C

<sup>1</sup> P, poliklonalne; M, monoklonalne, <sup>2</sup> WB – Western blotting, C – Cytometria przepływowa, ICH – Barwienie immunochemiczne, BA – Blokowanie aktywności biologicznej, <sup>3</sup> używane wielokrotnie, <sup>4</sup> na próbkę w przypadku ICH i na 1 mln komórek w objętości 100 µl w metodzie C.

## 5. Startery

Wykorzystywane w tej pracy startery zostały zsyntetyzowane przez firmę Genomed (Tabela 4).

**Tabela 4. Sekwencje wykorzystanych starterów.**

<i>Nazwa genu</i>	<i>Starter lewy</i>	<i>Starter prawy</i>
<i>hEF2</i>	CGAGATCAAGGACAGTGTGG	AAGGTAGATGGGCTCCATGA
<i>hADAM17</i>	TGCAGTGACAGGAACAGTCC	GGATGCATTTCCCATCCTTA
<i>hEGFR</i>	AGTGACTGCTGCCACAACC	GGTGGCACCAAAGCTGTAATT
<i>hHER2</i>	ATAGACACCAACCGCTCTCG	ACAGATGCCACTGTGGTTGA
<i>hHER3</i>	GCCAATGAGTTCACCAGGAT	ACGTGGCCGATTAAGTGTTT
<i>hHER4</i>	ATGGCCTTCCAACATGACTC	CACCTGCCATCACATTGTTT
<i>hBIG-H3</i>	ATGCTTGAAGGTAACGGCCA	CGCCTTCCCGTTGATAGTGA
<i>hTGFβ1</i>	AGTGGACATCAACGGGTTTCTAG	CATGAGAAGCAGGAAAGGCC
<i>hTGFβ2</i>	CTGTCCCTGCTGCACTTTTGTGA	TGTGGAGGTGCCATCAATACCT
<i>hTGFβ3</i>	GGACTTCGGCCACATCAAGA	ATAGGGGACGTGGGTCATCA
<i>hOAS1</i>	TTCTCCACCTGCTTCACAGA	TGGGCTGTGTTGAAATGTGT
<i>mAdam17</i>	CCAGGAGCGCAGCAACAAGGT	TCCTATCACTGCACTGCACACCCG
<i>mEF2</i>	CCACGGCAAGTCCACGCTGAC	AGAAGAGGGAGATGGCGGTGGATT
<i>mEgfr</i>	CCCAAGGACCACTTCACAGT	ACACTGCTGGTGTGCTGAC
<i>mErbB2</i>	AGGGGCTGGCTCCGATGTGTTT	GGCTGGTTCACATACTCGGGCT
<i>mErbB3</i>	CCACGTGGGAGCCAGAGTCTTT	TTCAGCCTCAGAGCCCGTCACA
<i>mErbB4</i>	ACTGCTGCTTAACTGGTGTG	ACACTCCAGAGCCATCCATT
<i>mTYR</i>	AGTTTACCCAGAAGCCAATGC	CGACTGGCCTTGTTCGAAGT

<i>mTYR2</i>	TGCAAGTGGGGTAATAGGAAAGT	AGTGCTTAGACATGCATCCAGTA
<i>mHB-EGF</i>	TGAGAAGTCCCACGATGACA	GACCCATGCCTCAGGAAATA

h – sekwencje wykorzystywane dla genów ludzkich, m – sekwencje wykorzystywane dla genów mysich. Sekwencje zapisano w kierunku 5' - 3'.

## 6. Odczynniki do PCR i RT-qPCR

Polimeraza OptiTaq, mieszanina 5'-trifosforanów deoksyrybonukleozydów (dNTPs) – Eurx, odwrotna transkryptaza wirusa mysiej białaczki Moloneya (M-MLV) – Promega, oligo(dT) – Genomed, KAPA™ SYBR qPCR Kit – Kapa Biosystems, Real-time 2xHS-PCR Master Mix SYBR A – A&A Biotechnology, agaroz – Bioshop, bromek etydydy – Sigma Aldrich

## 7. Odczynniki wykorzystywane w barwieniach komórkowych i tkankowych

Fiolet krystaliczny, Pkh26 red fluorescent cell linker kit for membrane labelling, płyn Bouina, CM-Dil, DAPI – Sigma

## 8. Zestawy

- Alpha/Beta Integrin-Mediated Cell Adhesion Array Kit (Merck-Millipore).
- Human Soluble Receptor Array (R&D Systems)
- Testy ELISA
  - VEGF-A ELISA DuoSet - R&D Systems
  - HB-EGF - Abcam
  - TGFβ2 - R&D Systems

## 9. Zwierzęta

**A) Myszy** – Wykorzystywane w eksperymentach myszy szczepu C57OlaHsd lub C57BL/6J były urodzone i hodowane w Zwierzętarni Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii. Eksperymenty prowadzono na zwierzętach w wieku od 6-8 tygodni.

**B) Ryby** - Wykorzystywaną w eksperymentach transgeniczną linię ryb tg(casper fli1a:egfp) uzyskano z Międzynarodowego Centrum Hodowli Danio przegowanego (ZIRC, Zebrafish International Resource Center). Ryby tej linii charakteryzują się przezroczystością i ekspresją białka wzmocnionej zielonej fluorescencji (eGFP, *Enhanced Green Fluorescent Protein*) pod komórkowo-specyficznym śródbłonkowym promotorem fli1a. Hodowla ryb, parowanie i pozyskiwanie embrionów wykonywane było w Laboratorium Uniwersytetu w Murcji w Hiszpanii.

## 10. Inne odczynniki

Wszystkie podstawowe odczynniki chemiczne (organiczne i nieorganiczne) kupiono w firmie Polskie Odczynniki Chemiczne (POCH), Sigma-Aldrich lub Bioshop.

## **Metody *in vitro*:**

### 11. Hodowle komórkowe

Linie komórkowe hodowano rutynowo w pożywce hodowlanej DMEM z zawartością D-glukozy 4,5 g/l i dodatkiem FBS, odpowiednio 5% dla komórek nowotworowych i 10% dla komórek linii śródbłonnków, chyba że opisano inaczej. W przypadku hodowli komórek nowotworowych izolowanych z guza pierwotnego oraz z narządów, stosowano pożywkę DMEM z 10% FBS oraz dodatkiem antybiotyków: penicyliny i streptomycyny (PENSTREP). Linie nowotworowe pasażowano 3 razy w tygodniu, kiedy osiągnęły ok 90% pokrycia płytki metodą enzymatyczną z zastosowaniem trypsyny lub, w eksperymentach związanych z adhezją międzykomórkową - akutazy. Komórki LEC hodowano w suplementowanym medium wzrostowym EGM2 (EGM2 BulletKit) z dodatkiem 2% FBS oraz puromycyny (0,5 µg/ml) maksymalnie do 30 pasażu [117]. Suplementami były: FGF-B, VEGFA, IGF-1, witamina C, EGF oraz heparyna. W określonych eksperymentach stosowano medium, dalej zwane podstawowym, w którym medium EGM2 z 2% FBS suplementowano tylko witaminą

C oraz heparyną. W tych eksperymentach, na 24 h przed ich rozpoczęciem, wymieniano medium z wzrostowego na podstawowe. Komórki pasażowano z użyciem akutazy, 2 razy w tygodniu, 1:3.

Wszystkie linie komórkowe hodowano w warunkach: 37°C w obecności 5% CO<sub>2</sub> i przy 95% wilgotności. Raz na 4 tygodnie wykonywano test PCR, aby wykluczyć obecność mykoplazmy w hodowlach.

## **12. Transdukcja komórek lentiwirusami w celu wyciszenia ekspresji genu kodującego ADAM17**

Transdukcję lentiwirusami przeprowadzano zgodnie z procedurami zapewniającymi bezpieczeństwo pracy. Komórki B16F10 oraz LEC wysiewano w ilości odpowiednio  $2 \times 10^3$  i  $4 \times 10^3$  na dołki płytki 12-dołkowej. Po zaadherowaniu komórek, medium wymieniano i dodawano polibren (8 µg/ml) oraz lentiwirusy. Wstępne wyniki pozwoliły ustalić, że najwyższy poziom wyciszenia ekspresji *Adam17* w B16F10 uzyskano transdukując komórki mieszaniną wirusów zawierających sekwencje shRNA1 (MOI 3) oraz shRNA2 (MOI 3) (Tabela 2). W przypadku komórek LEC największe wyciszenie osiągnięto dzięki transdukcji komórek wirusem zawierającym sekwencję shRNA1 (MOI 5) (Tabela 2). W celu potwierdzenia specyficzności efektów działania sekwencji shRNA1 w komórkach LEC przygotowano także stabilną linię, w której transdukowano komórki mieszaniną lentiwirusów z sekwencjami shRNA2 i shRNA3 targetującymi ludzki *ADAM17*. Jako kontrolę przeprowadzono transdukcję komórek lentiwirusem zawierającym shRNA z sekwencją niekodującą. Stabilnie wyciszone linie otrzymano poprzez presję antybiotykową puromycyną (0,5 µg/ml). Wydajność wyciszenia oceniano za pomocą metod ilościowego PCR połączonego z reakcją odwrotnej transkrypcji (RT-qPCR) oraz Western blotting.

### **13. Liza komórek do analizy Western blotting**

Lizę komórek przeprowadzano na dwa sposoby:

A) Komórki LEC wysiewano na płytki 6-dółkowe ( $5 \times 10^5$  na dółek). Po zaadherowaniu komórek, pożywkę zmieniano na medium podstawowe. Po 24 lub 48 h, płytki płukano dwukrotnie PBS-em, po czym do dołków dodawano po 80  $\mu$ l buforu obciążającego do próbek SDS-PAGE (0,312 M Tris-HCl pH 6,8; 30% glicerol; 12,5%  $\beta$ -merkaptotanol; 10% (w/v) SDS; 0,01% błękit bromofenolowy), rozcieńczonego wodą w stosunku 1:4. Komórki zeskrobywano przy użyciu tzw. „skrobaka”, przenoszono do mikropróbówek i denaturowano przez 10 min w 95°C. Lizaty porcjowano i zamrażano w -20°C lub od razu nakładano na żel SDS-PAGE. W niektórych eksperymentach stosowano dla tych komórek także procedurę B.

B) Komórki trypsynizowano, płukano dwukrotnie PBS-em, zawieszano w buforze lizującym RIPA z dodatkiem inhibitorów proteaz (Sigma), inkubowano przez ok. 20 min na lodzie, po czym zamrażano w -20°C do czasu dalszej analizy. Po rozmrożeniu, lizaty wirowano (15 s, 10 000 g), nadsącz przynoszono do nowych mikropróbówek i oznaczano stężenie białka metodą z zastosowaniem kwasu bitynchoninowego (BCA), zgodnie z protokołem [118]. Równe ilości białka dodawano do buforu obciążającego do próbek SDS-PAGE, denaturowano przez 10 min w 95°C i nakładano na żel poliakrylamidowy.

### **14. Elektroforeza białka techniką SDS-PAGE, transfer mokry białek na membranę PVDF oraz immunodetekcja białek metodą Western blotting**

Elektroforezę, transfer białek na membranę oraz analizę Western blotting przeprowadzono zgodnie z protokołem [119] z niewielkimi modyfikacjami. Lizaty białkowe w ilości 20-50  $\mu$ g (metoda lizy – p. 13B) lub 20-40  $\mu$ l (metoda lizy – p. 13A) rozdzielano elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym 7, 8% lub 10% w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) w systemie Laemmli'ego. Rozdzielone białka przenoszono na membranę PVDF (Merck Millipore) metodą mokrego transferu

w 4°C przez noc przy napięciu 35V. Do blokowania użyto 5% roztworu odtłuszczonego mleka w proszku w buforze TBS. Przeciwciała I- i II- rzędowe (Tabela 2) były rozpuszczane w 2% roztworze mleka w buforze TBS z dodatkiem 0,05% Tween. Do uwidocznienia białek stosowano substrat chemiluminescencyjny dla HRP (ThermoFisher Scientific); membrany inkubowano ok. 5 min z substratem, po czym obraz analizowano przy użyciu aparatu i programu do detekcji Fusion-Fx (Vilber Lourmat). W niektórych przypadkach, membranę po detekcji przeciwciał barwiono barwnikiem Coomassie Brilliant Blue (Sigma) zgodnie ze standardowym protokołem [120].

## **15. Izolacja RNA z hodowli komórkowych**

RNA z komórek izolowano metodą bazującą na standardowej procedurze Chomczyńskiego i Sacchi dostosowując podane objętości dodawanych substancji do 300 lub 500 µl lizatu [121]. Podczas izolacji dodawano dwukrotnie więcej chloroformu niż w protokole. Wyizolowany precypitat RNA zawieszano w wodzie wolnej od nukleaz (Sigma) i zamrażano w -20°C. W próbkach oznaczano spektrofotometrycznie stężenie RNA i czystość preparatu wykorzystując spektrofotometr ND-1000 (NanoDrop Technologies) zgodnie z protokołem [121].

## **16. Odwrotna transkrypcja i analiza ekspresji genów metodą ilościowego PCR**

Wyizolowane RNA (1000 lub 500 ng) przepisywano na cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji (zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta odwrotnej transkryptazy) dodając starterów oligo-dT. Parametry programu: 65°C – 5 min, 37°C – 60 min, 70°C – 15 min, 4°C – ∞. Uzyskane cDNA amplifikowano w reakcji PCR w czasie rzeczywistym z użyciem zestawów odczynników zawierających polimerazę KAPA SYBR DNA (Materiały, p. 6) postępując zgodnie z protokołem producenta zestawu. Reakcję przeprowadzano w objętości 10 µl w termocyklerze PCR Eco (Illumina) stosując program: wstępna denaturacja 10 min – 95°C, 40 cykli (15 s – 95°C,

15 s – 60°C, 15 s – 72°C), 72°C – 5 min. Jako cDNA referencyjne wykorzystano cDNA kodujące eEF2. Wyniki opracowano w programie Illumina wykorzystując metodę delta-delta Ct. Oznaczenia RT-qPCR wykonywano w duplikatach.

## **17. Analiza ekspresji genów metodą PCR**

Aby namnożyć daną sekwencję DNA lub cDNA stosowano PCR z użyciem polimerazy OptiTaQ zgodnie z zaleceniami producenta polimerazy. Temperatury przyłączania starterów optymalizowano doświadczalnie. Produkt reakcji PCR rozdzielano elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (0,5 µg/ml) w buforze TAE [119] po czym wykonywano zdjęcie żelu w świetle UV w aparacie do dokumentacji żeli Quantum ST5 (Vilber Lourmat).

## **18. Analiza proliferacji komórek**

### **A). MTT**

Komórki B16F10 lub LEC wysiewano na płytki 96-dołkowe (odpowiednio  $10^3$  i  $3 \times 10^3$  komórek na dołek) i hodowano w różnych warunkach. Po 24, 48 lub 72 h mierzono aktywność metaboliczną komórek stosując test MTT [122]. Absorbancję produktu redukcji MTT (rozpuszczonego formazanu), która odzwierciedla liczbę i żywotność komórek, mierzono przy długości fali 545 nm na czytniku mikropłytek VersaMax przy wykorzystaniu oprogramowania SoftMax®Pro (Molecular Devices). W niektórych doświadczeniach do określenia liczby komórek wykorzystywano pokrewny test z użyciem alamarBlue. Do hodowli dodawano medium z jego 10% dodatkiem i inkubowano około 3 h. Po tym czasie mierzono sygnał fluorescencji produktu redukcji barwnika w medium przy długościach fali 530/590 (wzbudzenie/emisja) na czytniku fluorescencji Synergy H1 Hybrid Reader (BioTek Instruments).

## **B) Analiza cyklu komórkowego**

Sublinie komórek B16F10 i LEC wysiewano w ilościach odpowiednio  $5 \times 10^5$  i  $1 \times 10^6$  na płytki o średnicy 10 cm. Po 24 lub 48 h hodowli zbierano je z użyciem akutazy, płukano PBS-em i utrwalano w 70% etanolu przez co najmniej 24 h. Po dwukrotnym płukaniu komórek buforem PBS, dodawano RNazę ( $40 \mu\text{g/ml}$ ) oraz jodek propidyny (PI,  $50 \mu\text{g/ml}$ ) i inkubowano przez 45 min. Fluorescencję mierzono w kanale FL-2 (liniowo) na cytometrze przepływowym FACS Calibur (BD Bioscience). Analizę cyklu wykonywano w programie FlowJo v10.0.7 (FlowJo LLC) [123].

## **C) Wzrost pojedynczych komórek**

Komórki B16F10 wysiewano na szalki o średnicy 10 cm ( $1 \times 10^3$  komórek na szalkę) w medium DMEM, 10% FBS. Raz w tygodniu medium wymieniano lub (w określonych eksperymentach) do hodowli dodawano 5 ml świeżego medium, 5% FBS oraz 5 ml odwirowanego (5 min,  $3000 \times g$ ) medium z nad komórek kontrolnych B16F10 po 24 h ich hodowli w medium DMEM 10% (komórki wysiewane były na płytki o średnicy 10 cm w liczbie  $3 \times 10^6$ ). Po 14 lub 21 dniach hodowle płukano PBS-em, fotografowano ok 10-15 reprezentatywnych kolonii komórek pod mikroskopem Leica DFC 450C, a następnie komórki barwiono 0,01% roztworem fioletu krystalicznego w 10% etanolu przez 15 min w temperaturze pokojowej. Po usunięciu roztworu barwiącego, szalki fotografowano w świetle białym przy użyciu aparatu do analizy obrazu Fusion-Fx, a następnie liczono kolonie.

## **D) Wzrost komórek w agarze**

Zdolność do wzrostu komórek w sposób niezależny od podłoża oceniano poprzez test wzrostu w agarze według metody Pluznika i Sachsa [124] z niewielkimi modyfikacjami. Test wykonywano na szalkach 24-dołkowych. Agar o niskiej temperaturze topnienia – 0,6% (dolna warstwa) i 0,3% (górną warstwą) przygotowano w medium DMEM z 10% FBS. Komórki B16F10 w liczbie  $2 \times 10^3$  lub 25 sferek

(przygotowanych w sposób opisany w punkcie 22), mieszano z 0,3% agarem przed jego dodaniem na szalkę. Na zestalony agar dodawano 200  $\mu$ l medium DMEM z 5% FBS. Hodowle pozostawiano w cieplarni na 7 dni, po czym fotografowano 8-10 kolonii komórek z każdej studni pod mikroskopem Leica DFC 450C i mierzono ich wielkość w programie ImageJ 1.48v (National Institute of Health).

### **19. Analiza stymulacji komórek śródbłonna przez pożywki z nad komórek B16F10**

Komórki B16F10 wysiewano w dużej gęstości na szalki 6-dółkowe ( $5 \times 10^5$  komórek na dołek) w pożywce DMEM z 2% FBS lub w pożywce DMEM bez FBS suplementowanej albuminą (0,5 mg/ml), transferyną (5  $\mu$ g/ml) i selenem (2 ng/ml). Po 24 h medium zbierano i wirowano, aby usunąć martwe komórki B16F10 (5 min, 3000 $\times$ g).

#### **A) Proliferacja**

Media przygotowane zgodnie z powyższym opisem dodawano po 50  $\mu$ l na płytki 96-studniowe z 24 h wcześniej wysianymi komórkami MBE ( $1 \times 10^4$ ) w stosunku 1:1 ze świeżą pożywką (zawierającą suplementowany DMEM). Po 48 h oceniano liczbę i żywotność komórek wykorzystując test MTT (Metody, p. 18A).

#### **B) Tworzenie się struktur pseudokapilarnych na matrygelu**

Na płytki 96-studniowe dodawano po 60  $\mu$ l matrygelu i pozostawiano na ok. 15 min, aby zastygł. Następnie dodawano do studni 80  $\mu$ l zawiesiny zawierającej  $1 \times 10^3$  komórek MBE lub MSI w medium przygotowanym w sposób opisany powyżej zmieszonym 1:1 z świeżym medium DMEM 2% FBS. W niektórych eksperymentach do komórek MBE dodawano inhibitor EGFR1 (AG-1478, Enzo Life Science) w stężeniu 2  $\mu$ M lub inhibitor HER2 (AG-825, Sigma) w stężeniu 10  $\mu$ M albo przeciwciała kontrolne lub hamujące aktywność białka ADAM17 (200 ng/ml). Kontrolę pozytywną dla komórek MSI stanowił dodatek do pożywki VEGFA (20 ng/ml). Płytki z komórkami wstawiano do cieplarki na ok 18 h, po czym wykonywano zdjęcia każdej studni w jej centralnym punkcie.

## 20. Analiza ruchliwości komórek

### A) Test rany

Ruchliwość komórek badano poprzez test rany [125] z niewielkimi modyfikacjami. Komórki B16F10 wysiewano na płytki 6-dołkowe (po  $4 \times 10^5$  na dołek) w medium DMEM z 2% FBS. Po 24 h końcówką p200 wykonywano ranę, po czym hodowle płukano ostrożnie buforem PBS i dodawano świeżą pożywkę z 2% FBS. W niektórych eksperymentach do komórek dodawano 1 ml świeżej pożywki 2%FBS oraz 1 ml z nad hodowli komórek kontrolnych B16F10 w DMEM 2% FBS, którą opisano w punkcie 19. Rany fotografowano w każdym dołku w trzech oznaczonych miejscach tuż po zranieniu (czas 0) oraz 18 h później. Następnie przy użyciu programu ImageJ 1.48v. obliczano początkową powierzchnię rany (**a**) i jej powierzchnię po czasie 18 h (**b**). Stopień zarośnięcia rany (**x**) obliczano według wzoru:  $x (\%) = 100\% - \frac{100b}{a}$ .

### B) Test pierścienia

Badanie ruchu komórek MBE wykonywano dzięki zmodyfikowanej wersji testu rany [126]. Komórki wysiewano na płytki 12-dołkowe ( $10^5$  komórek na dołek), na środku których umieszczono wcześniej sterylny pierścień o średnicy ok. 0,8 cm, w pożywce DMEM 10% FBS. Po 48 h, gdy komórki zarosły całą wolną powierzchnię dołków usuwano pierścień. Zmieniano pożywkę na świeżą: DMEM + 10% FBS lub DMEM zawierający 10% FBS zmieszany w stosunku 1:1 z pożywką zebraną z nad komórek B16F10 (warunki hodowli jak w punkcie 19 z wyjątkiem procentowości dodanego FBS). Stopień zarośnięcia pierścienia po 48 lub 72 h oceniano przy użyciu programu ImageJ 1.48v zgodnie ze wzorem podanym powyżej - w punkcie 20A.

### C) Test ruchu pojedynczych komórek

Komórki LEC ( $5 \times 10^4$ ) wysiewano w medium podstawowym na płytki 6-dołkowe. Po 24 h komórki płukano PBS-em, dodawano świeże medium podstawowe, a następnie płytkę umieszczano w specjalnej komorze (warunki: 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) połączonej

z mikroskopem Leica DM IRE 2. Ustalonym pozycjom na płytce (3 na dołek) wykonywano zdjęcia co 5 min przez 6 h. Następnie analizowano przebytą drogę, przemieszczenie i szybkość ruchu 60 komórek w danej studni wykorzystując program Hiro 2.0. W analizie nie uwzględniano komórek dzielących się lub ulegających w którymkolwiek momencie testu apoptozie.

Test ten z niewielkimi modyfikacjami wykorzystano też do badania wpływu inhibitorów receptorów HER na ruch komórek. LEC ( $2 \times 10^4$ ) wysiewano na płytce 12-dołkowej, a do medium, w którym inkubowano komórki podczas eksperymentu dodawano inhibitor EGFR1 (AG-1478, Enzo Life Science) w stężeniu  $1,5 \mu\text{M}$ , inhibitor HER2 (AG-825, Sigma) w stężeniu  $1 \text{ nM}$ , oba te inhibitory lub DMSO ( $0,01$  lub  $0,001\%$ ), stanowiący rozpuszczalnik inhibitorów. Monitorowanie ruchu komórek rozpoczynano po 1 h od dodania inhibitorów. W każdym eksperymencie analizowano ruch 30 komórek.

## **21. Analiza adhezji komórek**

### **A) Adhezja komórek do podłoża i do wybranych białek macierzy zewnątrzkomórkowej**

Komórki LEC ( $2 \times 10^4$ ) wysiewano na płytce 96-dołkowej opłaszczoną fibronektyną ( $20 \mu\text{g/ml}$ , Merck) lub kolagenem typu I ( $50 \mu\text{g/ml}$ , Gibco) lub nieopłaszczoną. Po 10 min (dla kolagenu) i 15 min dla innych podłoży, nieadherowane komórki odpłukiwano poprzez trzykrotne płukanie dołków PBS-em. Ilość komórek analizowano testem z użyciem alamarBlue. W przypadku eksperymentu z cyklicznym peptydem RGD (Tebu-Bio) komórki inkubowano przed testem adhezji przez 45 min w zawiesinie w medium podstawowym, a następnie przez 30 min w medium podstawowym z dodatkiem określonego stężenia peptydu ( $1 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ,  $100 \mu\text{M}$ , lub  $1 \text{ mM}$ ) lub DMSO (w objętości odpowiadającej tej, jaką dodano w przypadku  $1 \text{ mM}$  stężenia peptydu). Czasy adhezji zostały wybrane podczas optymalizacji tak, aby po płukaniach, w studniach zostawała wystarczająca do kwantyfikacji liczba komórek.

### **B) Adhezja komórek LEC do przeciwciał rozpoznających integryny**

Komórki LEC ( $5 \times 10^4$ ), po zebraniu akutazą i 45-min inkubacji w  $37^\circ\text{C}$ , wysiewano na płytki 96-dołkowe opłaszczane przeciwciałami specyficznymi dla różnych łańcuchów integryn (Alpha/Beta Integrin-Mediated Cell Adhesion Array Kit). Płytkę następnie inkubowano przez 1 h w warunkach standardowych, po czym trzykrotnie płukano PBS-em. Zaadherowane komórki barwiono barwnikiem fluorescencyjnym CyQuant GR, a następnie mierzono sygnał fluorescencji przy długościach fali 485/530 (wzbudzenie/emisja) na czytniku fluorescencji Synergy H1 Hybrid Reader.

### **C) Adhezja komórek nowotworowych i komórek układu odpornościowego do komórek LEC**

Komórki MCF-7, Caco-2 i THP-1 wysiewano na płytki tak, aby do następnego dnia ich konfluencja nie przekraczała 80%. W dniu eksperymentu zbierano je akutazą i barwiono barwnikiem fluorescencyjnym PKH26 zgodnie z zaleceniami producenta. Dla komórek Caco-2 dodawano o 1/5 barwnika więcej niż zalecano w protokole. Po zakończonej inkubacji z barwnikiem, komórki płukano PBS-em, zawieszano w PBS-ie z dodatkiem 2% FBS i dodawano na płytki 96-studniowe (po  $3 \times 10^5$  komórek na studnię), na które dzień wcześniej wysiano komórki LEC w medium podstawowym (po  $3 \times 10^4$  komórek na studnię). Po 20 min płytki płukano dwukrotnie PBS-em i do komórek dodawano jego świeżą porcję. Zdjęcia komórek (centralnej części dołka) wykonywano pod mikroskopem fluorescencyjnym Leica DFC 450C. Następnie liczone fluorescencyjne komórki na każdym zdjęciu.

## **22. Przygotowanie sferek z komórek LEC i B16F10**

Aby stworzyć sfery z komórek LEC lub B16F10, inkubowano je w liczbie odpowiednio 750 i 1000 komórek na studnię, przez 12 h na nieadherentnych okrągłodennych płytkach 96-dołkowych z dodatkiem 0.25% (w/o) metylocelulozy

w wodzie. W przypadku komórek LEC inkubowano je wcześniej przez noc w medium podstawowym.

### **23. Ocena limfangiogennych właściwości komórek LEC**

Ocenę właściwości limfangiogennych komórek LEC oceniano przez test „kielkowania” opisany przez Korffa i Augustina [127] z niewielkimi modyfikacjami. Na dołek płytki 24-dołkowej dodawano około 48 sferok w pożywce DMEM zawierającej kolagen typu I (1,5 mg/ml), 0,125% (w/o) metylocelulozę i 15% FBS; pH ~7,4. Po ok. 30 min, na dołki dodawano po 200  $\mu$ l medium podstawowego, z VEGFC (100 ng/ml) lub bez dodatku VEGFC. Po 24 h hodowli sferki (co najmniej dziesięć na studnię) fotografowano pod mikroskopem Leica DFC 450C. Długość i liczbę wypustek w sfotografowanych sferkach analizowano przy pomocy programu Image-Pro Plus (Media Cybernetics).

### **24. Barwienie komórek w celu analizy cytometrycznej białek**

Barwienie białek błonowych i analizę cytometryczną przeprowadzono zgodnie ze standardowym protokołem [128]. Komórki LEC, po nocnej inkubacji w medium podstawowym, barwiono mysimi przeciwciałami anti-integryna  $\alpha$ 1 przez 20 min w 4°C [119]. Jako kontrolę izotypową wykorzystano mysie przeciwciała IgG1 $\kappa$ . Po dwukrotnym płukaniu buforem PBS, do komórek dodano drugorzędowe przeciwciała: kozie anti-mysie sprzęgnięte z FITC (opis przeciwciał w **Tabela 3**) i inkubowano komórki w ciemności przez 15 min. Intensywność sygnału fluorescencji i procent pozytywnych komórek oceniano na cytometrze przepływowym FACScalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson) i analizowano w programie FlowJo.

## 25. Analiza macierzy białkowych

Aby jednocześnie porównać poziom wielu białek w subliniach komórek LEC wykorzystano zestaw Human Soluble Receptor Array (R&D Systems) stosując się do załączonego do niego protokołu z niewielkimi modyfikacjami. Test ten pozwala na szybką i jednoczesną detekcję 119 różnych rozpuszczalnych białek znajdujących się w medium hodowlanym lub lizacie komórkowym. Komórki każdej sublinii LEC wysiewano na 6 płytek o średnicy 10 cm ( $\sim 1.6 \times 10^6$  komórek na płytkę), a po inkubacji przez noc w medium podstawowym, zmieniano je na świeże medium podstawowe (8 ml) i inkubowano przez 16 h. Następnie medium zbierano i zagęszczano przy użyciu probówek wirówkowych z membraną o granicy przepuszczalności 3 kDa (Millipore) do objętości około 600  $\mu$ l. Komórki, po dwukrotnym płukaniu PBS-em, zbierano akutazą, wirowano i lizowano przez 3 h w 4°C w 600  $\mu$ l buforu lizującego dołączonego do testu, do którego dodano inhibitory proteaz Complete (Roche Applied Science). Dołączone do zestawu membrany, na których w określonych miejscach unieruchomione były przeciwciała dla różnych białek, inkubowano w 300  $\mu$ l zagęszczonego medium lub z 300  $\mu$ g lizatów komórkowych (300  $\mu$ l). Sygnał chemiluminescencyjny zbierano w aparacie Fusion FX5 i analizowano w programie BIO1D software (Scientific Software Group).

## 26. Test immunoenzymatyczny ELISA

Aby mierzyć metodą ELISA poziom różnych białek w mediach hodowlanych komórek LEC i B16F10 wysiewano je odpowiednio w ilości  $5 \times 10^5$  i  $3 \times 10^5$  na dołek płytki 6-dółkowej i inkubowano w 2,5 ml medium przez 24 h. Komórki LEC hodowane były przez 24 h przed wysianiem w medium podstawowym. Testy z użyciem komercyjnych zestawów prowadzono zgodnie z instrukcjami producentów.

Przeprowadzono także test ELISA oznaczający poziom ludzkich przeciwciał antymysi ADAM17 A9(B8) oraz kontroli izotypowej (ludzkie IgG2) w surowicy krwi myszy i w lizatach nowotworów, wątroby i śledziony pobranych od zwierząt, którym

podawano dożylnie te przeciwciała. W tym przypadku stosowano standardowy protokół [129]. Lizaty przygotowano tak jak opisano w p. 41. Do opłaszczenia wykorzystano szczurze przeciwciała poliklonalne anty-ludzkie IgG w stężeniu 2 µg/ml, a jako przeciwciała wykrywające – biotynylowane mysie przeciwciała monoklonalne wykrywające ludzkie Ig (w stężeniu 0,5 µg/ml) w parze ze streptawidyną sprzęgniętą z peroksydazą chrzanową. Do analiz użyto 5000x rozcieńczonej surowicy krwi myszy (100 µl) oraz po 12 µg białka lizatów.

## **Doświadczenia *in vivo*:**

### **27. Warunki hodowli myszy**

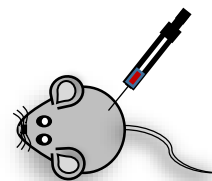
Wszystkie wykorzystywane w eksperymentach myszy, hodowane były w zwierzętarni o standardzie SPF (ang. *specific pathogen free* – zwierzęta wolne od specyficznych patogenów występujących u danego gatunku) na Wydziale Biochemii Biofizyki i Biotechnologii UJ, zgodnie ze wskazówkami zawartymi w dokumencie „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” (Dyrektywa 2010/63/EU Parlamentu Europejskiego). Na wszystkie wykonywane eksperymenty otrzymano zgodę Komisji Bioetycznej UJ, nr: 231/2015 i 134/2016.

### **28. Podawanie myszom komórek nowotworowych i przebieg eksperymentu**

Komórki podawane myszom hodowano do maksymalnie 80% konfluencji, pasażowano przy użyciu akutazy, płukano dwukrotnie buforem PBS, trzykrotnie liczone w komorze Bürkera lub liczniku automatycznym TC20 (Bio-Rad), a następnie zawieszano w takiej objętości sterylnego PBS-u, aby planowana do podania liczba komórek znalazła się w 100 µl.

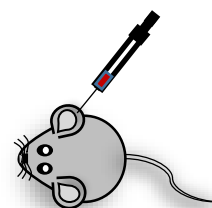
## A) Podanie ortotopowe

1) W celu badania wzrostu i przerzutowania komórek B16F10, myszy szczepiono ortotopowo tj. śródskórnice na grzbiecie po prawej stronie podając  $0,8 \times 10^6$  komórek. Wzrost guzów monitorowano mierząc je suwmiarką elektroniczną co 3 dni. Po 18 dniach od iniekcji, myszom podawano odpowiednią do eutanazji dawkę ketaminy i ksylazyny, po czym pobierano krew z serca, wycinano narządy: węzły chłonne (osobno pobierano węzeł drenujący obszar, na którym rósł nowotwór oraz pozostałe węzły chłonne z prawej strony ciała myszy, płuca, a w niektórych eksperymentach także śledzionę i wątrobę, które następnie mrożono w ciekłym azocie. Izolowano także guz pierwotny, z którego zależnie od eksperymentu część przeznaczano do trawienia i pozyskania komórek w celu analizy cytometrycznej lub hodowli, a część zatapiano w roztworze O.C.T (VWR), zapewniającym odpowiednie środowisko zabezpieczające tkankę podczas przygotowywania skrawków na kriostacie, i mrożono w ciekłym azocie lub od razu przechodzono do barwienia immunohistochemicznego.



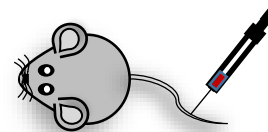
Myszom przed podaniem komórek nowotworowych, a także w 7, 14 i 17 dniu eksperymentu pobierano po ok. 20  $\mu$ l krwi z ogona do mikroprobówek z 0,5 M EDTA. Następnie wykonywano morfologię krwi przy użyciu analizatora hematologicznego HORIBA ABX. Każda grupa eksperymentalna składała się co najmniej z 5 myszy.

2) W celu lepszej obserwacji angiogenezy wokółnowotworowej, komórki podawano także śródskórnice do płata ucha myszy w ilości  $1 \times 10^5$  komórek zawieszonych w 15  $\mu$ l buforu PBS. Wzrost guzów monitorowano, a po 2 tygodniach lub gdy guzy osiągnęły 3 mm średnicy, fotografowano je, a myszy poddawano eutanazji. Każda grupa eksperymentalna składała się co najmniej z 5 myszy.



## B) Podanie dożylne

W celu badania zdolności komórek B16F10 do zasiedlania i przeżywania w nowej niszy, podawano komórki nowotworowe w ilości  $5 \times 10^5$  do żyły ogonowej. Tak podane komórki tworzą guzy



nowotworowe w płucach widoczne jako czarne kolonie. Po 3 tygodniach od iniekcji, myszy poddawano eutanazji, po czym płuca wypełniano barwnikiem Bouina (przez jego iniekcję do tchawicy myszy w ilości ok 200  $\mu$ l – 300  $\mu$ l), izolowano je i umieszczano na 48 h w roztworze tego barwnika. Następnie płukano dwukrotnie 70% etanolem (każde płukanie trwało 24 h) i pozostawiano w etanolu do czasu liczenia kolonii komórek nowotworowych w płucach. W dwóch eksperymentach kolonie liczyły dwie osoby, które nie znały grup badawczych. W dwóch pozostałych eksperymentach kolonie liczyła jedna osoba nieznająca przydziału analizowanych płuc do poszczególnych grup doświadczalnych. Każda grupa eksperymentalna składała się co najmniej z 5 myszy.

## 29. Podawanie przeciwciał hamujących aktywność białka ADAM17 oraz kontroli izotypowej myszom zaszczepionych komórkami B16F10

Myszom, po trzech dniach od iniekcji komórek nowotworowych typu dzikiego podawano dootrzewnowo przeciwciała w stężeniu 10  $\mu$ g/g ich masy. Przeciwciała kontrolne były przed podaniem zwierzętom dializowane w celu usunięcia z nich azydku. W celu utrzymania odpowiedniego stężenia przeciwciał we krwi, myszom, co każde kolejne 3 dni eksperymentu, wstrzykiwano przeciwciała w stężeniu 5  $\mu$ g/g masy ciała. Przed każdym podaniem przeciwciał, pobierano kilka kropel krwi z ogona myszy, z której pozyskiwano surowicę (opisano w punkcie 35), którą następnie mrożono w  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **30. Warunki hodowli danio pręgowanego**

Warunki hodowli danio pręgowanego i dalszych procedur były zgodne ze standardami opisanymi w „The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*)” [130]. Embriony zabijano poprzez uspienie ich w roztworze trykainy (200 µg/ml), a następnie dodanie roztworu podchlorynu sodu (w stosunku 1:5 do objętości wody, końcowe stężenie podchlorynu 6,15%). Zgodnie z Ustawą Rady Europy (1986) oraz Dyrektywy 86/609/EEC oraz zasad Komisji Bioetycznej Uniwersytetu w Murcji nie jest wymagana zgoda na przeprowadzanie eksperymentów na embrionach rybich do ok. 7 dnia ich życia.

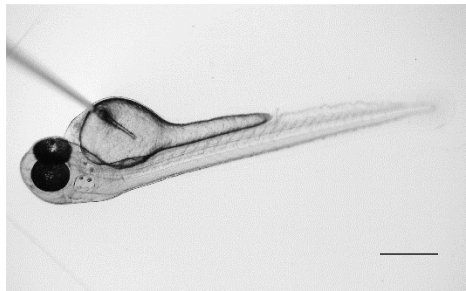
### **31. Pozyskiwanie embrionów**

Ryby linii tg(casper fli Ia:egfp) krzyżowano, aby pozyskać embriony. Zapłodnione jajka przenoszono do buforu do hodowli embrionów tzw. *egg water* tj. wody destylowanej z dodatkiem soli morskiej (60 µg/ml) oraz barwnika błękitu metylenowego (ok. 0,01 mg/l) i umieszczono w inkubatorze w temperaturze 28°C, w ilości maksymalnie 100 embrionów na szalkę hodowlaną o średnicy 10 cm. Po ok. 16 h, hodowlę oczyszczano z martwych lub nieprawidłowo rozwijających się embrionów.

### **32. Barwienie i iniekcja komórek nowotworowych do embrionów danio pręgowanego**

Komórki B16F10 wysiewano w ilości  $5 \times 10^5$  na szalki o średnicy 10 cm a następnego dnia trypsynizowano i po dwukrotnym płukaniu PBS-em barwiono barwnikiem fluorescencyjnym CM-Dil (rozcieńczenie 1:100 w DMEM) przez 45 min. Dodawano FBS (do stężenia 10%) i wirowano (5 min, 1000×g). Znow dwukrotnie płukano buforem PBS, po czym komórki zawieszano w ok. 30 µl PBS-u z 10% dodatkiem czerwieni fenolowej (Sigma) pozwalającym określić wielkość wstrzykiwanej kropli.

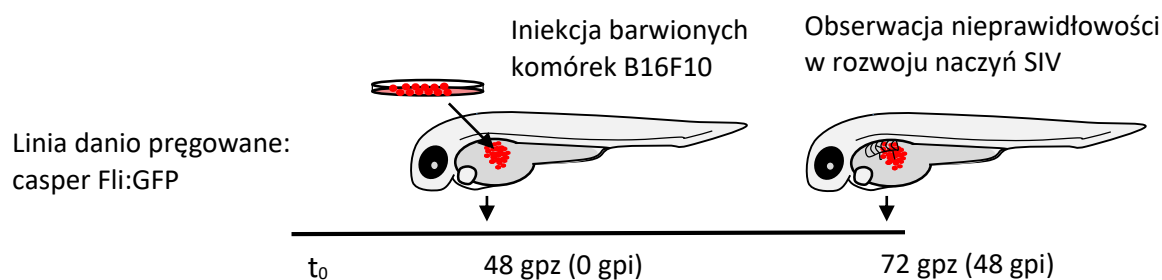
Po 48 h po zapłodnieniu jaj z embrionów usuwano kosmówkę i umieszczano je w buforze z trykainą (200  $\mu\text{g/ml}$ ) w celu anestezji. Następnie przy pomocy mikroiniektora (Narishige) wstrzykiwano do przestrzeni okołozóltkowej (**Rysunek 3**) każdego z embrionów około 2-5 nl mieszaniny komórek tj. ok. 150 komórek linii B16F10 barwionych barwnikiem fluorescencyjnym. Po około 60 min, przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego (LEICA MZ16FA), sprawdzano każdy z embrionów pod względem obecności komórek nowotworowych w odpowiednim miejscu (i ich braku w krwiobiegu) i odpowiedniej ich ilości. Pozytywnie zweryfikowane embriony inkubowano w buforze do hodowli embrionów w temperaturze 35°C [115].



**Rysunek 3.** Zdjęcie miejsca iniekcji komórek nowotworowych do embrionu danio przegowanego z mikroskopu świetlnego. Podziałka na zdjęciu odpowiada 500  $\mu\text{m}$ .

### **33. Analiza wpływu komórek B16F10 na angiogenezę w modelu danio przegowanego**

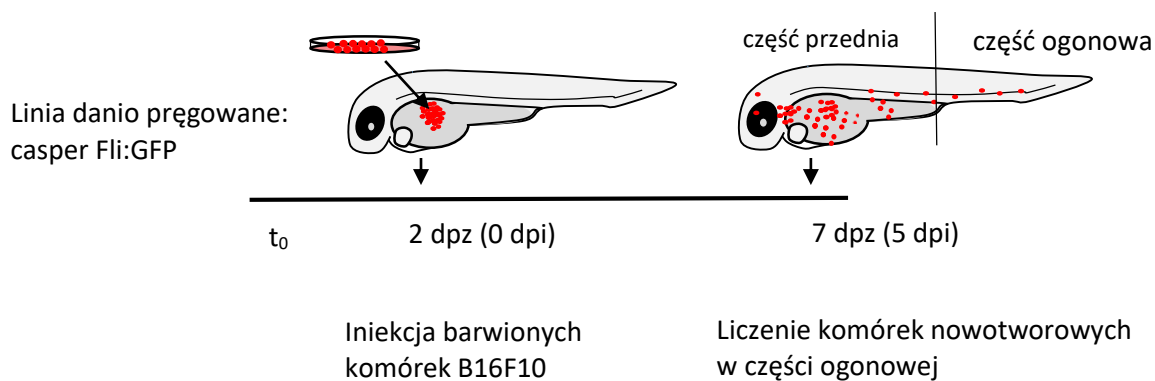
Po 48 h od iniekcji komórek opisanej w punkcie 32, oglądano, przy użyciu stereomikroskopu fluorescencyjnego LEICA MZ16FA, żyłę SIV (*subintestinal vein*) każdego z embrionów w świetle niebieskim i policzono liczbę embrionów z nieprawidłowym jej rozwojem – z dodatkowymi rozgałęzieniami lub o niestandardowym kształcie.



**Rysunek 4. Schemat eksperymentu na badanie wpływu komórek B16F10 na angiogenezę u danio pręgowanego.**  $t_0$  - zapłodnienie jaj, gpz – godzin po zapłodnieniu, gpi – godzin po iniekcji.

### 34. Analiza procesu migracji i przeżycia komórek B16F10 w modelu danio pręgowanego

Po 5 dniach od iniekcji komórek opisanej w punkcie 32, przy użyciu stereomikroskopu fluorescencyjnego LEICA MZ16FA, wykonano zdjęcia embrionów w świetle białym i zielonym. Następnie liczone komórki nowotworowe w części ogonowej.



**Rysunek 5. Schemat analizy zdolności komórek B16F10 do migracji i przeżycia poza miejscem iniekcji w organizmie danio pręgowanego.**  $t_0$  – czas zapłodnienia jaj, dpz – dni po zapłodnieniu, dpi – dni po iniekcji

## **Metody *ex vivo***

### **35. Izolacja surowicy z krwi**

Po pobraniu krwi od myszy, pozostawiano ją na ok. 60 min do wykrzepienia i izolowano z niej surowicę zgodnie ze standardowym protokołem [131]. Próbkę surowicy przechowywano w -20°C do czasu dalszej analizy.

### **36. Izolacja komórek z tkanek i guzów nowotworowych**

#### **A) Izolacja komórek z guzów nowotworowych**

Fragmenty guzów po pobraniu od myszy umieszczano w ok 200 µl buforu PBS z 2% FBS. Guzy dokładnie rozdrabniano skalpelem i przekładano na filtry o średnicy porów 50 µm umieszczone w probówkach wirówkowych o objętości 50 ml. Każdy filtr przepłukiwano ok. 25 ml buforu PBS z 2% FBS. Zawiesinę komórek wirowano przez 10 min, przy 200×g, po czym komórki zawieszano w 5 ml PBS-u i liczone na urządzeniu Muse Cell Analyzer zgodnie z zaleceniami producenta.

#### **B) Izolacja komórek z węzłów chłonnych**

Węzły chłonne rozdrabniano skalpelem a następnie umieszczano w mikroprobówkach i dodawano roztworu kolagenazy C (1 mg/ml) i DNazy I (1 mg/ml) w buforze PBS i inkubowano na platformie rotacyjnej przez około 2 h. Po tym czasie uwolnione komórki dwukrotnie płukano w buforze PBS (wirowanie 10 min, 250×g) i całość uzyskanego materiału wysiewano na płytki 6-studniowe. Hodowle obserwowano przez 3 tygodnie zmieniając medium co 5 dni i sprawdzając czy rosną w nich komórki nowotworowe.

### **37. Barwienie immunochemiczne i analiza cytometryczna komórek immunologicznych w guzie**

Komórki pozyskane z fragmentów guzów (punkt 36A) nakładano na płytki 96-studniowe (2 mln komórek z każdej próbki) i wirowano 300g przez 5 min. Dodatkowo nakładano mieszankę komórek z różnych guzów, które wykorzystywane były na kontrolę: komórki niebarwione, komórki barwione pojedynczymi przeciwciałami, kontrola FMO. Barwienie przeprowadzano zgodnie z protokołem Multicolor Staining Protocol for Flow Cytometry (Greg A. Perry). Jako bloku do ograniczenia oddziaływania komórek z przeciwciałami poprzez receptor Fc użyto przeciwciała CD16/CD32 zawieszono w buforze PBS. Przeciwciałami wykorzystanymi do analizy populacji komórek immunologicznych w guzach (szczególnie limfocytów) były szczurze przeciwciała anty: CD45, CD3, CD4, CD8, CD25 (opis użytych przeciwciał w **Tabeli 3**) oraz barwnik UV barwiący żywe komórki (LIVE/DEAD Blue, ThermoScientific). Następnie komórki permabilizowano i utrwalano używając w tym celu zestawu firmy Biolegend FoxP3/PERM Buffer Set, a następnie dodawano przeciwciało anty FoxP3 i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 min. Część komórek nie barwiono tym przeciwciałem aby stanowiła kontrolę FMO. Po barwieniu komórki przechowywano w lodówce przez ok. 12 h. Następnie przekładano je do probówek cytometrycznych i zbierano po 100 tys. żywych komórek przy użyciu cytometru LSRFortessa (BD) oraz analizowano w programie FlowLogic Miltenyi Biotec.

### **38. Przygotowanie lizatów z tkanek**

Zamrożone w ciekłym azocie guzy nowotworowe lub organy pobrane od myszy przechowywane były w  $-80^{\circ}\text{C}$  (do 3 tygodni) lub w ciekłym azocie (do pół roku) do czasu dalszej analizy. Aby przygotować lizaty tkanek, próbki przenoszone były na suchy lód. Następnie miażdżono je na proszek w moździerz lub rozcinano na kawałki skalpelem (utrzymując je wciąż w stanie zamrożenia) i po ok. 0,1 g tkanki

przenoszono do mikroprobówek o pojemności 1,5 ml. Dodawano po 300 µl buforu RIPA z- lub bez SDS-u, stalową kulkę do homogenizacji o średnicy 8 mm homogenizowano tkanki używając tkankowego homogenizatora Tissue Lyzer II LT (Qiagen) stosując następujące warunki – (i) dla wątroby i płuc: 15 Hz – 60 s, 30 Hz – 60 s, (ii) dla guzów, śledziony i węzłów 15 Hz – 60 s, 30 Hz – 90 s. Próbkę następnie dwukrotnie wirowano (10 min, 10 000×g) za każdym razem zbierając nadsącz, który zamrażano w -80°C do czasu dalszej analizy. Stężenie białka w próbkach mierzono metodą BCA; krzywą kalibracyjną sporządzono wykorzystując rozcieńczenia albuminy wołowej.

### **39. Izolacja RNA z tkanek**

Tkanki wyjęte z ciekłego azotu lub zamrażarki przenoszono na suchy lód. Płuca miażdżono na proszek w moździerz lub rozcinano na kawałki i ok. 0,1 g tkanki przenoszono do mikroprobówek o pojemności 1,5 ml. Do węzłów i fragmentów płuc dodawano po ok. 300 µl TRIzolu (Thermo Fisher Scientific), kulkę do homogenizacji, a następnie homogenizowano próbki z częstotliwością 15 Hz – 60 s, 30 Hz – 30 s i po ok. 30 s przerwy kolejne 30 s. Dalsza izolacja przebiegała jak w przypadku izolowania RNA z hodowli komórkowych (p. 15) z modyfikacją. Po zebraniu fazy wodnej po pierwszym wirowaniu próbek, dodawano do niej 150 µl chloroformu, mieszano i powtórnie wirowano. Dalsza procedura przebiegała zgodnie z protokołem. RNA rozdzielano na żelu agarozowym z dodatkiem formaldehydu w buforze TEA [132], aby potwierdzić jego czystość i brak degradacji.

### **40. Reakcja PCR w celu wykrycia przerzutów w tkankach mysich**

cDNA (200 ng) otrzymany na matrycy RNA wyizolowanego z płuc i węzłów chłonnych wykorzystywano do przeprowadzenia reakcji PCR ze starterami dla genu tyrozynazy. Transkrypt ten powinien znajdować się jedynie w komórkach zawierających melanosomy. Startery zostały zaprojektowane tak, aby pierwsza para

łączyła się z fragmentem cDNA odpowiadającego początkowi transkryptu, a druga jego końcowi. Jeśli po reakcjach PCR uzyskiwano produkt dla obu par starterów, uznawano, że w danej tkance znajdowały się komórki nowotworowe. Kontrolę negatywną stanowił cDNA otrzymany na matrycy RNA z płuc i węzłów myszy kontrolnych (bez nowotworu), a kontrolę pozytywną – z płuc myszy, którym podano komórki B16F10 do żyły ogonowej (p. 28B) lub z czarnych i powiększonych przyuszných węzłów chłonnych, pobranych od myszy, którym wstrzyknięto komórki B16F10 do płata ucha (p. 28A2).

#### **41. Analiza immunochemiczna skrawków z nowotworów**

Guzy nowotworowe zamrożone w roztworze OCT przenoszono na suchy lód, a następnie do kriostatu do czasu wyrównania się temperatury próbek z otoczeniem ( $-29^{\circ}\text{C}$ ). Następnie krojono guzy na preparaty o grubości 0,2 mm, przenoszono na szkiełka podstawowe i mrożono w  $-80^{\circ}\text{C}$  albo od razu przystępowano do procedury barwienia. W tym celu preparaty utrwalano metanolem w  $-20^{\circ}\text{C}$  przez 15 min, blokowano 10% surowicą osłą w buforze TBS z dodatkiem 0,5% kazeiny przez 60 min. a następnie pozostawiono na noc w  $4^{\circ}\text{C}$  w roztworze przeciwciał I-rzędowych (Tabela 2) w komorze zapewniającej wysoką wilgotność. Po trzykrotnym płukaniu w buforze TBS, preparaty inkubowano przez 2 h w roztworze przeciwciał II-rzędowych w 0,5% roztworze kazeiny w TBS w warunkach wysokiej wilgotności, w temperaturze pokojowej. Następnie preparaty dwukrotnie płukano, dodawano na 10 min 300 nM barwnik DAPI w celu uwidocznienia jąder komórkowych i ponownie płukano. Aby utrwalić fluorescencję na preparaty dodawano po ok. 20  $\mu\text{l}$  odczynnika Vectashield (Vector Laboratories), przykrywano szkiełkami nakrywkowymi i zabezpieczano przed wysychaniem przy pomocy lakieru do paznokci. Po 24 h preparaty analizowano pod mikroskopem fluorescencyjnym Leica DMI60000B (Leica Microsystems) przy pomocy programu LAS X (Leica Application Suite X). Powierzchnię specyficznego

sygnału fluorescencyjnego na zdjęcia analizowano przy użyciu programu ImageJ 1.48v.

#### **42. Analiza statystyczna**

Analizę statystyczną wykonano używając programu GraphPad Prism wersja 5.0 (GraphPad Software) wykorzystując nieparametryczny test t-Studenta, chyba że w opisie danej ryciny napisano inaczej.

## WYNIKI

Aby lepiej zbadać rolę białka ADAM17 w rozwoju nowotworów skupiono się na dwóch aspektach: (i) poznaniu potencjalnej roli białka ADAM17 w limfangiogenezie, procesie ważnym dla rozwoju nowotworów i dla przerzutowania oraz (ii) na poszerzeniu wiedzy na temat wpływu białka ADAM17 na funkcjonowanie komórek nowotworowych, ich wzrost, przerzutowanie, stymulację angiogenezy.

## CZĘŚĆ I

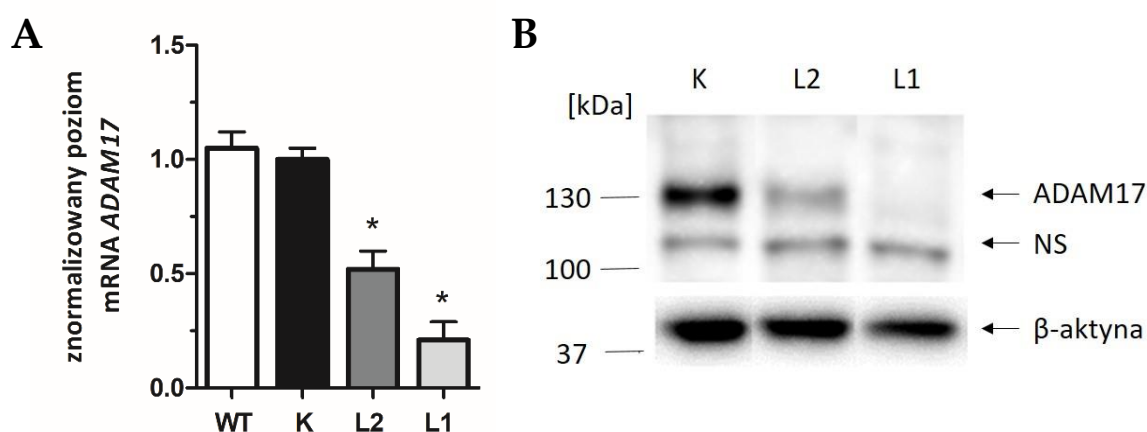
### **Rola białka ADAM17 w komórkach śródbłonna naczyń limfatycznych i jego wpływ na proces limfangiogenezy – badania *in vitro***

Aby zbadać wpływ białka ADAM17 na naczynia limfatyczne, zdecydowano się zahamować jego ekspresję w komórkach LEC (*lymphatic endothelial cells*) i sprawdzić jak wpłynie to na ich funkcje w procesach istotnych dla limfangiogenezy tj.: na proliferację, migrację i adhezję, a także potencjał tych komórek do tworzenia nowych naczyń limfatycznych. Pierwszym krokiem badań było stworzenie odpowiedniego modelu komórkowego i zweryfikowanie jego działania.

#### **1. Stworzenie modelu komórkowego do badania roli białka ADAM17 w komórkach naczyń limfatycznych**

Ekspresję białka ADAM17 wyciszono poprzez transdukcję komórek LEC lentiwirusami zawierającymi odpowiednio zaprojektowane sekwencje shRNA. Poprzez uruchomienie degradacji transkryptu dla białka ADAM17, shRNA bezpośrednio wpływa na ograniczenie jego syntezy. Stransdukowane komórki zyskały oporność na puromycynę, dzięki czemu, poprzez presję antybiotykową, możliwe było uzyskanie stabilnych linii komórkowych. Spośród 5 testowanych sekwencji jedynie shRNA1 spowodował znaczące wyciszenie ekspresji mRNA *ADAM17* (o około 80% na poziomie transkryptu) w linii nazywanej dalej L1. Aby

wykluczyć możliwość niespecyficznego działania tej sekwencji (tzw. efekt „off target”), część eksperymentów wykonano także na linii otrzymanej poprzez transdukcję komórek mieszaniną lentiwirusów z sekwencjami shRNA2 i 3 (linia L2). Otrzymane wyciszenie było znacznie mniejsze – ok. 50% na poziomie transkryptu. Wyprowadzono również linię kontrolnych komórek LEC (K), stransdukowanych lentiwirusami zawierającymi niekodującą sekwencję shRNA. Porównując ekspresję białka ADAM17 w tych komórkach i w komórkach nietransdukowanych (typu dzikiego, WT), nie stwierdzono, aby transdukcja miała na nią wpływ. Stopień wyciszenia ekspresji ADAM17 badano poprzez analizę ilości transkryptu metodą RT-qPCR i ilości białka w komórkach metodą Western blotting (**Rysunek 6**).



**Rysunek 6. Ocena skuteczności wyciszenia ekspresji mRNA i białka ADAM17 w komórkach LEC.** Poziom mRNA *ADAM17* analizowano metodą RT-qPCR (A) poziom białka - techniką Western blotting (B) L1 – linia komórkowa z ekspresją wyciszaną sekwencją shRNA1, L2 – linia komórkowa z ekspresją wyciszaną sekwencjami shRNA 2 i 3, K – komórki linii kontrolnej, WT – komórki linii nietransdukowanej. (A) Względny poziom transkryptu dla białka ADAM17 w komórkach po transdukcji. Poziom transkryptu w komórkach kontrolnych przyjęto jako 1. Dane prezentowane są jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe (SD) z 3 niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach. \* $P < 0,01$  vs K (B) Na żel poliakrylamidowy nakładano po 40  $\mu$ g białka. Poziom  $\beta$ -aktyny w próbkach wykorzystano jako kontrolę równych ilości nałożonego na żel białka i prawidłowego transferu białek na membranę. NS – prążek niespecyficzny.

Wprowadzenie do komórki obcego dwuniciowego RNA (dsRNA), a nawet jednoniciowego RNA o specyficznej sekwencji, może wywołać produkcję interferonu i tzw. odpowiedź interferonową. Obejmuje ona aktywację wielu szlaków sygnałowych i może prowadzić do zmiany w funkcjonowaniu komórki, a nawet do jej apoptozy [133]. Wprowadzenie do komórki shRNA metodą transdukcji lentiwirusowej również może wywołać odpowiedź interferonową, co wynikać może np. z zastosowania niektórych promotorów czy wykorzystania określonych sekwencji nukleotydowych [134], [135]. Aby mieć pewność, że w stworzonym przez nas modelu nie wywołano odpowiedzi interferonowej, badano w komórkach, metodą RT-qPCR, poziom mRNA *OAS1* (2'-5'-oligoadenylate synthetase 1), genu, którego poziom jest ściśle zależny od poziomu interferonu [133]. W stransdukowanych liniach stwierdzono tylko niewielki wzrost ekspresji tego genu (danych nie pokazano), znacznie poniżej poziomu uznawanego za charakterystyczny dla reakcji interferonowej.

Aby móc uznać komórki LEC za odpowiedni model do badania własności śródbłonna limfatycznego, muszą one posiadać ekspresję białek markerowych tj. białka CD31 i podoplaniny [136]. W analizie cytometrycznej potwierdzono ekspresję tych cząsteczek jak i również stwierdzono brak różnic w ekspresji CD31 lub podoplaniny pomiędzy stransdukowanymi liniami [137].

## **2. Wpływ wyciszenia białka ADAM17 na profil białkowy w komórkach LEC**

Ze względu na funkcje metaloproteazy ADAM17, ograniczenie jej ekspresji może wpływać na wiele procesów. Białko to jest dezintegryną – a więc poprzez oddziaływanie z integrynami może wpływać na ruch i adhezję komórek – jak i szedzą, bez której mniej białek adhezyjnych, czynników wzrostu i receptorów będzie złuszcanych z błony komórkowej [12]. To z kolei może przyczynić się do m.in. zahamowania migracji i proliferacji komórek czy też do zmiany ich wrażliwości na sygnały zewnątrzkomórkowe. Enzym ADAM17 uwalnia z błony także czynniki, które mogą autokrynnie wpływać na zmiany transkryptomu i proteomu komórek [1].

Aby zbadać wpływ szedazy ADAM17 na profil białkowy komórek LEC, porównano poziom różnych białek w lizatach i mediach komórek kontrolnych (M) oraz tych z obniżoną ekspresją enzymu ADAM17 (L1). W tym celu wykorzystano macierze białkowe firmy R&D, które pozwalają na jednoczesne względne porównanie poziomu 119 określonych białek w różnych próbkach. Test ten oparty jest o wiązanie się białek obecnych w mediach hodowlanych lub w lizatach komórkowych do unieruchomionych na nitrocelulozowych membranach specyficznych przeciwciał. Używając odpowiedniej mieszaniny przeciwciał sprzęgniętych z biotyną, a następnie dodaniu streptawidyny skoniugowanej z peroksydazą chrzanową (HRP), możliwe było wykrycie związanych do membrany białek i porównanie ich ilości na membranach dzięki sygnałowi chemiluminescencyjnemu. Macierz pozwalała na analizę wielu białek błonowych, wśród nich kilku znanych substratów ADAM17, ale także białek wewnątrzkomórkowych. Test ten miał więc pozwolić na ocenę funkcji enzymu ADAM17 w komórkach LEC zarówno jako szedazy jak i pośredniego regulatora ekspresji innych białek.

Po przeprowadzeniu wstępnego doświadczenia ustalającego jego optymalne warunki, przeprowadzono jedną pełną analizę macierzy białkowych, w której wykryto 61 białek w tym 51 w lizatach i 39 w mediach (nie licząc kontroli testu), (**Rysunek 7**). Sygnały chemiluminescencyjne pochodzące od substratów enzymu ADAM17, czyli białek uwalnianych z błony komórkowej, powinny być wyższe w mediach znad komórek K niż L1 i/lub niższe w lizatach komórek K niż L1. Przewidywania odnośnie takich białek sprawdziły się w przypadku: sygnału w mediach dla syndekanu-4 i JAM-A oraz w lizatach dla białek HB-EGF i TNFR2. Jednak w teście wykazano, że sygnałem chemiluminescencyjnym pomiędzy liniami L1 i K o więcej niż 50% różni się aż 30 białek. Były to w lizatach: **kadheryna 13, lipokalina-2, integryna  $\alpha$ v, BIG-H3, HB-EGF, CD58, BACE-1, CD44H, integryna  $\beta$ 3** i  $\beta$ 4, CXCL8, Pref-1, MD-1, JAM-A, Galectin-3BP, RECK, a w mediach: **ESAM,**

BIG-H3, MMP-2, JAM-C, semaforyna 3A, kadheryna 13, SREC-1, emmpryna, RECK, ECM-1, integryna  $\alpha 5$  i  $\beta 5$ , P-kadheryna, syndekan-4, galektyna-3, TROP-2, JAM-A. Pogrubioną czcionką zaznaczono te białka, dla których sygnał chemiluminescencyjny był wyższy w komórkach L1 niż w K. Dane liczbowe pokazujące wartości średniej chemiluminescencji wszystkich analizowanych białek zamieszczono w suplemencie (**Tabela 2sup**).

W przypadku trzech białek adhezyjnych: emmpryny-1, kadheryny 13 i łańcucha integryny  $\alpha v$  zaobserwowano zależności, które wskazywałyby na nie jako potencjalne substraty białka ADAM17 (w S1 w porównaniu do K mniejsza – mniejsza ilość emmpryny i kadheryny 13 w medium i większa ilość kadheryny 13 i łańcucha integryny  $\alpha v$  w lizatach). Do tej pory nie ma dowodów, które wskazywałyby, że białka te są lub nie są uwalniane przez badaną szedazę, jednak w przypadku emmpryny pokazano, że w jej ekspresja jest zależna od poziomu białka ADAM17 [138]. Obserwowana w wynikach macierzy zmiana ekspresji i/lub lokalizacji tych białek mogłaby też wynikać pośrednio z aktywności ADAM17.

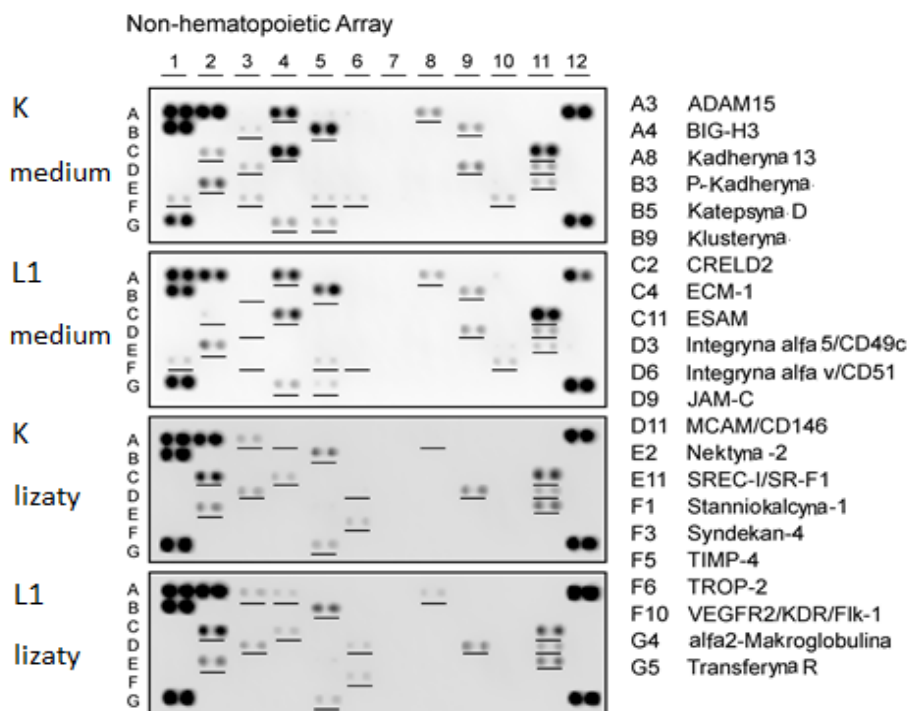
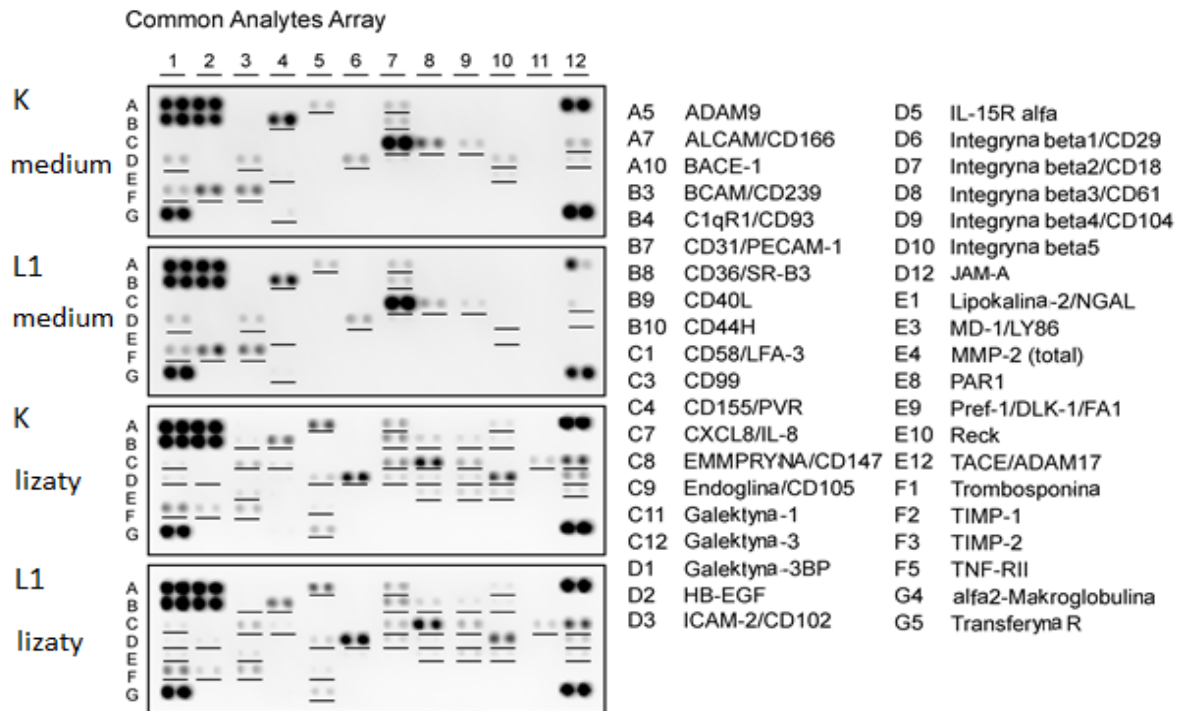
Zależność, która powinna być charakterystyczna dla substratów białka ADAM17, dotyczyła również dwóch białek macierzy zewnątrzkomórkowej: BIG-H3 oraz lipokaliny-2. Ich poziom był wyższy w lizatach i niższy w mediach komórek L1 niż w komórek K. Być może ADAM17 wpływa na poziom ekspresji ich genów w komórce a także, poprzez pośredni wpływ na strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej, rzutuje na uwalnianie tych białek do medium z ściśle przylegającej do komórek macierzy. Zgodnie z tą hipotezą, w komórkach z obniżoną ekspresją ADAM17, większa pula białek macierzy znajdowałaby się po izolacji w lizacie komórek a nie w medium.

Wyniki analizy macierzy należy traktować jako wyniki wstępne – zwracające uwagę na białka, których ekspresja i/lub funkcjonowanie zależy od poziomu proteazy ADAM17. Nie należy traktować ich ilościowo, szczególnie, że test w pełnym zakresie został wykonany tylko jeden raz. Nie można wykluczyć, że wykorzystane w tej analizie przeciwciała (których źródła i numery katalogowe nie zostały podane przez

producenta) mogą dawać niespecyficzne sygnały. Dobrym tego przykładem jest sygnał dla białka ADAM17. W powyższym doświadczeniu różnica w lizatach komórkowych K i L1 dla tego białka wynosi ok 30% (**Tabela 2 sup**), podczas gdy w analizie Western blotting wykonywanej tylko dla tego białka poziom wyciszenia wynosił ok. 70-80%. W naszym laboratorium przetestowano kilkanaście różnych przeciwciał anti-ADAM17 i nie udało się do tej pory odnaleźć takiego, które nie dawałoby żadnego niespecyficznego sygnału. Mniejsza niż spodziewana różnica w poziomie ADAM17 między L1 i K w analizie macierzy białkowych może więc wynikać z tego, że użyte przez producenta przeciwciała oprócz białka ADAM17 wiążą i wykrywają także inne białka. Obecności niektórych białek (np. P-kadheryny), dla których uzyskano sygnał w analizie macierzy (mimo, że dość słaby), nie udało się potwierdzić innymi metodami wykorzystującymi specyficzne przeciwciała – techniką Western blotting i analizą cytometryczną. Z drugiej strony, w analizie macierzy nie uzyskano sygnału dla białka TIMP-3, którego ekspresję i aktywność w komórkach LEC potwierdzono w innych eksperymentach (danych nie pokazano). Podczas analizy membran nie brano pod uwagę także tych sygnałów, które w duplikatach (sąsiadujących kropkach) wykazywały różnicę w sygnale większą niż 10%.

Mimo wypisanych powyżej ograniczeń przeprowadzonej analizy, była ona źródłem informacji, które w toku badań pozwalały lepiej poznać i wytłumaczyć badane procesy, a także potwierdziła funkcjonalność modelu. Wskazała także białka, których zmian w poziomie w lizatach lub mediach komórkowych nie oczekiwano po wyciszeniu enzymu ADAM17 np. BIG-H3 czy łańcuchy integrzyn.

Ze względu na wykazane różnice w poziomie wielu białek adhezyjnych pomiędzy porównywanymi liniami można podejrzewać, że brak aktywności białka ADAM17 ma wpływ na oddziaływania międzykomórkowe i na kontakt komórek z otoczeniem, a przez to może mieć znaczenie w procesach takich jak adhezja komórek i ich migracja. Badania nad wpływem wyciszenia ekspresji ADAM17 na te procesy te opisano w dalszej części pracy.



**Rysunek 7. Membrany prezentujące poziom białek w lizatach i mediach z komórek LEC L1 i K.** Rycina, przetłumaczona tu na język polski, pochodzi z opublikowanej przez nasz zespół pracy [137]. Sygnały w miejscach A1, A2, A12, B1, B2, G1, G12 na wszystkich membranach stanowią kontrolę ilości nałożonego białka i prawidłowego przeprowadzenia procedury. Podkreślone miejsca odpowiadają białkom (w duplikatach), których poziom detekcji był wyższy niż poziom tła. Sygnałów z lizatów oraz mediów nie należy porównywać między sobą, jako że nie pochodziły z takich samych ilości komórek.

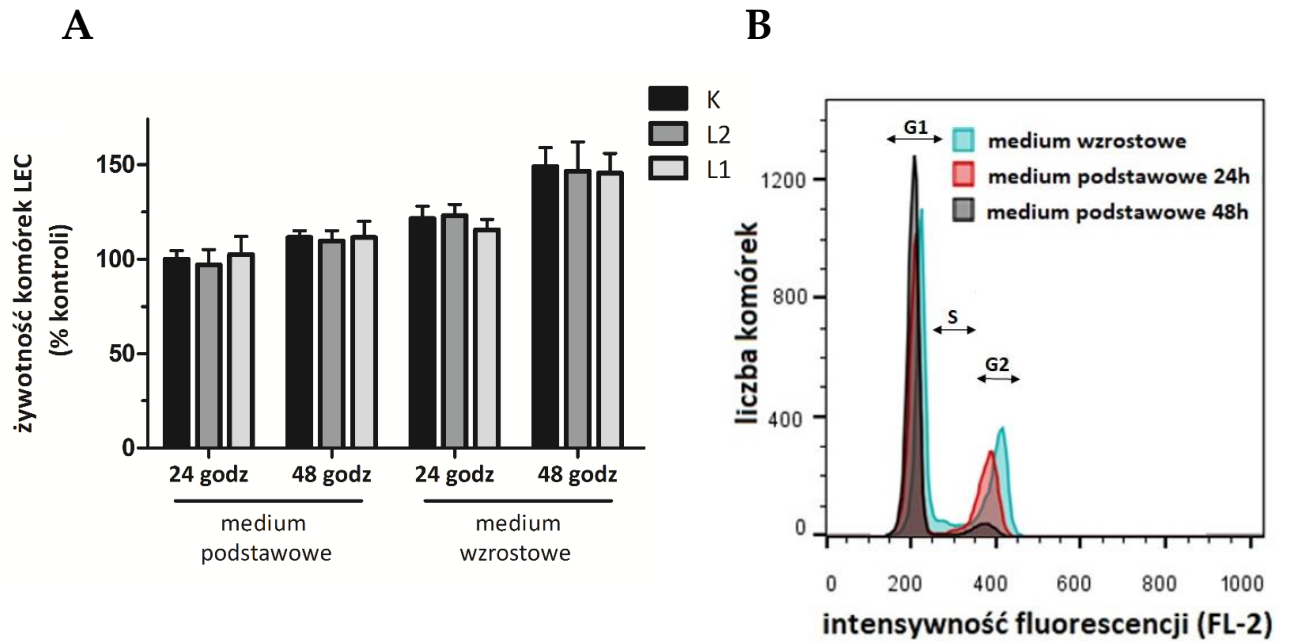
### 3. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na proliferację komórek LEC

ADAM17, dzięki uwalnianiu czynników wzrostowych może stymulować proliferację komórek [53], [139], [140]. Jako że jest to jeden z najważniejszych procesów w limfangiogenezie, sprawdzono, czy obniżenie ekspresji ADAM17 zahamuje lub spowolni procesy podziałów komórkowych LEC.

Wykorzystano w tym celu test MTT, określający całkowitą aktywność metaboliczną komórek, a zatem wskazujący na tempo ich proliferacji i/lub żywotność. Przeprowadzono również, przy pomocy cytometrii przepływowej, analizę cyklu komórkowego. Pozwoliło to na określenie jaka część badanej populacji komórek znajduje się w poszczególnych jego fazach: G0/G1, S, G2/M.

Zarówno test MTT przeprowadzony po 24 i 48 h hodowli w pożywce podstawowej i pożywce wzrostowej (**Rysunek 8A**), jak i zbadanie cyklu komórkowego (**Rysunek 8B** i **Rysunek 8C**) wskazują na brak efektu białka ADAM17 na proliferację i żywotność komórek LEC. Wynik ten potwierdzono także przez liczenie komórek poszczególnych linii w trakcie pasażu połączone z testem eliminacji błękitu trypanu (danych nie pokazano).

Dla komórek LEC K i L1 obserwowano niemal identyczne proporcje komórek w poszczególnych fazach cyklu (**Rysunek 8C**). W medium podstawowym, w porównaniu do wzrostowego, komórki zwalniały swoją proliferację. Różnica ta po 24 h hodowli nie była duża, jednak po 48 h widać znaczące przesunięcie komórek z fazy S i G2/M do fazy G0/G1 w przypadku hodowli w medium podstawowym (**Rysunek 8B**). Wynik ten zgodny jest z wynikiem testu MTT (**Rysunek 8A**) – komórki bez stymulacji w postaci czynników wzrostu dodawanych do medium wzrostowego zwalniają swoją proliferację.



**C**

Faza cyklu	Komórki	
	K	L1
<b>Medium wzrostowe 48 h (%)*</b>		
G0/G1	55,6 ± 3,7	54,7 ± 2,8
G0/G1 <sup>S</sup>	8,8 ± 5,1	8,3 ± 4,2
G2/M	35,6 ± 6,1	37 ± 5,8
<b>Medium podstawowe 48 h (%)</b>		
G0/G1	86,5 ± 5,3	82,9 ± 3,8
G0/G1 <sup>S</sup>	4 ± 2,8	6,4 ± 2,2
G2/M	9,5 ± 4,7	10,7 ± 3,3

\*procent wszystkich komórek

**Rysunek 8. Wpływ wyciszenia białka ADAM17 na proliferację komórek LEC. (A)** Test MTT po 24 i 48 h od wysiania komórek K, L1 i L2 w medium wzrostowym i podstawowym. Dane prezentowane są jako średnia ± SD z 3 niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach lub tryplikatach. Poziom absorbancji komórek kontrolnych w medium podstawowym przyjęto jako 100%. **(B)** Reprezentatywny wykres cyklu komórkowego kontrolnych komórek LEC po 24 i 48h hodowli w medium podstawowym i po 48 h w medium wzrostowym. Strzałki na wykresie wskazują zakresy fazy cyklu komórkowego: G0/G1, S, G2/M. **(C)** Tabela prezentująca procent komórek K i L1 w różnych fazach cyklu komórkowego po 48 h hodowli w medium podstawowym i wzrostowym. Średnie ± SD zostały wyliczone z 3 niezależnych eksperymentów.

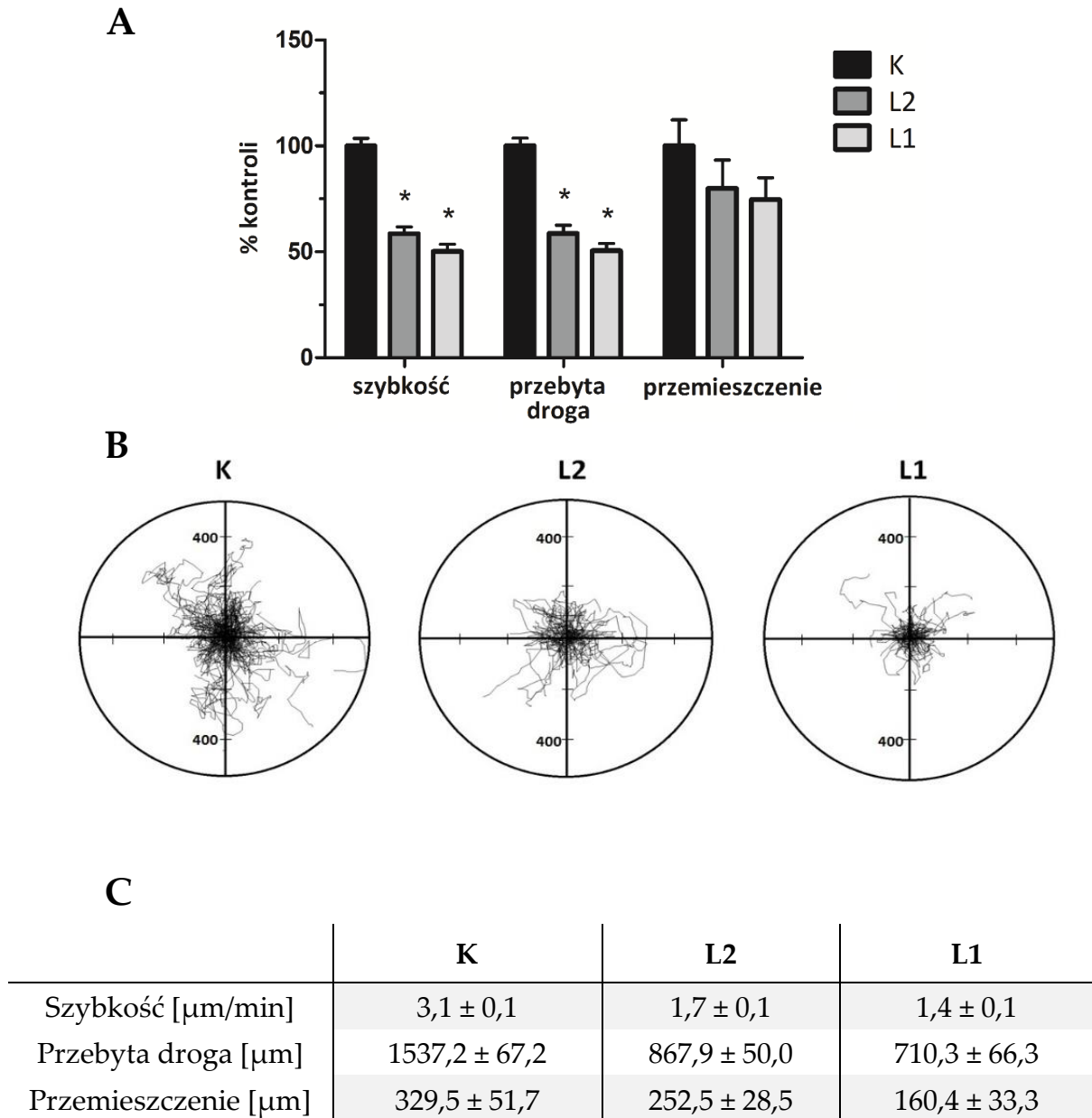
#### 4. Wpływ wyciszenia białka ADAM17 na zdolność migracji komórek LEC

Proliferacja to ważny, ale nie jedyny proces warunkujący limfangiogenezę. Bardzo istotna jest także ruchliwość komórek. Dlatego też kolejnym krokiem było zbadanie czy białko ADAM17 wpływa na tę cechę komórek LEC.

Zdolność komórek do ruchu to jedna z ich podstawowych cech, kluczowa w wielu procesach takich jak rozwój embrionalny, odpowiedź immunologiczna, procesy zapalne, gojenie się ran czy przerzutowanie komórek nowotworowych. Istnieje wiele metod badania zdolności komórek do ruchu [141]. Te najbardziej popularne to analiza ruchu pojedynczych komórek, test rany oraz test transmigracji.

Ze względu na uwalnianie z błony komórkowej przez szedazę ADAM17 czynników wzrostu (które w sposób autokryny mogą stymulować migrację), a także wielu białek adhezji międzykomórkowej i tych odpowiadających za oddziaływanie z macierzą zewnątrzkomórkową, wyciszenie jego ekspresji powinno zahamować, przynajmniej częściowo, zdolność komórek do migracji. Aby to sprawdzić zastosowano test ruchu pojedynczych komórek. Określono szybkość migracji i zależną od niej przebytą drogę w danym czasie a także przemieszczenie się komórek. Drogę przebytą przez pojedynczą komórkę definiuje się jako całkowitą długość trajektorii jej ruchu, szybkość migracji oblicza się przez podzielenie wartości pokonanej drogi przez czas wędrówki, natomiast przemieszczenie oznacza odległość z punktu początkowego komórki do miejsca zakończenia analizy jej ruchu.

Analiza opisanych parametrów wykazała, że komórki z obniżoną ekspresją białka ADAM17 poruszają się wolniej; pokonują drogę krótszą o około 50% (komórki L1) i około 40% (komórki L2) w stosunku do komórek kontrolnych (**Rysunek 9**). Ponieważ komórki nie wykazują kierunkowości ruchu, ze względu na brak jakiegokolwiek chemoatraktanta czy czynnika ukierunkowującego migrację, stąd brak istotnie statystycznych różnic w wartościach określających przemieszczenie się komórek linii K, L1 i L2.



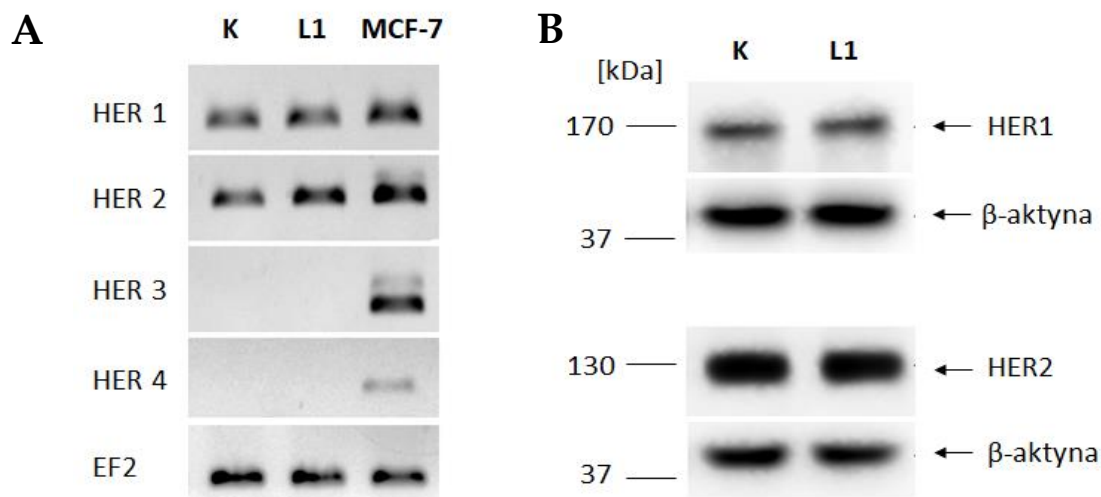
**Rysunek 9. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na ruch pojedynczych komórek LEC. (A)** Reprezentatywny wyniki analizy ruchu 60 komórek K, L2 lub L1 obserwowanych przez 6 h. Słupki reprezentują wartości średnich arytmetycznych  $\pm$  SD. Średnie wartości parametrów oznaczonych dla komórek kontrolnych przyjęto jako 100%. \* $P < 0,01$  vs K. **(B)** Reprezentatywny wynik analizy ruchu 60 komórek K, L1 i L2 wraz z wykresami kołowymi przebytej przez nie drogi, powstałymi przez umieszczenie w centrum wykresu początku ruchu każdej komórki. Na osiach zaznaczono odległość 400  $\mu\text{m}$ . **(C)** Tabela liczbowych wartości parametrów ruchu komórek LEC K, L2 i L1. Przedstawiono średnie arytmetyczne  $\pm$  SD z 7 dla K i L1 oraz 3 dla L2 niezależnych doświadczeń.

Widoczną różnicę w ruchliwości komórek, ze względu na mnogość substratów białka ADAM17, w tym także białek adhezyjnych, można starać się wytłumaczyć na wiele sposobów. Dane literaturowe wskazują, iż białko ADAM17 może wpływać na ruchliwość komórek poprzez uwalnianie przez niego z błony komórkowej czynników wzrostu, które następnie wpływają na oś sygnałową receptorów HER [59], [142], [143]. Postanowiono sprawdzić, czy w przypadku komórek LEC jest podobnie.

## 5. Wpływ ligandów HER1 i HER2 na migrację komórek LEC

Receptory z rodziny EGFR, ich budowę, sposób aktywacji i funkcję, opisano we Wstępie (punkt 1.2.1). ADAM17 uwalnia z błony komórkowej ligandy dla tych receptorów, przez co w komórkach mogą zostać aktywowane różne szlaki sygnałowe. Prowadzą one do określonych procesów w komórkach: proliferacji, różnicowania, przeżycia czy właśnie migracji.

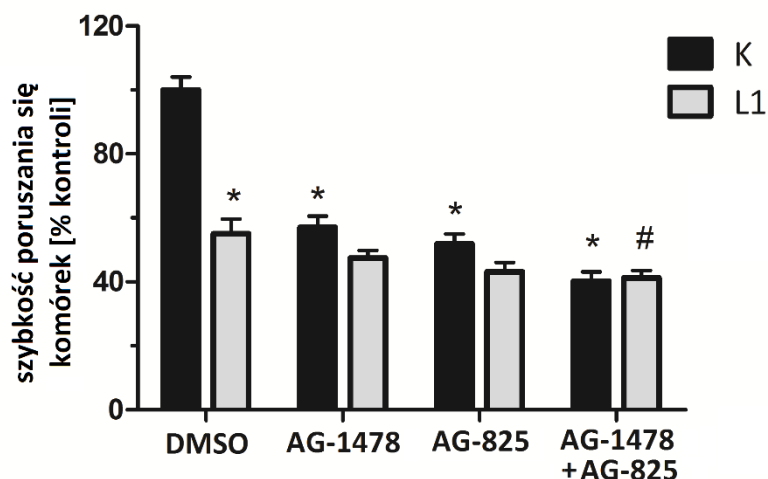
W pierwszej kolejności sprawdzono, czy komórki LEC wykazują ekspresję receptorów z rodziny EGFR. W analizie PCR, wykorzystując cDNA jako matrycę, wykazano obecność transkryptów tylko dla receptorów HER1 i HER2 (**Rysunek 10A**). Dodatkowo, analiza metodą RT-qPCR (danych nie pokazano) i Western blotting (**Rysunek 10B**) wykazała, że nie istnieje korelacja między ich ekspresją, a poziomem białka ADAM17.



**Rysunek 10. Analiza ekspresji receptorów HER w komórkach LEC. (A)** Wynik elektroforezy produktów PCR w żelu agarozowym. Na matrycy cDNA z komórek LEC K i L1 amplifikowano fragmenty HER1, 2, 3, 4. Jako kontrolę pozytywną wykorzystano produkty amplifikacji tych fragmentów na matrycy cDNA ludzkich komórek nowotworowych MCF-7. Produkty amplifikacji eEF2 stanowią kontrolę ilości matrycy i prawidłowego przebiegu reakcji. **(B)** Analiza Western blotting komórek LEC K i L1 dla białek: HER1 i HER2. Na żel poliakrylamidowy nakładano po 40 µg białka. Poziom β-aktyny w próbkach wykorzystano jako kontrolę ilości nałożonego na żel białka i prawidłowego transferu białek na membranę. Pokazano położenie standardów o masach cząsteczkowych najbliższych analizowanym białkom (170, 130 i 37 kDa).

Aby sprawdzić, czy funkcjonowanie HER1 i HER2 jest istotne dla ruchliwości komórek LEC, zbadano ich migrację przy zahamowaniu aktywności tych receptorów przez specyficzne inhibitory. W tym celu do komórek dodano inhibitor receptora HER1 i/lub HER2, odpowiednio: AG-1478 (w stężeniu 1,5 µM) i AG-825 (w stężeniu 1 nM) lub DMSO w ilości odpowiadającej objętości dodanych inhibitorów, i badano ruch komórek. Stosowane stężenia nie były toksyczne dla komórek.

Zahamowanie aktywności pojedynczych receptorów, jak i obu receptorów jednocześnie, znacząco spowolniło ruch komórek K (o 42,9% dla inhibitora HER1, 48,1% – HER2, 57,3% – przy połączeniu obu z nich), a tylko w niewielkim – komórek L1 (odpowiednio o 7,7%, 12% i 14,9% **(Rysunek 11)**). Co ważne, mieszanina inhibitorów AG-1478 i AG-825 wyrównała szybkość ruchu komórek K i L1 do odpowiednio:  $0,82 \pm 0,14$  µm/min oraz  $0,84 \pm 0,14$  µm/min.

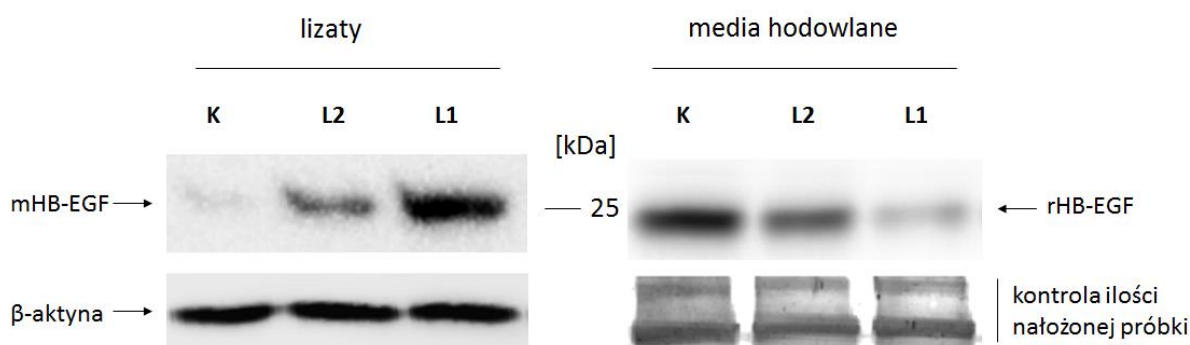


**Rysunek 11 Wyniki analizy ruchu komórek LEC w obecności inhibitorów HER1 (AG-1478) oraz HER2 (AG-825).** Słupki reprezentują wartości średnich arytmetycznych  $\pm$  SD z 3 niezależnych eksperymentów, w których analizowano ruch 30 komórek K lub L1 przez 6 h. Wartości zostały znormalizowane w stosunku do wartości średniej arytmetycznej dla komórek K, do których zamiast inhibitorów dodano ich rozpuszczalnika, DMSO. \* $P < 0.02$  vs K DMSO, # $P < 0,05$  vs L1 DMSO.

Otrzymane wyniki podkreślają istotny wpływ aktywności inhibitorów HER na migrację komórek LEC. Zniesienie różnicy w szybkości ruchu komórek w badanych subliniach, przy zahamowaniu działania receptorów HER1 i HER2, sugeruje, że to ich aktywacja w komórkach K może odpowiadać za obserwowane różnice w tempie migracji między komórkami K i L1. Dodatkowo, znaczenie enzymu ADAM17 dla działania receptorów HER1 i HER2 potwierdza fakt, iż dodanie inhibitorów hamujących ich aktywność do hodowli komórek w medium podstawowym na 24 h, ograniczyło żywotność i/lub proliferację komórek K o 25% podczas gdy w komórkach L1 spadła ona tylko o 13% (test z alamarBlue).

Jako że doświadczenie przeprowadzono w pożywce podstawowej, pozbawionej czynników wzrostowych, można było wysnuć hipotezę, że komórki LEC wydzielają czynnik lub czynniki wzrostowe działające w sposób autokryny. Ewentualna różnica w poziomie uwalnianych czynników wzrostowych pomiędzy linią kontrolną a linią z obniżonym poziomem ekspresji ADAM17 mogłaby tłumaczyć różny potencjał migracyjny tych sublinii.

W doświadczeniu opisanym w punkcie 2 Wyników „Wpływ wyciszenia białka ADAM17 na profil białkowy w komórkach LEC”, dotyczącego równoczesnej analizy poziomu wielu białek, wykazano, iż poziom HB-EGF jest znacznie wyższy w lizatach komórek z wyciszoną ekspresją białka ADAM17 niż w komórkach kontrolnych. Prawdopodobne jest, że przy niskim poziomie białka ADAM17, mniej tego czynnika wzrostu zostaje uwolnione z powierzchni komórek. Mogłoby to powodować ograniczenie aktywacji receptorów HER. Co więcej, znany jest silny wpływ HB-EGF na ruchliwość różnych typów komórek [144]–[147]. Postanowiono zatem porównać poziom HB-EGF w komórkach LEC metodą Western blotting. Analiza ta wykazała, że ilość białka HB-EGF w lizatach i mediach hodowlanych jest zależna od poziomu ekspresji białka ADAM17 (**Rysunek 12**). W lizatach komórek K było znacznie mniej, a w mediach z tych komórek znacznie więcej HB-EGF w porównaniu do komórek L1 i L2.



**Rysunek 12. Analiza Western blotting poziomu białka HB-EGF w lizatach i mediach hodowlanych komórek K, L1 i L2.** mHB-EGF – forma błonowa białka (m.c. ~25 kDa), rHB-EGF forma rozpuszczalna białka (m.c. ~23 kDa). Jako kontrolę ilości nałożonego na żel białka i prawidłowego transferu białek na membranę wykorzystano w lizatach poziom β-aktyny, a w przypadku mediów hodowlanych porównano intensywność prążków na membranie wybarwionej barwnikiem Coomassie, którą sfotografowano i pokazano jej fragment. Wskazano położenie standardu o masie cząsteczkowej 25 kDa.

Wynik opisanych eksperymentów może wskazywać, że wpływ białka ADAM17 na migrację komórek LEC wynika z poziomu aktywacji receptorów HER1 i HER2, zależnego od ilości uwolnionego z błony HB-EGF. Aby jednak tego dowieść, konieczne byłoby potwierdzenie specyficznej roli HB-EGF w tym procesie poprzez wykonanie dodatkowych testów, np. zahamowanie jego ekspresji w komórkach LEC.

W warunkach *in vivo* na naczynia limfatyczne mogą działać także inne niż produkowane przez same komórki LEC czynniki wzrostowe. Zarówno podczas embrionalnej limfangiogenezy jak i podczas patologicznej limfangiogenezy bardzo istotną rolę odgrywa białko VEGFC. Dodatkowo, komórki silnie oddziałują na siebie nawzajem – inaczej niż w wyżej opisanym teście ruchu pojedynczych komórek. Zbadano więc zdolność do migracji i tworzenia nowych struktur przestrzennych przez komórki LEC, w warunkach bardziej zbliżonych do tych, jakie panują w organizmie, poprzez ich hodowlę w układzie trójwymiarowym.

## **6. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na właściwości komórek LEC w hodowli trójwymiarowej**

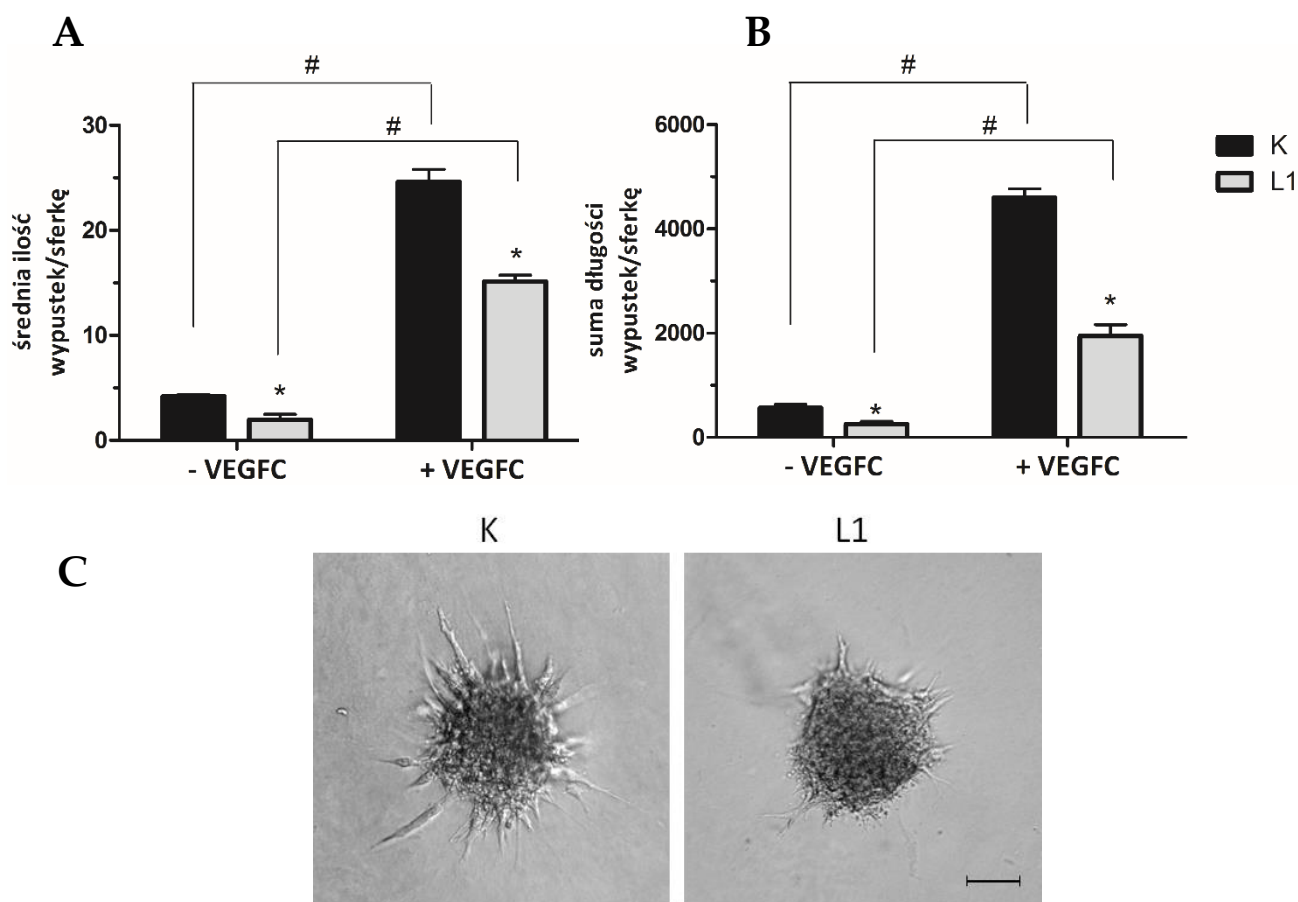
Hodowle w układzie trójwymiarowym (3D), to hodowle, w których komórki rosną w agregatach lub sferkach, zawieszane w substancjach, składem i gęstością przypominającymi macierz międzykomórkową. Interakcje między komórkami oraz komórkami a otoczeniem, a także ich wrażliwość na substancje bioaktywne, lepiej odzwierciedlają to, co dzieje się w żywych organizmach w porównaniu do tradycyjnych dwuwymiarowych hodowli [148]. Są uznawane jako model limfangiogenezy w warunkach *in vitro*.

Aby badać komórki LEC w systemie 3D, komórki hodowano na nieadherentnym podłożu w medium z dodatkiem metylocelulozy, a następnie utworzone w ten sposób sferki przenoszono do kolagenu typu IV. Po 24 h można było obserwować „wypustki”, które utworzone były z 2 lub 3 komórek o wydłużonym kształcie odchodzące pod różnymi kątami od sferek. Proces ten przypomina jeden z pierwszych etapów

limfangiogenezy czy angiogenezy *in vivo*, a więc uwolnienie proteinaz przez komórki śródbłonka i trawienie macierzy zewnątrzkomórkowej (w tym teście - kolagenu), a następnie migracja i/lub proliferacja komórek śródbłonka i tworzenie struktur naczyniowych (w tym teście - wypustek) [149].

Średnia liczba i suma długości wypustek odzwierciedla potencjał limfangiogeny komórek w sferkach. Oba te parametry były ponad dwukrotnie wyższe w komórkach kontrolnych (odpowiednio  $4,2 \pm 0,3$  i  $5,7 \pm 1,1$  mm) niż w komórkach z wyciszoną ekspresją białka ADAM17 (odpowiednio  $2,0 \pm 0,9$  i  $2,5 \pm 1$  mm) (**Rysunek 13**). Aby pobudzić komórki LEC do migracji, do hodowli dodawano VEGFC, co stymulowało powstawanie i wydłużenie się wypustek sześć- do ośmiokrotnie, jednak nie znosiło różnic między porównywanymi komórkami. Warto wspomnieć, że dodatek VEGFC do dwuwymiarowej hodowli LEC nie wpływał na ich proliferację (danych nie pokazano).

Stwierdzono, że oprócz samej migracji komórek LEC, ich zdolność do wymigrowania z istniejącego już zbiorowiska komórek silnie zależy od ekspresji białka ADAM17. Oba te procesy zależne są od wzajemnych oddziaływań pomiędzy komórkami oraz pomiędzy komórkami a ich otoczeniem, co starano się zbadać w kolejnych eksperymentach.



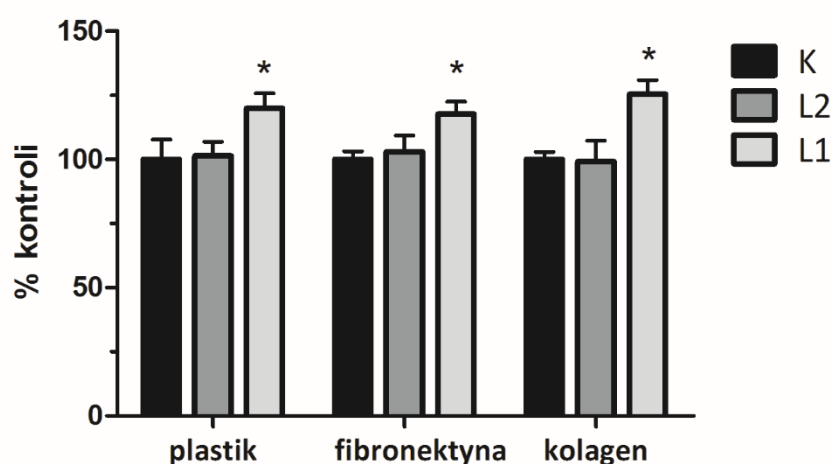
**Rysunek 13. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na "limfangiogenezę in vitro" w hodowlach 3D. (A)** Analiza tworzenia wypustek przez sfereki komórek K i L1 hodowane bez i w obecności VEGFC. Słupki reprezentują wartości średnich arytmetycznych  $\pm$  SD liczby wypustek tworzonych przez sfereki i sumy ich długości z 3 niezależnych eksperymentów, w których analizowano po 10 sferek. \* $P < 0,05$  vs K (odpowiednio - i +VEGFC), # $P < 0,02$  vs odpowiednie komórki bez stymulacji VEGFC. **(B)** Zdjęcia sferek komórek K i L1 z mikroskopu świetlnego, po 24 h hodowli w kolagenie z dodatkiem VEGFC. Podziałka na zdjęciu odpowiada 50  $\mu$ m.

## 7. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na adhezję komórek LEC do różnych podłoży

Różnice w adhezji komórek LEC – kontrolnych i z wyciszoną ekspresją białka ADAM17 – zauważono od początku pracy z liniami K, L1 i L2. Po pasażu komórki kontrolne wolniej adherowały do podłoża niż te z wyciszoną ekspresją ADAM17. Aby dokładniej to zbadać, komórki, które nie zaadherowały do podłoża po określonym czasie od ich wysiania odpłukiwano a do hodowli, na ok. 3 h, dodawano alamarBlue.

Substancja ta przekształcana jest przez metabolizujące komórki do fluorescencyjnego związku, którego ilość można łatwo zmierzyć. Po optymalizacji warunków doświadczenia, za czas, przy którym obserwuje się największe różnice w adhezji komórek różnych sublinii uznano 15 min (danych nie pokazano). Testy wykonano również na innych podłożach – fibronektynie i kolagenie – które lepiej odzwierciedlają oddziaływanie komórek LEC z macierzą zewnątrzkomórkową.

W tych warunkach doświadczalnych wykazano, że adhezja komórek LEC z obniżoną ekspresją białka ADAM17 do plastiku jest wyższa o  $19,9 \pm 5,9\%$  w komórkach L1 w porównaniu do komórek K. W przypadku fibronektyny i kolagenu było to odpowiednio  $17,7 \pm 4,9\%$  i  $25,4 \pm 5,6\%$ . Komórki L2 nie różniły się w adhezji do wszystkich badanych podłoży od komórek kontrolnych (**Rysunek 14**).



**Rysunek 14. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na adhezję komórek LEC do różnych podłoży.** Dane prezentowane są jako średnia arytmetyczna  $\pm$  SD z 5 (dla plastiku) i 3 (dla fibronektyny i kolagenu) niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w tryplikatach. Wartość sygnału fluorescencji produktu redukcji alamarBlue przez komórki kontrolne na każdym z podłoży przyjęto jako 100%. \* $P < 0.05$  vs K.

Wynik ten potwierdził obserwację, że komórki z niską ekspresją białka ADAM17 wykazują szybszą adhezję do podłoża. Może wynikać to z obecności większej ilości błonowych białek adhezyjnych niezłuszczonych przez ADAM17 z powierzchni tych komórek.

Komórki oddziałują z otoczeniem oraz z innymi komórkami głównie poprzez białka adhezyjne (*cell adhesion molecules*, CAMs). Do ich głównych rodzajów należą: integryny, kadheryny, selektyny, nadrodzina immunoglobulin oraz mucyny [150]. Analiza macierzy białkowych przedstawiona w p. 2 rozdziału Wyniki wykazała różnice w poziomie kilku białek adhezyjnych pomiędzy badanymi komórkami, w tym różnych łańcuchów integryn:  $\alpha v$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$ , a także białka BIG-H3 (TGF $\beta$ -Induced Gene H3) (Tabela 2sup). Wpływ BIG-H3 na migrację i adhezję komórek, w tym też komórek śródbłonna, pokazywany był w wielu pracach, np. [151], [152]. Zdecydowano dokładniej sprawdzić jak białko ADAM17 wpływa na ekspresję integryn i BIG-H3 na powierzchni komórek LEC, a zatem czy mogą one mieć wpływ na zaobserwowane różnice w migracji i adhezji komórkowej.

#### **8. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na ekspresję integryn na błonie komórkowej i na poziom mRNA i białka BIG-H3**

Integryny mają duże znaczenie w rozwoju i funkcjonowaniu naczyń limfatycznych. Biorą udział zarówno w oddziaływaniach międzykomórkowych, jak i w oddziaływaniach komórek z macierzą zewnątrzkomórkową, jako że są receptorami dla takich białek jak kolagen, fibronektyna czy laminina [153]. Większość integryn ma zdolność oddziaływania z cytoszkieletem aktynowym [154], chociaż wykazano też, że integryna  $\alpha 6\beta 4$  łączy się z filamentami pośrednimi [155]. Dzięki swej lokalizacji i interakcji z wieloma białkami (w tym receptorami z rodziny EGF) integryny nie tylko są przekaźnikami sygnałów pochodzących od swoich ligandów (białek macierzy zewnątrzkomórkowej) ale także mogą modulować inne sygnały; m.in. uczestniczą w regulacji poziomu wapnia w komórkach i w regulacji ekspresji różnych genów [156]. Zahamowanie aktywności poszczególnych integryn poprzez specyficzne inhibitory może silnie ograniczać limfangiogenezę [157]. Jako szczególnie ważne w rozwoju naczyń limfatycznych uznaje się integryny  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  oraz  $\alpha 9\beta 1$  [157].

Aby zbadać wpływ metaloproteazy ADAM17 na funkcjonalność integryn na powierzchni LEC, wykonano test wiązania komórek do immobilizowanych na płycie przeciwciał, specyficznych dla konkretnych białek lub receptorów integrynowych. Wykazano, że komórki L1 oddziałują silniej niż K z przeciwciałami rozpoznającymi łańcuchy  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  i  $\alpha 5$ , a także receptor  $\alpha 5\beta 1$  odpowiednio o ok. 97, 47, 81 i 38% (**Rysunek 15A**). Natomiast komórki L1 oddziałują słabiej z przeciwciałami rozpoznającymi łańcuch b4. Na niższy poziom łańcucha b4 w lizacie sublinii L1 wskazywała także analiza macierzy białkowych (**Tabela 2sup**).

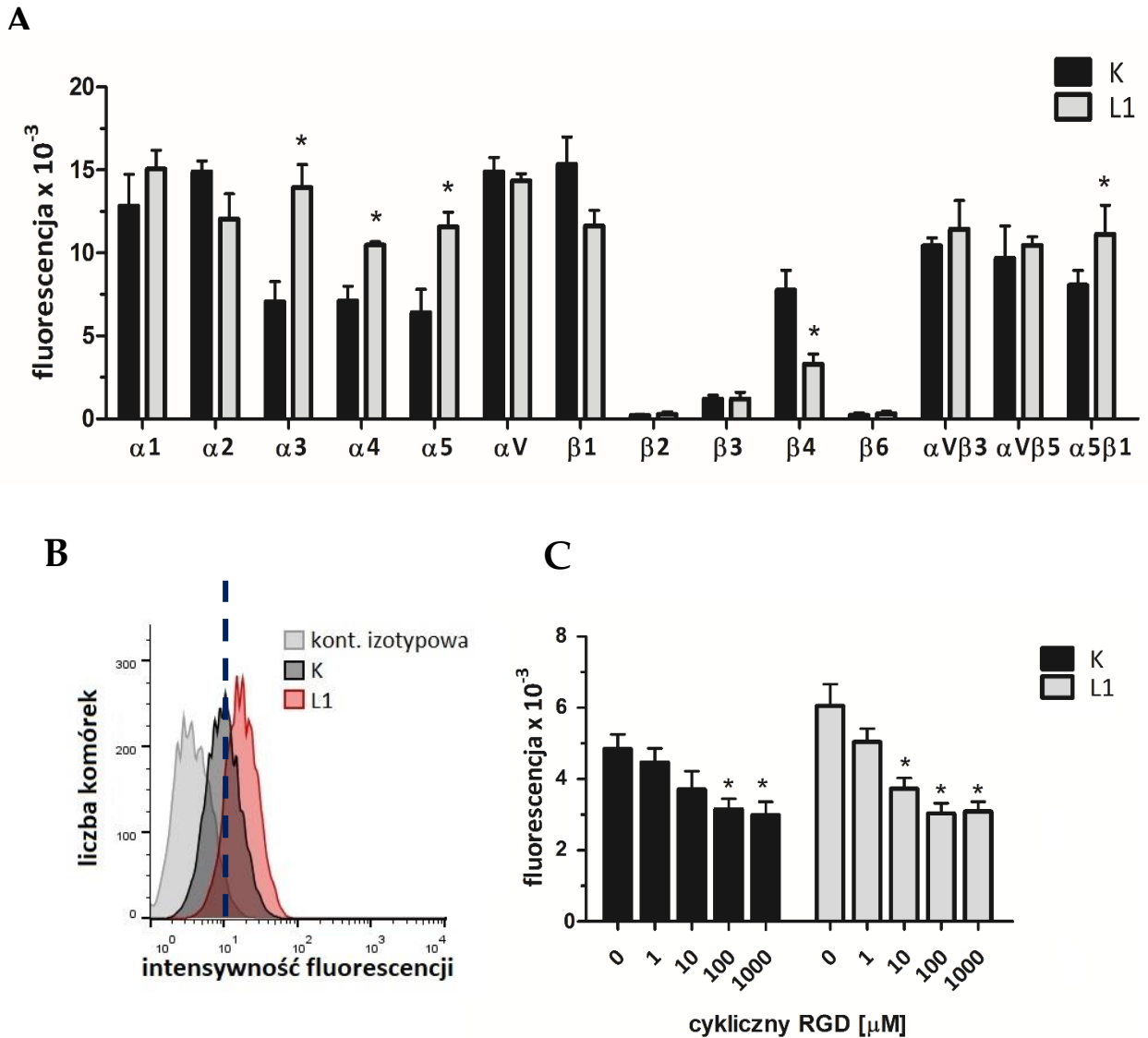
W pojedynczym eksperymencie stwierdzono, że komórki L2 nie różnią się od komórek K wiązaniem do przeciwciał rozpoznających różne łańcuchy integryn z wyjątkiem oddziaływania z przeciwciałami anti- $\alpha 5\beta 1$  (sygnał w przypadku komórek L2 był wyższy o 60% niż w komórkach K). Aby sprawdzić, czy wykazana w teście, powtarzająca się, ale nieistotna statystycznie, różnica pomiędzy subliniami w wiązaniu do przeciwciał dla integryny  $\alpha 1$ , wynikała z określonej czułości testu czy z braku rzeczywistych różnic w jej poziomie w błonie komórkowej, wykonano dodatkowo barwienie cytometryczne. Mimo stosunkowo niskiego sygnału fluorescencji, intensywność fluorescencji przeciwciał rozpoznających łańcuch  $\alpha 1$  związanych z komórkami L1 była wyższa (średnia geometryczna (GeoM) –  $20,4 \pm 3,5$ ) niż intensywność fluorescencji komórek L2 (GeoM –  $15 \pm 2,8$ ) i K (GeoM –  $13,3 \pm 4,2$ ). Założono bramkę obejmującą populację tzw. komórek pozytywnych, czyli o intensywności fluorescencji wyższej niż najwyższa wartość intensywności fluorescencji kontroli izotypowej. Stwierdzono, że procent tak zdefiniowanych pozytywnych komórek wynosił średnio  $68,3 \pm 5,5$  dla L1 i  $36 \pm 14\%$  dla K (**Rysunek 15B**) oraz  $47 \pm 2,8\%$  dla L2.

Cząsteczki wszystkich receptorów integrynowych są heterodimerami składającymi się z podjednostek alfa i beta. Istnieje 13 różnych łańcuchów  $\alpha$  i 8 łańcuchów  $\beta$ . Łańcuchy  $\alpha$  i  $\beta$  wiążą się w określony sposób tworząc 24 białka integrynowe. Poszczególne łańcuchy beta mogą tworzyć pary z jednym, dwoma lub kilkoma

różnymi łańcuchami alfa. To nie ekspresja pojedynczych łańcuchów alfa i beta, a możliwość utworzenia pełnych funkcjonalnych receptorów w błonie komórkowej odgrywa faktyczną rolę w komórkach [158].

Integryny rozpoznają w wielu białkach macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym w fibronektynie, witronektynie czy fibrynogenie tripeptyd Arg-Gly-Asp (RGD) [159]. Zastosowanie syntetycznego peptydu blokuje miejsce wiążące integryn, przez co ogranicza ich oddziaływanie z innymi białkami. Tę właściwość wykorzystano w kolejnym eksperymencie, w którym analizowano czy różnice w adhezji pomiędzy subliniami komórek LEC mogą wynikać z różnic w powierzchniowej ekspresji integryn. W teście wiązania do immobilizowanych przeciwciał anti-integryny wykazano, że poziom integryny  $\alpha 5\beta 1$  (m.in. receptora dla fibronekty [160]) jest wyższy na komórkach L1 niż K. Aby zbadać czy zahamowanie oddziaływań, w których uczestniczy  $\alpha 5\beta 1$ , zniesie różnice w własnościach adhezyjnych pomiędzy subliniami LEC, zastosowano cykliczny pentapeptyd zawierający sekwencję RGD (cRGDfC, tebu-bio, określany dalej jako cRGD), który jest bardzo silnym i selektywnym ligandem dla integryn zawierających łańcuch  $\alpha 5$  lub  $\alpha v$  [161], [162].

Wykazano iż po inkubacji komórek z cRGD ich adhezja do fibronektyny była hamowana w sposób zależny od stężenia peptydu. Jego wysokie stężenie (1 mM) zrównało poziom adhezji w komórkach L1 i K. Stwierdzono również, że adhezja komórek L1 była w sposób statystycznie istotny hamowana przy niższych stężeniach peptydu (10  $\mu$ M) w porównaniu do komórek kontrolnych (100  $\mu$ M) (**Rysunek 15C**).



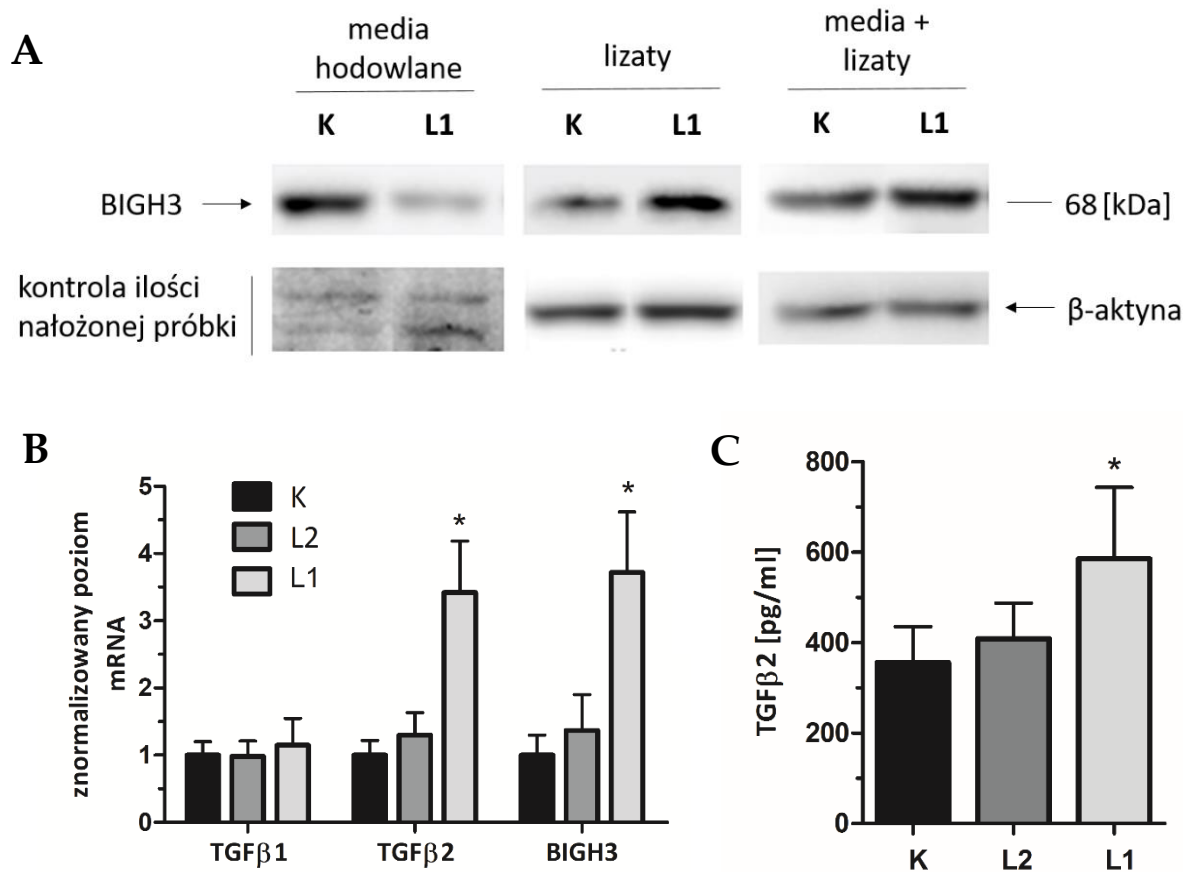
**Rysunek 15. Wpływ białka ADAM17 na poziom integryn i ich rolę w adhezji komórek L1 i K. (A)** Poziom fluorescencji komórek barwionych CyQuant GR, zaadherowanych po 60 min inkubacji do przeciwciał specyficznych dla różnych łańcuchów i receptorów integryn, unieruchomionych na płytce. Dane prezentowane są jako wartości średnich arytmetycznych  $\pm$  SD z 2 niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach. \* $P < 0.05$  vs K. **(B)** Analiza cytometryczna poziomu integryny  $\alpha 1$  na powierzchni sublinii komórek LEC. Wykres przedstawia reprezentatywny wynik jednego z trzech eksperymentów. Przerywana linia przedstawia założoną bramkę **(C)** Wpływ cyklicznego peptydu RGD na zahamowanie adhezji komórek LEC do fibronektyny. Dane prezentowane są jako średnia fluorescencja  $\pm$  SD z jednego z 3 niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach. \* $P < 0.05$  vs K lub L1 bez dodatku RGD.

Otrzymany wynik wskazuje, że integryny mogą być jednym z białek wpływających na adhezję komórek LEC, a ich ekspresja w błonie i/lub funkcjonalność mogą być w pewien sposób zależne od aktywności białka ADAM17.

Drugim interesującym białkiem adhezyjnym, którego poziom był wyższy w lizatach L1 w porównaniu do K było BIG-H3 nazwane także TGFBI (*transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) inducible*). Jest to białko wydzielnicze, znajdujące się w macierzy zewnątrzkomórkowej, którego ekspresję oprócz TGF $\beta$  mogą stymulować także IL-1 i IL-4, TNF czy retinoidy [152]. Jego rolę udowodniono w adhezji i migracji komórek, angiogenezie, morfogenezie czy gojeniu ran, a jego nadekspresja obserwowana jest w wielu typach nowotworów [152]. Rolę BIG-H3 wykazywano także w komórkach śródbłonna limfatycznego w warunkach hipoksji. Wpływał on na przyspieszenie migracji i zwiększenie adhezji komórek [163].

Aby potwierdzić wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na BIG-H3 wykonano analizę Western blotting ze specyficznymi dla niego przeciwciałami. Doświadczenie to wykazało, że różnica w poziomie BIG-H3 pomiędzy subliniami LEC była zauważalna nie tylko w lizatach (więcej w L1 niż w K), ale także w mediach hodowlanych (więcej w K niż w L1), a także w całkowitej jego produkcji (więcej w L1 niż w K) (**Rysunek 16A**). Okazało się, że jego zwiększony poziom w komórkach L może wynikać, przynajmniej po części, ze zmian na poziomie transkryptu, którego w komórkach L1 i L2 było odpowiednio 4 i 1,3 razy więcej niż w K. Jako że jednym z głównych czynników stymulujących ekspresję genu kodującego białko BIG-H3 jest TGF $\beta$  [152], sprawdzono poziom transkryptów trzech izoform TGF $\beta$  w subliniach LEC. Stwierdzono, że ilość transkryptu dla TGF $\beta$ 1 i TGF $\beta$ 3 jest w nich porównywalna, za to ekspresja TGF $\beta$ 2 jest nasiloną w komórkach z wyciszoną ekspresją ADAM17: poziom TGF $\beta$ 2 mRNA jest o ok. 4 razy większy w L1 niż w K (**Rysunek 16B**). Zwiększonej ekspresji genu towarzyszył podwyższony poziom białka w mediach hodowlanych, co potwierdzono metodą ELISA. W pożywkach po hodowli komórek

L1 stężenie białka TGFβ2 wynosiło  $585,9 \pm 157,5$  pg/ml, L2 –  $408,9 \pm 78,7$  pg/ml a w K  $356,4 \pm 79,1$  pg/ml (**Rysunek 16C**). Stężenie TGFβ1 było takie samo w pożywkach badanych sublinii i wynosiło ok.  $322,9 \pm 58,6$  pg/ml. Wzrost poziomu TGFβ2 w komórkach z wyciszonym białkiem ADAM17 (L1) mógłby tłumaczyć wyższą ekspresję BIG-H3 w tych komórkach. Powód obniżonego poziomu uwalniania tego białka do medium hodowlanego pozostaje jednak w sferze hipotez (patrz str. 68)



**Rysunek 16. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na ekspresję białka BIG-H3 i TGFβ w L1, L2 i K. (A)** Analiza Western blotting poziomu białka BIG-H3 w lizatach i mediach komórek L1 i K. Jako kontrolę ilości nałożonego na żel białka w lizatach i prawidłowego transferu białek na membranę wykorzystano poziom β-aktyny, a w przypadku mediów intensywność prążków na membranę wybarwionej barwnikiem Coomassie. Reprezentatywny wynik z 2 przeprowadzonych, niezależnych doświadczeń. **(B)** Względny poziom transkryptów dla białek BIG-H3, TGFβ1, TGFβ2 w subliniach L1, L2 i K. Poziom badanych transkryptów w komórkach kontrolnych przyjęto jako 1. Wyniki przedstawiają wartości średnich arytmetycznych ± SD z 5 (dla L1 i K) i z 2 (dla L2) niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach. \*P<0.01 vs K. **(C)** Poziom TGFβ2 w mediach komórek L1, L2 i K. Dane prezentowane są jako wartości średnich arytmetycznych ± SD z 3 niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach. \*P<0.05 vs K.

Zwiększony poziom białka BIG-H3 w komórkach L1 w porównaniu do K może wpływać na ich zwiększoną adhezję, szczególnie, że udowodniono oddziaływanie tego białka z integrynami (między innymi przez motyw RGD), zwłaszcza z  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  [163].

Białka adhezyjne, na które ADAM17 może mieć wpływ, biorą udział nie tylko w oddziaływaniach z podłożem/macierzą zewnątrzkomórkową, ale także w tych międzykomórkowych. Jako że naczynia limfatyczne są drogą nie tylko dla komórek immunologicznych, ale także nowotworowych, sprawdzono czy komórki kilku wybranych linii oddziałują z różnym powinowactwem z subliniami LEC różniącymi się poziomem ekspresji białka ADAM17.

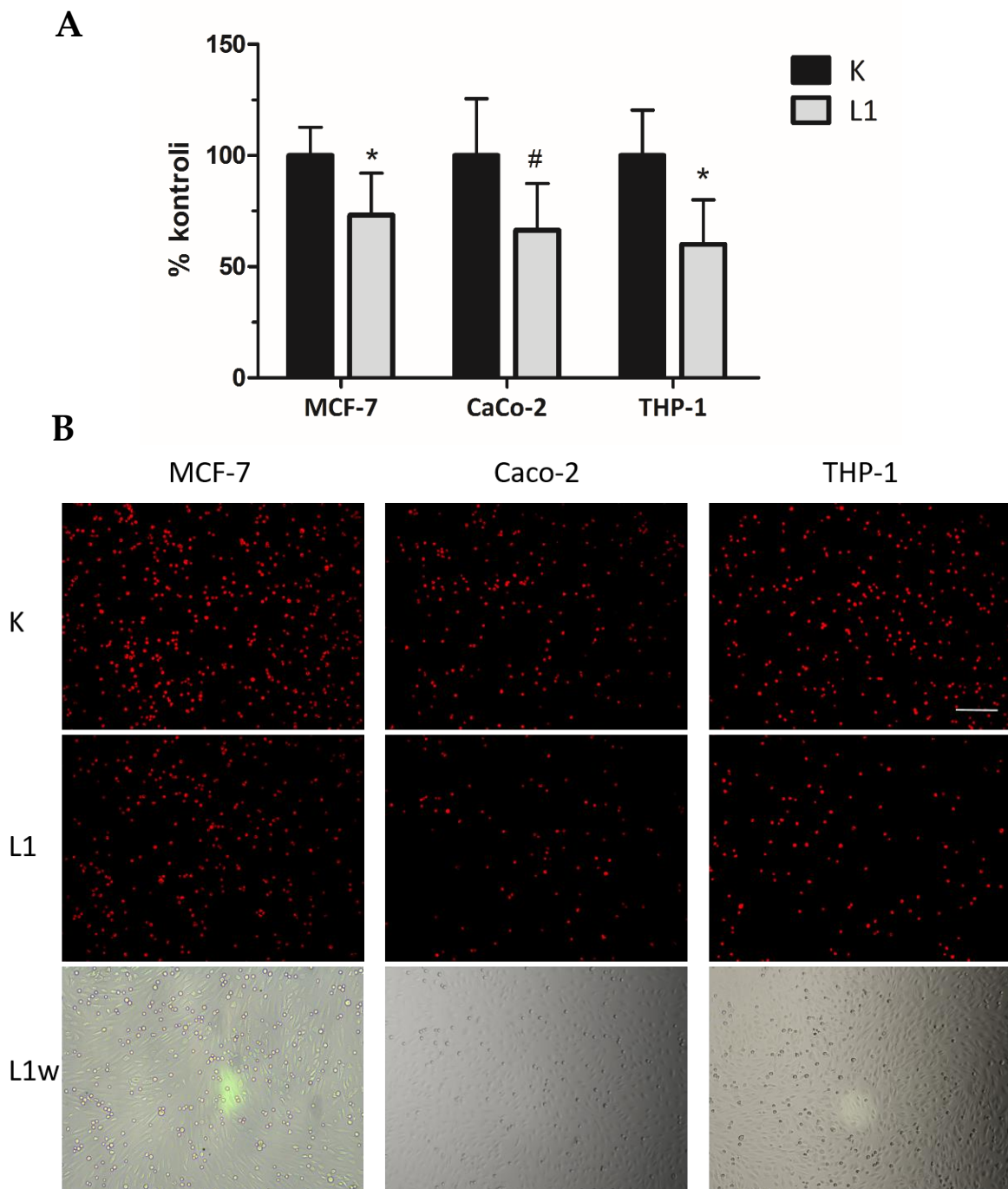
## **9. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na oddziaływania między komórkami LEC a innymi komórkami**

Do testów adhezji z komórkami LEC wykorzystano ludzkie linie nowotworowe: MCF-7 (nowotwór piersi), Caco-2 (nowotwór jelita) oraz THP-1 (białaczka monocytarna). Dodatkowo testy adhezji przeprowadzono na jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) izolowanych z ludzkiej krwi (dr Monika Bzowska). Testy przeprowadzono 1 do 3 h po ich izolacji; do każdego doświadczenia wykorzystywano komórki innej osoby. Komórki nowotworowe oraz immunologiczne barwiono fluorescencyjnie, po czym dodawano na wysiane na płytkach komórki LEC L1 lub K. Po 20 minutach studnie płukano, a zaadherowane do LEC komórki wykazujące fluorescencję, liczone pod mikroskopem.

Zaskakująco, mimo obserwowanej zwiększonej adhezji komórek L1 do białek macierzy zewnątrzkomórkowej, to komórki kontrolne dużo silniej oddziaływały z komórkami nowotworowymi. W wykonanych testach adhezji wykazano, że odpowiednio  $73\pm 19\%$ ,  $66\pm 24\%$ ,  $60\pm 20\%$ , więcej komórek MCF-7, Caco-2, THP-1 zaadherowało w tym samym czasie do komórek K niż do komórek L1 (**Rysunek 17**).

W przypadku limfocytów wyniki nie były tak jednoznaczne i na pięć wykonanych eksperymentów, w dwóch z nich wykazano zwiększoną adhezję PBMC do komórek K, w jednym do komórek L1 i w dwóch brak znaczących różnic między badanymi komórkami. Dodatkowo występowały bardzo silne różnice pomiędzy eksperymentami w ilości zaadherowanych komórek. Ze względu na fakt, iż PBMC były izolowane od różnych osób mogły znacząco różnić się między sobą ekspresją poszczególnych białek adhezyjnych.

Uzyskane wyniki wskazują, że zmieniona ekspresja białka ADAM17 może wpływać na oddziaływanie komórek naczyń limfatycznych nie tylko z macierzą zewnątrzkomórkową, ale także z komórkami immunologicznymi lub nowotworowymi. Nie jest jasne, jakie cząsteczki odpowiedzialne są za silniejszą adhezję komórek nowotworowych do komórek K, szczególnie, że obserwowano zwiększony poziom różnych białek adhezyjnych (kadheryny 13, łańcucha integryny  $\alpha V$ ) lub ich oddziaływania (łańcuchy integryn  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  i  $\alpha 5\beta 1$ ) w błonie komórek z niską ekspresją białka ADAM17. Wynik ten stanowił ważną informację w kontekście drugiej części pracy, gdzie skupiono się na roli białka ADAM17 w procesach związanych ze wzrostem i przerzutowaniem nowotworów.



**Rysunek 17. Analiza adhezji różnych typów komórek do sublinii LEC. (A)** Słupki przedstawiają wartości średnich arytmetycznych liczby komórek nowotworowych  $\pm$  SD związanych z monowarstwą sublinii LEC z 3 niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach lub tryplikatach. Studnie z komórkami fotografowano pod mikroskopem fluorescencyjnym (3 zdjęcia na studnię, z nienachodzących na siebie pól). Zdjęcia wykorzystywano do policzenia komórek. Liczbę zaadherowanych do K wybarwionych komórek poszczególnych linii nowotworowych przyjęto jako 100%. \* $P < 0.02$  vs K # $P < 0.05$  vs K **(B)** Zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego komórek MCF-7, CaCo-2 i THP-1 barwionych PKH26, zaadherowanych do sublinii komórek LEC. Przedstawiono sygnał fluorescencyjny komórek na monowarstwach K i L1 oraz obraz komórek na monowarstwie L1 w świetle białym (L1w). Podziałka na zdjęciu odpowiada 100  $\mu$ m.

## CZEŚĆ II

### **Rola białka ADAM17 we wzroście i rozwoju nowotworów na przykładzie komórek mysiego czerniaka**

Aby zbadać rolę białka ADAM17 we wzroście i przerzutowaniu mysiego nowotworu skóry - czerniaka, zdecydowano się, podobnie jak w powyżej opisanej części pracy związanej z naczyniami limfatycznymi, ograniczyć ekspresję tej metaloproteazy, tym razem w komórkach B16F10. Pozwoliło to na badania, jak ADAM17 wpływa na wzrost, migrację oraz oddziaływania komórek czerniaka z komórkami śródbłonna *in vitro* i *in vivo* w modelu mysim oraz na migrację komórek i angiogenezę w embrionach ryby danio przegowane. Pierwszym krokiem badań było stworzenie odpowiedniego modelu komórkowego.

Na wybór tej konkretnej linii komórkowej wpłynęło kilka czynników. B16F10 opisywane są jako komórki przerzutujące, zarówno poprzez naczynia krwionośne jak i limfatyczne, po podaniu ortotopowym - czyli do tkanki z której pochodzą. Dodatkowo, badania wstępne wykonane przez dr Sudiptę Das, wskazywały, że zahamowanie ekspresji białka ADAM17 w tym nowotworze ogranicza jego wzrost.

#### **10. Stworzenie modelu komórkowego do badania wpływu białka ADAM17 na komórki nowotworowe B16F10**

Początkowo w naszym zespole prowadziliśmy badania nad wpływem wyciszenia białka ADAM17 w różnych komórkach stosując plazmidy kodujące wyciszające shRNA i selekcionując klony komórek z najsilniej wyciszoną ekspresją. Takiemu podejściu jednak towarzyszyło niebezpieczeństwo wyłonienia takich klonów, w których różnice fenotypowe będą wynikały z klonalności a nie z wyciszenia genu.

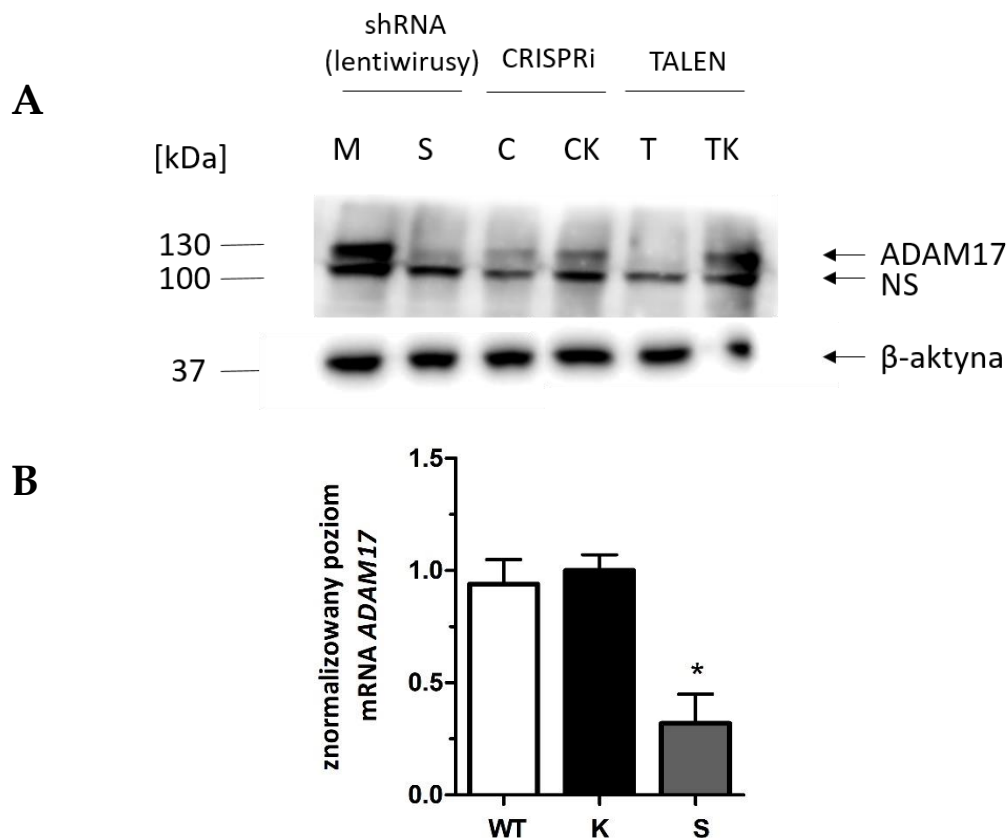
Wraz z rozwojem technik edycji genomu, pojawiło się więcej możliwości i metod umożliwiających stworzenie linii komórkowych z obniżoną lub całkowicie zahamowaną produkcją danego białka. W naszym zespole badawczym podjęto próbę

stworzenia komórek różnych linii nowotworowych z nokautem metaloproteazy ADAM17 wykorzystując metody TALEN oraz CRISPRi (mgr Maria Czarnek i dr Jarosław Jucha). Niestety w przypadku komórek B16F10, po transfekcji odpowiednio zaprojektowanymi plazmidami (metoda TALEN) i po selekcji klonalnej, udało uzyskać się tylko jeden klon z całkowitym brakiem syntezy białka ADAM17. Linia wyprowadzona z pojedynczej komórki, ze względu na możliwość niespecyficznego wbudowania się transgenu, a także posiadania różnych mutacji (co w komórkach czerniaka jest bardzo częstym zjawiskiem) nie jest najlepszym modelem do prowadzenia badań. Niektóre obserwowane cechy takich komórek mogą w ogóle nie mieć związku z zahamowaną ekspresją danego białka.

Jako, że metodą tę, podobnie jak tę zastosowaną wcześniej (transfekcja plazmidami kodującymi wyciszające shRNA) nie stworzono satysfakcjonującego modelu do badań, próbowano go uzyskać także metodą CRISPRi. Aby uniknąć efektu klonalności, zachowano całą populację komórek B16F10, które uległy transfekcji odpowiednio zaprojektowanym plazmidem (zawierającym gen oporności na puromycynę) i przeżyły presję antybiotykową. Sumarycznie w całej populacji, poziom ekspresji tego białka wynosił około 30-40% w stosunku do komórek typu dzikiego (**Rysunek 18A**). Populacja zawierała prawdopodobnie komórki, w których naprawa genomu poprzez mechanizm NHEJ nie doprowadziła do przesunięcia ramki odczytu oraz komórki, w których doszło do zmiany w obrębie co najmniej jednego allelu. Przy założeniu, że ADAM17 pełni w komórkach istotne funkcje można się spodziewać, że w trakcie dalszej hodowli populacja komórek produkujących białko ADAM17 na wysokim poziomie będzie się jednak zwiększać. W związku z tym zdecydowano się wyciszyć ekspresję białka ADAM17 poprzez transdukcję lentiwirusową, a linie komórkowe otrzymane techniką TALEN i CRISPRi, wykorzystywać tylko w niektórych eksperymentach, jako dodatkową kontrolę specyficzności efektów obserwowanych w linii komórkowej uzyskanej dzięki zastosowaniu lentiwirusów. Dla każdej stworzonej sublinii przygotowano odpowiednią kontrolę:

- Dla komórek z nokautem białka ADAM17, nazywanej w dalszej części pracy **komórkami T**, były to B16F10 transfekowane plazmidami niezawierającymi sekwencji kodującej domeny TALEN. Komórki pięciu z tak uzyskanych klonów spulowano w równym stosunku. Oznaczono je jako **komórki TK**.
- Dla sublinii stworzonej z puli komórek z różnym poziomem białka ADAM17, uzyskanej metodą CRISPRi, nazywanej w dalszej części pracy: **komórkami C**, za kontrolę uznano pulę komórek B16F10, transfekowaną plazmidem bez fragmentu sgRNA, który odpowiedzialny jest za rozpoznawanie docelowej sekwencji DNA. W dalszej części pracy oznaczono je jako **komórki CK**.
- Dla sublinii stworzonej poprzez transdukcję lentiwirusową, nazywanej w dalszej części pracy **komórkami S**, kontrolę stanowiły komórki otrzymane w ten sam sposób w jaki opisano to w punkcie 1 wyników – w przypadku komórek LEC. Zastosowano jedynie większe MOI - odpowiadające takiemu, jakie wykorzystano przy transdukcji komórek B16F10 w celu wyciszenia białka ADAM17. W dalszej części pracy oznaczono je jako **komórki M** (mock transfected).

Poziom białka ADAM17 w przygotowanych subliniach sprawdzono poprzez analizę Western blotting (**Rysunek 18A**). Dla komórek transdukowanych lentiwirusem sprawdzono także poziom transkryptu techniką RT-qPCR (**Rysunek 18B**).



**Rysunek 18. Ocena poziomu białka ADAM17 w subliniach B16F10.** Ekspresję ADAM17 w komórkach B16F10 wyciszano trzema metodami: TALEN, CRISPRi i transdukcją lentiwirusową za pomocą specyficznego shRNA. S, C, T – komórki z wyciszoną ekspresją ADAM17, M, CK, TK, komórki kontrolne. **(A)** Poziom białka ADAM17 po wyciszeniu analizowano za pomocą techniki Western blotting. Na żel poliakrylamidowy nakładano po 30 µg białka lizatów komórkowych. Poziom β-aktyny w próbkach wykorzystano jako kontrolę ilości nałożonego na żel białka i prawidłowego transferu białek na membranę. NS – prążek niespecyficzny. **(B)** Względny poziom transkryptu dla białka ADAM17 w komórkach po transdukcji lentiwirusowej analizowano także przy pomocy qRT-PCR. Poziom transkryptu w komórek kontrolnych przyjęto jako 1. Dane prezentowane są jako średnia ± odchylenie standardowe (SD) z 3 niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach. \* $P < 0,01$  vs K.

Po stworzeniu sublinii komórek B16F10 istotne było scharakteryzowanie ich zdolności do proliferacji i migracji zależnie od poziomu białka ADAM17.

## 11. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na proliferację komórek B16F10

W opisywanych w pierwszej części pracy komórkach LEC, wyciszenie ekspresji białka ADAM17 nie wpływało na ich proliferację. W wielu badaniach pokazywano jednak, że szedaza ta wpływa na podziały komórkowe w licznych liniach nowotworowych [28], [30], [53], [54]. Dlatego też zdecydowano się sprawdzić, czy istnieje zależność między proliferacją komórek B16F10 a poziomem białka ADAM17.

Tempo proliferacji badano przez pomiar aktywności mitochondrialnej (test MTT, test z alamarBlue) oraz przez analizę cyklu komórkowego (danych nie pokazano). Pierwsze wykonane eksperymenty, nie wykazały żadnych różnic między wzrostem sublini M i S. Jednak rezultaty uzyskane z badań *in vivo* przeprowadzonych na myszach (opisane poniżej) wskazywały na różnicę w ich potencjale proliferacyjnym. Stwierdzono, że być może warunki *in vitro*, w których sublinie rosły w monowarstwie i w dużej gęstości, nie pozwalają na zaobserwowanie wpływu poziomu ADAM17 na ich wzrost. Dlatego też przeprowadzono dodatkowe eksperymenty: analizowano (i) wzrost komórek wysianych w bardzo małej gęstości, tak, aby nie miały ze sobą kontaktu, (ii) wzrost pojedynczych komórek niezależny od podłoża (wzrost w agarze), (iii) wzrost komórek w sferkach.

W przypadku wzrostu komórek wysianych w bardzo małej gęstości, te z obniżoną ekspresją ADAM17 (komórki S) wykazywały dużo wolniejsze tempo wzrostu od komórek M (**Rysunek 19A**). Dodatkowo, ich zdolność do podjęcia proliferacji była niższa - średnio: 563 na 1000 komórek vs 768 na 1000 wysianych komórek w przypadku M. Zmniejszenie ilości wyrosniętych kolonii zaobserwowano też dla komórek T vs TK, ale już nie dla komórek C vs CK (**Rysunek 1sup**).

Znacząco opóźniona była także pigmentacja komórek z niską ekspresją białka ADAM17 (**A nr. 3 i 4**). Co więcej, stwierdzono, że komórki S są bardziej wydłużone i nie tworzą tak silnie przylegającej struktury jak w przypadku komórek M

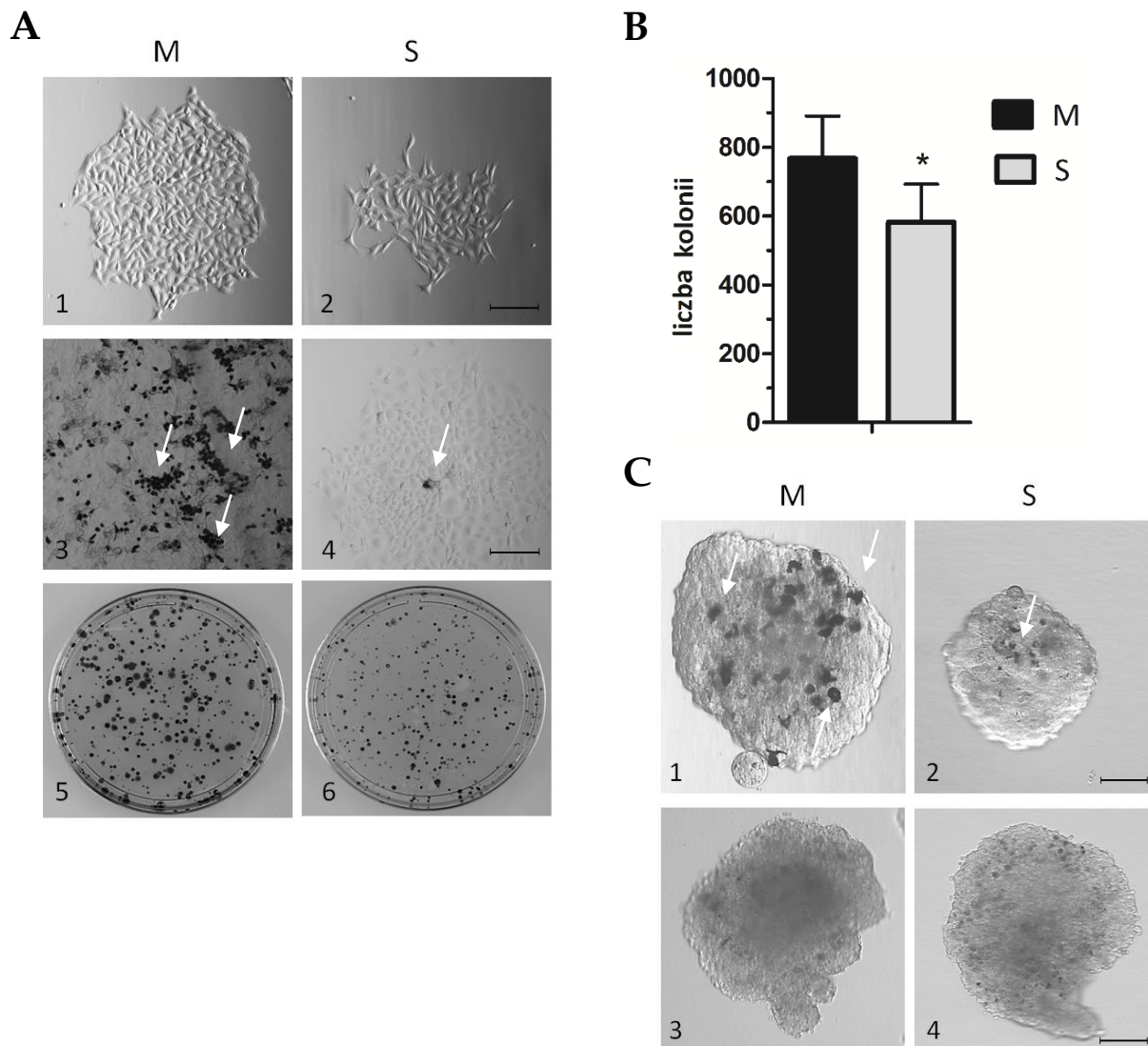
(**Rysunek 19 A nr. 1 i 2**). Aby sprawdzić, czy powyżej opisane różnice wynikały z autostymulacji komórek wynikającej z wydzielanych przez nie substancji, testy powtórzono, wymieniając komórkom medium co drugi dzień przez 1 tydzień eksperymentu, a następnie każdego kolejnego dnia. Ich wyniki nie różniły się jednak od tych, jakie uzyskano w hodowlach, w których wymieniono medium tylko raz (po 2 tygodniach).

Wyniki te wskazują, że aktywność białka ADAM17 wpływa na wzrost komórek i ich zdolność do podjęcia proliferacji i to niuwalniane z komórek substancje odpowiadają za różnicę w tych procesach między komórkami S i M. Mając na uwadze zaobserwowane w tym teście różnicę w oddziaływaniu ze sobą komórek (komórki M ściśle do siebie przylegają w przeciwieństwie do komórek S) (**Rysunek 19A nr 1 i 2**), zastanawiające było czy właśnie ta właściwość może mieć znaczenie dla proliferacji komórek.

Aby to sprawdzić, pojedyncze komórki hodowano w sposób niezależny od podłoża, a więc bardziej przypominający warunki *in vivo* – w agarze o niskiej temperaturze topnienia. Komórki rosły tworząc „kule” zawieszane w agarze, bardzo ściśle do siebie przylegając, niwelując różnicę w odległościach komórek i ich przylegania istniejące w poprzednim teście. Mimo tego, kolonie komórek S po 10 dniach eksperymentu były znacznie mniejsze od tych z komórek M, a więc różnica w proliferacji komórek wciąż występowała (**Rysunek 19 B nr. 1 i 2**). Nie można wykluczyć, że oddziaływanie na siebie komórek M było jednak wciąż różne od komórek S, jako, że pokazano, że białko ADAM17 może wpływać na profil ekspresji lub/i dystrybucji białek w komórkach w tym tych błonowych, które mogą mieć znaczenie w tym procesie.

Biorąc pod uwagę wynik dotyczący proliferacji komórek w dużej gęstości, a więc brak różnic między subliniami S i M, można podejrzewać, że białko ADAM17 ma największe znaczenie w przeżyciu i podjęciu proliferacji komórek B16F10 kiedy procesy te nie są silnie stymulowane przez inne mechanizmy np. wysokie stężenie czynników wzrostu czy oddziaływanie na siebie wielu komórek. Możliwe, że na

różnicę w ich proliferacji wpływa, wydłużony w przypadku komórek S, etap ich adaptacji do nowego środowiska i podjęcia wzrostu i podziałów komórkowych.



**Rysunek 19. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na proliferację komórek B16F10, (A)** Reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe komórek M i S rosnących na płytkach w niskiej gęstości po 14 (zdjęcie 1 i 2) i 21 (zdjęcie 3 i 4) dniach od ich wysiania. Na zdjęciu 5 i 6 pokazano komórki wybarwione fioletem krystalicznym 21 dni od ich wysiania. **(B)** Wykres przedstawiający średnią liczbę kolonii powstałych po wysianiu na płytce komórek w niskiej gęstości, po 21 dniach od rozpoczęcia eksperymentu. Dane prezentowane są jako średnia  $\pm$  SD z 5 niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach. \* $P < 0.05$  vs M. **(C)** Reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe komórek M i S rosnących w agarze w niskiej gęstości (zdjęcia 1 i 2) 10 dni po ich wysianiu, oraz sferek z komórek (zdjęcia 3 i 4) 5 dni po umieszczeniu ich w agarze. Strzałki na zdjęciach A 3, 4 oraz C 1, 2 wskazują upigmentowane komórki. Podziałka na zdjęciach odpowiada 50  $\mu$ m.

Zgodnie z tą hipotezą, większa ilość oddziałujących ze sobą komórek już na początku testu, zapewniająca im lepsze warunki do proliferacji (wzajemna stymulacja) powinna więc niwelować obserwowaną różnicę w ich wzroście. Dlatego też sprawdzono, czy komórki S lub M, już silnie na siebie oddziałujące – tworzące sferkę liczącą ok 1000 komórek, będą dalej wykazywać różnicę w proliferacji.

Po 7 dniach eksperymentu, okazało się, że sferki składające się z komórek S i komórek M miały taką samą średnicę (**Rysunek 19B 3 i 4**).

Powyżej opisane wyniki wskazują więc na możliwe znaczenie białka ADAM17 w zdolności komórek do „aklimatyzacji” w nowym środowisku i na ich przeżywalność w niskiej gęstości hodowli.

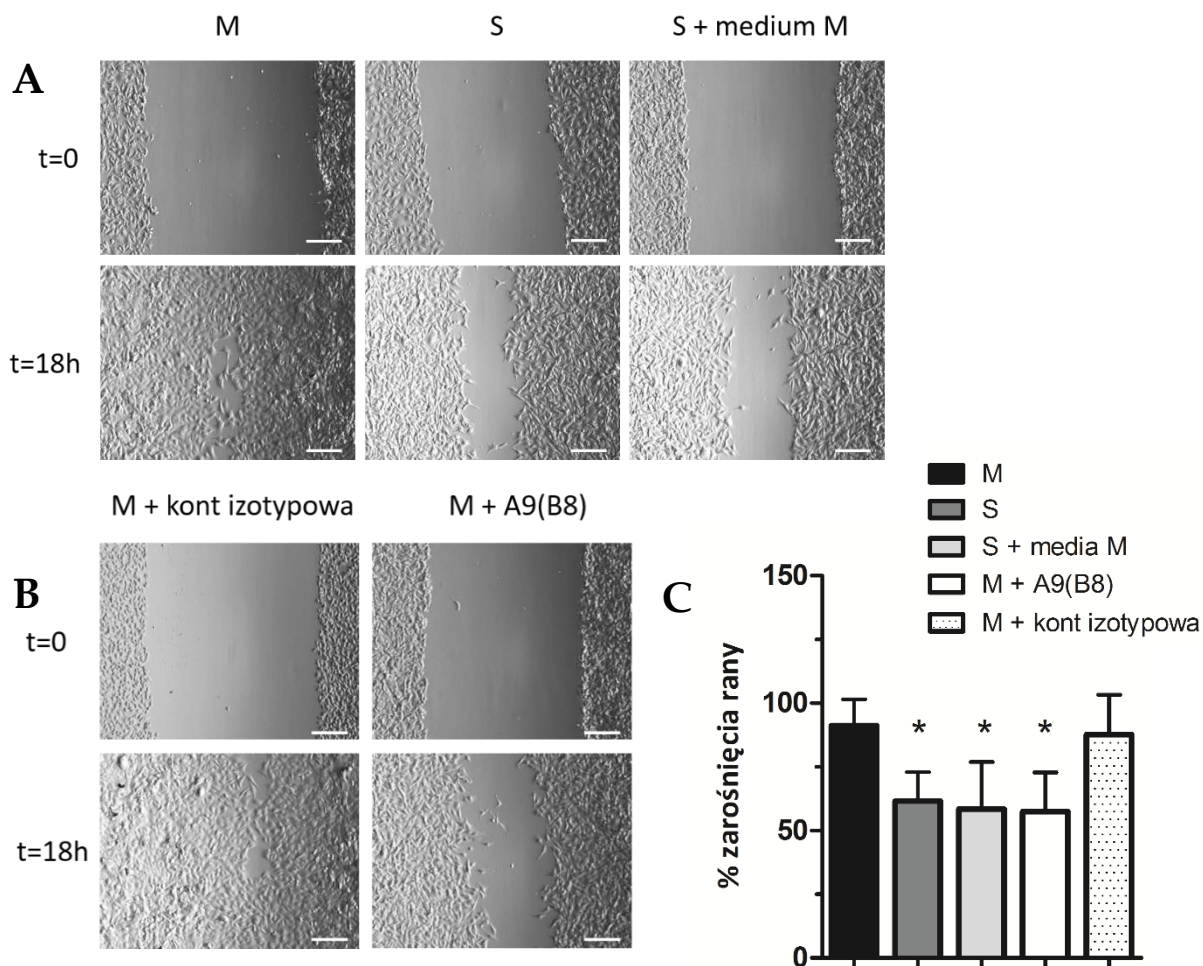
## **12. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na zdolność migracji komórek B16F10**

Rozwój nowotworów zależy nie tylko od tempa proliferacji jego komórek. Bardzo ważnym czynnikiem jest także ich zdolność do migracji, co może wpływać tak na wzrost jak i przerzutowanie nowotworu [164].

Zbadano więc jak wyciszenie ekspresji białka ADAM17 wpływa na potencjał migracyjny komórek B16F10 sprawdzając ich zdolność do zarastania „rany”. Ponieważ wcześniej wykazano, że wyciszenie ADAM17 nie wpływa na proliferację komórek rosnących w monowarstwie w dużej gęstości – można wnioskować, że potencjalne różnice w tempie zarastania rany przez różne sublinie B16F10 będą wynikały jedynie z różnic w ich ruchu. W teście rany badano więc migrację wszystkich stworzonych sublinii B16F10, a dodatkowo, aby potwierdzić rolę białka ADAM17 w tym procesie, do komórek M dodano przeciwciała hamujące jego aktywność - A9(B8) lub przeciwciała kontrolne - IZO.

W wykonanych eksperymentach wykazano, że komórki z niską aktywnością białka ADAM17 dużo wolniej zasklepiają wykonaną ranę niż komórki kontrolne, a więc wolniej migrują. Dodatek przeciwciał izotypowych do komórek M nie wpływał na

tempo ich migracji, ale przeciwciała hamujące aktywność ADAM17 ograniczały zarastanie rany do poziomu obserwowanego w komórkach S. Potwierdza to znaczenie tego białka w procesie migracji komórek B16F10. Wyniki dla komórek C i CK oraz T i TK zamieszczono w suplemencie (**Rysunek 2 sup**).



**Rysunek 20. Test rany komórek B16F10.** (A) Reprezentatywne zdjęcia komórek M, S oraz komórek S do których dodano medium znad komórek M. (B) Reprezentatywne zdjęcia komórek M, do których dodano przeciwciała kontrolne lub hamujące aktywność ADAM17 w stężeniu 200 nM. (A,B) Te same miejsca na płytkach fotografowano tuż po zranieniu oraz 18 h później. Podziałka na zdjęciach odpowiada 50  $\mu$ m. (C) Stopień zarośnięcia rany przez komórki M i S w różnych warunkach po 18 h od zranienia. Dane prezentowane są jako średnia  $\pm$  SD z 6 (dla M,S) i 3 (dla innych warunków) niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach. \* $P < 0,001$  vs M.

Inna szybkość migracji komórek M i S może wynikać np. z ich odmiennego oddziaływania ze sobą lub z podłożem. Jako, że różnica w potencjale migracyjnym nie została zniesiona po dodaniu do komórek S medium znad komórek M (zebranego po

24 h z nad ich gęstej hodowli) nie wynikała ona uwalnianych z komórek substratów białka ADAM17 (**Rysunek 20**). Brak tego efektu może wynikać z faktu, że w wykorzystywanych do badań komórkach B16F10 nie stwierdzono ekspresji receptora EGFR, przez który działa większość czynników wzrostu (danych nie pokazano).

### **13. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 w komórkach B16F10 na komórki śródbłonnków.**

Komórki nowotworowe wpływają nie tylko na siebie nawzajem, ale także na otoczenie w którym się znajdują, w tym na komórki śródbłonnków, a przez to m.in. na angiogenezę. Wywołuje ją niedotlenienie w obrębie guza, powodujące wydzielanie się z komórek nowotworowych substancji proangiogennych. Jednak nie tylko hipoksja wpływa na ten proces. Istotnymi molekułami w procesie angiogenezy są też np. czynniki wzrostu również wpływające na proliferację i migrację komórek śródbłonnków. Komórki z wyciszoną ekspresją ADAM17 mogą uwalniać do medium mniej biologicznie aktywnych cząsteczek, co być może przekłada się na ograniczenie proangiogennej aktywności komórek nowotworowych.

Zdecydowano się więc sprawdzić czy potencjalne różnice jakościowe i ilościowe w czynnikach uwalnianych z komórek B16F10 różniących się ekspresją ADAM17 wpływają na procesy związane z angiogenezą a więc na proliferację i migrację komórek śródbłonnka. W badaniach proliferacji – testem z alamarBlue, oraz migracji – zmodyfikowanym testem rany – wykorzystano dwie linie mysiego śródbłonnka włóśniczek: z mózgu (MBE) i z trzustki (MSI) do których dodawano media kontrolne lub z nad 24 h gęstej hodowli sublinii B16F10 M lub S.

Dodatek suplementowanej (albuminą, transferyną i selenem) pożywki DMEM z nad komórek B16F10 w porównaniu do świeżego suplementowanego medium, przyspieszał wzrost komórek MBE w przypadku mediów z nad komórek M i S odpowiednio o 30% i 17% (**Rysunek 21A**). Świadczy to o wpływie uwolnionych

z powierzchni komórek B16F10 białek na proliferację tej linii śródbłonków, których w mediach z nad komórek kontrolnych mogło być więcej. W przypadku komórek MSI nie wykazano różnicy w ich proliferacji niezależnie od dodawanego medium.

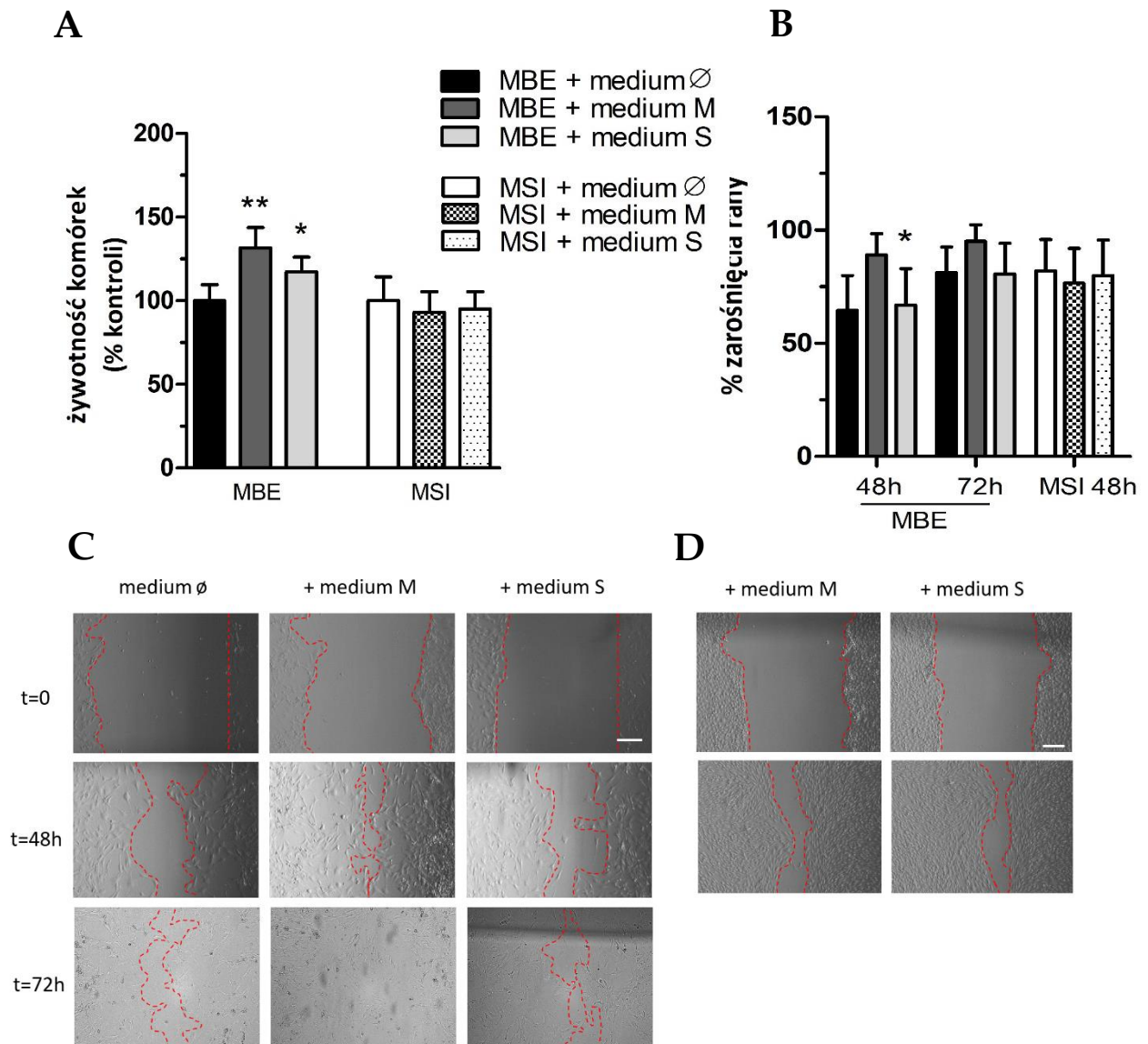
Na obserwowane różnice wpływać mogły uwalniane przez białko ADAM17 czynniki wzrostu, co omówiono poniżej, ale także inne białka. Jednym z najsilniejszych czynników stymulującym komórki śródbłonka jest VEGF. Istnieją badania, które pokazują zależność między ekspresją enzymu ADAM17 a poziomem tego białka (jego ekspresji lub jego wydzielania z komórek), mimo, że nie jest jasne z jakiego mechanizmu miałby wynikać taki efekt [30], [54], [165].

Metodą ELISA sprawdzono więc poziom rozpuszczalnego białka VEGF w mediach z nad hodowli komórek M i S B16F10. Mimo niewielkiej jego ilości uwalnianej przez komórki, okazało się, że jest go więcej bo ok.  $342 \pm 15$  pg/ml w przypadku mediów z nad komórek M i  $278 \pm 21$  pg/ml w mediach z nad komórek S. Aby jednak móc ocenić czy ten czynnik i taka ilość mogły wpłynąć na proliferację komórek MBE konieczne byłyby dodatkowe eksperymenty.

W badaniach migracji śródbłonków nie było możliwe wykonanie rany bez odrywania od płytki większości komórek, co wynikało z ich silnego oddziaływania ze sobą, szczególnie przy dużej gęstości hodowli. Zdecydowano się więc na zmodyfikowany test, w którym komórki wysiewano na płytki, na których umieszczono najpierw plastikowy sterylny pierścień. Kiedy komórki obrosły go, zarówno na zewnątrz jak i wewnątrz, usuwano go, a powstałą przestrzeń traktowano jako ranę. Stopień jej zarośnięcia analizowano po 48 h (komórki MBE i MSI) i 72 h (komórki MBE).

Komórki MBE stymulowane mediami znad B16F10 M migrowały dużo szybciej w porównaniu do tych w kontrolnym medium, tak, że po 72h rana nie była już widoczna. Po stymulacji mediami znad komórek B16F10 S nie zaobserwowano różnic w tempie migracji w porównaniu do kontroli, a po 3 dniach wciąż ok 20% rany było niezarośnięte (**Rysunek 21B i C**). Podobnie jak w przypadku proliferacji, różnica

w migracji komórek może wynikać z ilości czynników wzrostu lub innych białek, które w większej ilości zostały uwolnione do medium komórek kontrolnych. Ponownie, nie zaobserwowano wpływu mediów z komórek B16F10 na komórki MSI.



**Rysunek 21. Test proliferacji i migracji komórek śródbłonna po stymulacji mediami znad komórek S i M B16F10. (A)** Test MTT po 24 i 48 h od wysiania komórek MBE i MSI w medium kontrolnym (suplementowany DMEM bez dodatku FBS) lub z dodatkiem mediów z nad komórek M lub S. Dane prezentowane są jako średnia  $\pm$  SD z 3 niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach lub tryplikatach. Poziom absorbancji komórek kontrolnych w medium podstawowym przyjęto jako 100%. \* $P < 0,02$  vs medium kontrolne, \*\* $P < 0,002$  vs medium kontrolne. **(B)** Stopień zarośnięcia rany przez komórki MBE i MSI w różnych warunkach po 48 i 72 h od zranienia. Dane prezentowane są jako średnia  $\pm$  SD z 5 (dla MBE) i 2 (dla MSI) niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach. \* $P < 0,002$  vs M. **(C)** Reprezentatywne zdjęcia komórek MBE do których dodano medium kontrolne (10% DMEM) znad komórek M lub S. **(D)** Reprezentatywne zdjęcia komórek MSI do których dodano medium znad komórek M lub S. **(C, D)** Te same miejsca na płytce fotografowano tuż po zranieniu oraz 48 lub 72 h później. Podziałka odpowiada 50  $\mu$ m.

Bardziej adekwatnym modelem do badań angiogenezy *in vitro* jest analiza formowania struktur pseudokapilarnych przez komórki śródbłonka wysiane na matrygel, w obecności substancji ją stymulujących. Postanowiono zbadać czy media z nad komórek B16F10-M i S będą stymulować komórki śródbłonka do tworzenia takich struktur, a jeśli tak, to czy w takim samym stopniu.

Po 18 h od dodania do hodowli komórek MBE medium z nad hodowli komórek M, stwierdzono, że substancję w nim zawartą zastymulowały komórki śródbłonka do stworzenia struktur pseudokapilarnych na matrygelu. Taki efekt nie był obserwowany w przypadku mediów z nad komórek B16F10 z niską ekspresją białka ADAM17 (**Rysunek 22A**).

Aby potwierdzić, że to aktywność białka ADAM17 w komórkach B16F10 powoduje różnicę w ilości zawartych substancji proangiogennych w mediach z nad komórek S i M, do hodowli komórek kontrolnych B16F10 dodano przeciwciała A9(B8) - hamujące jego aktywność lub przeciwciała izotypowe. Po 24 h hodowli dodawano takie media na wysiane na matrygel komórki MBE.

Stwierdzono, że media zebrane z nad komórek M hodowanych z dodatkiem przeciwciał A9(B8) nie powodowały tworzenia się pseudokapilar przez komórki MBE. Z kolei media uzyskane z nad komórek M hodowanych z przeciwciałami izotypowymi nie wpłynęły na ich zdolność do stymulacji tych komórek (**Rysunek 22B**).

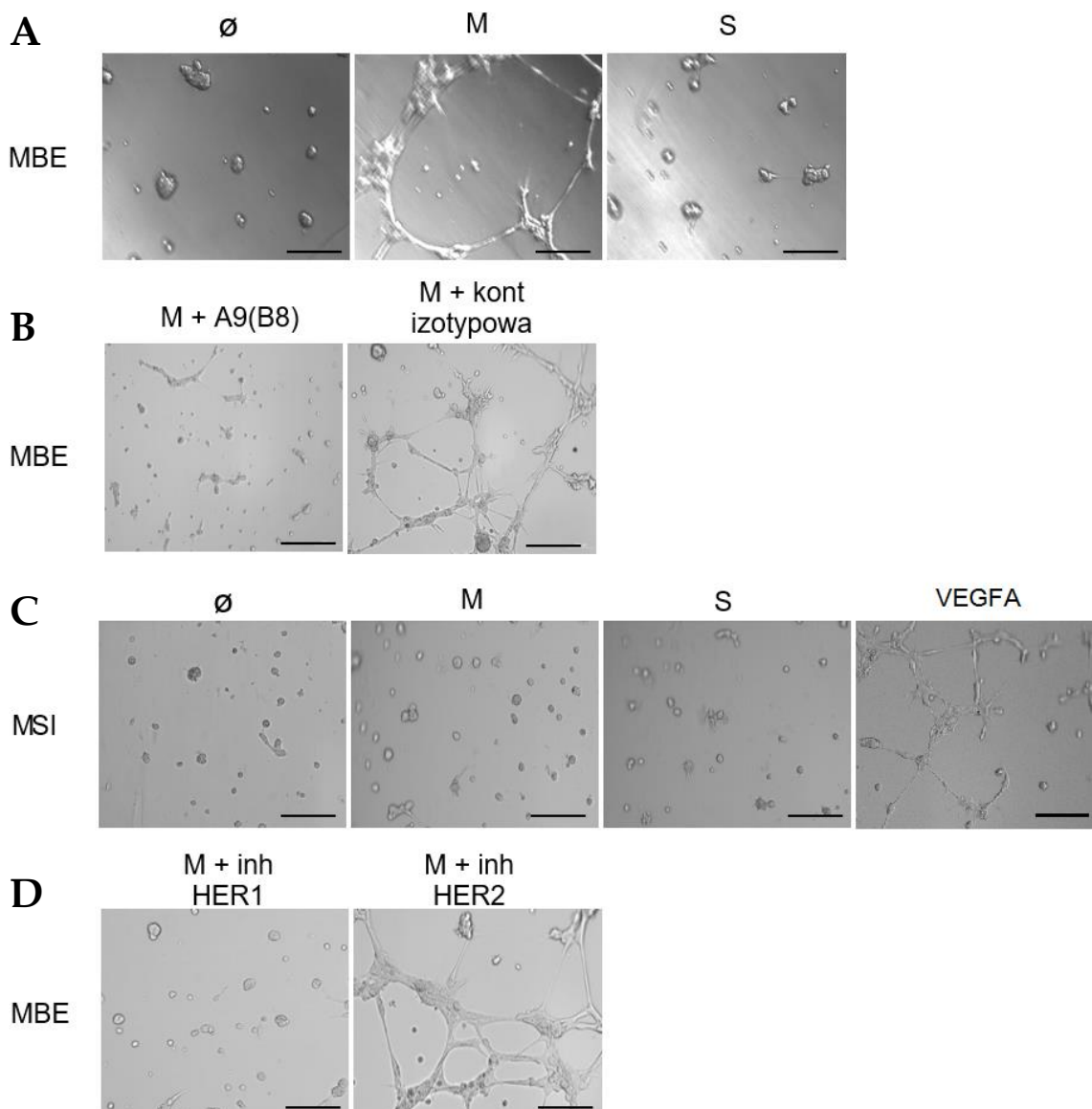
W przypadku komórek MSI, nie zaobserwowano żadnych zmian w hodowli po dodaniu do nich mediów z nad M jak i S (**Rysunek 22C**). Aby sprawdzić czy komórki te są w ogóle zdolne do tworzenia struktur pseudokapilarnych, do medium kontrolnego dodano VEGFA – bardzo silny stymulator angiogenezy. Spowodowało to powstanie kilku struktur komórkowych, wskazując, że w mediach z nad komórek B16F10 nie znajdują się odpowiednie lub nie ma wystarczająco dużo czynników proangiogennych koniecznych do wywołania omawianego procesu w komórkach MSI.

Zastanawiające było, jakie różnice pomiędzy śródbłonkiem MSI i MBE, mogą decydować o różnicy w ich wrażliwości na media z nad hodowli B16F10. Postawiono hipotezę, że MSI mogą być pozbawione receptorów czynników wzrostu z rodziny EGF. Sprawdzone więc metodą RT-PCR ekspresję receptorów z rodziny ErbB w tych komórkach. Stwierdzono, że komórki MBE mają ekspresję wszystkich czterech receptorów, natomiast MSI nie wykazują ekspresji EGFR (ErbB1) i ErbB4.

Brak receptora EGFR i ErbB4 w komórkach MSI może być odpowiedzialny za brak reakcji na czynniki wzrostu uwalniane z powierzchni komórek czerniaka przez proteazę ADAM17, czyli brak stymulacji proliferacji, migracji w teście rany i tworzenia struktur pseudokapilarnych w matrygelu.

Aby zweryfikować hipotezę, że oś sygnałowania - czynniki wzrostu z rodziny EGFR-receptory ErbB są zaangażowane w stymulację komórek MBE, przeprowadzono test tworzenia pseudokapilar przez MBE w obecności inhibitora receptora ErbB1 lub ErbB2. Do medium z nad komórek M dodano więc odpowiednie inhibitory i po 18 h wykonano zdjęcia hodowli (**Rysunek 22D**).

Zahamowanie aktywności receptora EGFR, ale nie ErbB2, zapobiegło stymulacji komórek MBE przez substancje zawarte w mediach z nad komórek B16F10 M. Potwierdza to znaczenie czynników wzrostu uwalnianych z błon komórek przez białko ADAM17, na aktywację receptora EGFR a przez to na promowanie angiogenezy. Możliwe, że na obserwowany efekt ma lub mają białka: TGF, HB-EGF i EPG - czynniki wzrostu, będącymi substratami białka ADAM17 i działającymi przez ten receptor, których ekspresję w przeciwieństwie do AREG, EREG, Neu stwierdzono w komórkach B16F10 (danych nie pokazano). Aby wyciągnąć taki wniosek konieczne by były jednak dalsze badania nad ich ilością i funkcją w subliniach B1610.



**Rysunek 22. Test tworzenia pseudokapilar w matrygelu przez komórki MBE i MSI.** Reprezentatywne zdjęcia komórek MBE rosnących na matrygelu po dodaniu (A) medium znad komórek B16F10-M, -S, lub medium kontrolnego (2% DMEM), (B) medium znad komórek B16F10-M w obecności przeciwciał kontrolnych lub hamujących aktywność ADAM17. (C) Reprezentatywne zdjęcia komórek MSI rosnących na matrygelu po dodaniu medium znad komórek B16F10-M, -S lub po stymulacji przez VEGFA (20ng/ml) jako kontrola potencjału wzrostowego komórek. (D) Reprezentatywne zdjęcia komórek MBE rosnących na matrygelu po dodaniu medium znad komórek B16F10-M w obecności inhibitorów ErbB1 (AG 1478, 2 $\mu$ M), ErbB2 (AG-825, 10 $\mu$ M). (A,B,C,D) Zdjęcia wykonane zostały 18 h po wysianiu komórek. Podziałka odpowiada 100  $\mu$ m.

Uzyskane wyniki wskazują, że poziom białka ADAM17 w komórkach nowotworowych może silnie rzutować na ich proliferację w określonych warunkach,

przeżywanie, migrację i ich wpływ na komórki śródbłonka. Postawiono pytanie, czy różnice w poziomie ekspresji białka ADAM17 będą miały wpływ na wzrost nowotworu *in vivo* i jego zdolność do przerzutowania. W tym celu wykorzystano dwa modele zwierzęce – myszy, czyli organizm, z którego pochodziły komórki nowotworowe, a także danio pręgowane.

#### **14. Wpływ białka ADAM17 na stymulację angiogenezy, migrację i przeżycie komórek B16F10 w modelu danio pręgowanego**

Badania nowotworowe wykonywane z wykorzystaniem organizmu modelowego jakim jest danio pręgowane, nie są jeszcze w Polsce rozpowszechnione. Mimo oczywistych ograniczeń takich badań, o których wspomniano we wstępie tej pracy, posiadają one wiele zalet. Umożliwiają obserwację procesów zachodzących *in vivo* w czasie rzeczywistym, już od pierwszych chwil po implantacji komórek nowotworowych.

Celem opisanych poniżej eksperymentów była obserwacja nowotworowej angiogenezy oraz zdolności do migracji i przeżycia B16F10 w nowej niszy jakim był organizm danio. Ze względu na zróżnicowaną wrażliwość embrionów danio pręgowanego na różne linie nowotworowe, badania rozpoczęto od optymalizacji ilości wstrzykiwanych im komórek. Podane do pęcherzyka żółtkowego komórki kontrolne B16F10, migrowały najpierw do obszaru wokół niego, a następnie do części przedniej embrionu. Jeśli zdolne były do przedostania się do naczyń krwionośnych, przemieszczały się z krwią do części ogonowej. Wstrzyknięcie małej ilości komórek (<50) skutkowało zanikiem lub zbyt powolnym rozwijaniem się nowotworu (zgodnie z dyrektywą 86/609/EEC eksperymenty na embrionach rybich można przeprowadzać do 7 dnia od zapłodnienia), zbyt duża liczba (>200) powodowała śmierć wszystkich embrionów w 5 dniu eksperymentu. Wyniki optymalizacji zebrano w

**Tabela 55.** Ostatecznie zdecydowano się podawać około 150 komórek do każdego embrionu.

**Tabela 5. Optymalizacja liczby komórek nowotworowych B16F10 wstrzykiwanych do embrionu.**

<i>Liczba komórek</i>	<i>Angiogeneza nowotworowa</i>	<i>Przemieszczanie się komórek poza pęcherzyk żółtkowy</i>	<i>Przemieszczanie się komórek do części przedniej</i>	<i>Przemieszczanie się komórek do części ogonowej</i>
50	nie	tak	nie	nie
100	20%	tak	tak	rzadko
150	40%	tak	tak	tak
200	55%	†	†	†

† – powyżej 80% martwych embrionów. Każda liczba komórek została podana 20 embrionom.

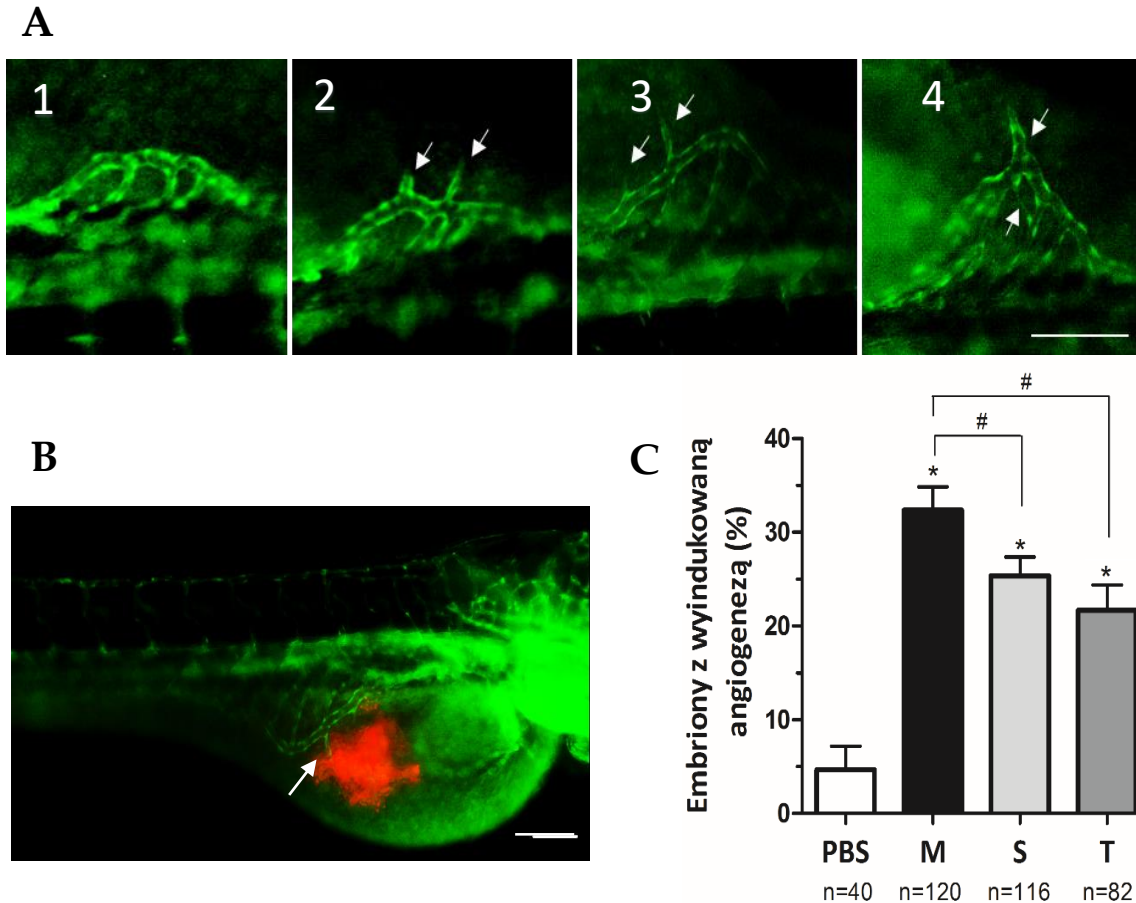
Wiele czynników wzrostu i cytokin posiada różną strukturę w organizmach ludzkich, mysich i rybich. Przez to np. nie wykazują zdolności do oddziaływania z receptorami dla ortologu z innego gatunku albo oddziałują z receptorami z niższym powinowactwem. Mimo to w licznych pracach zaobserwowano wpływ komórek nowotworowych ssaków na danio pręgowane [111], [166]–[169]. Ten fakt wykorzystuje się np. w badaniach nad angiogenezą

Aby zbadać czy wyciszenie ekspresji ADAM17 w komórkach B16F10 wpływa na angiogenezę w modelu danio pręgowane analizowano rozwój żyły SIV po wstrzyknięciu komórek nowotworowych do przestrzeni okołożółtkowej embrionów. Białka uwalniane przez komórki nowotworowe potencjalnie mogłyby stymulować komórki śródbłonna naczyń krwionośnych do migracji i proliferacji. Do badań wykorzystano szczep danio, w którym naczynia krwionośne wykazywały fluorescencję EGFP. Komórki nowotworowe natomiast przed iniekcją barwiono fluorescencyjnie, aby po ich nastrzyknięciu móc ocenić ich ilość w danym embrionie i ich umiejscowienie poprzez obserwację pod mikroskopem fluorescencyjnym. W doświadczeniu, obok komórek w których ekspresja ADAM17 była wyciszona przez lentiwirusy kodujące shRNA (komórki S) i komórek kontrolnych (M) zastosowano też klon B16F10, w którym ekspresję ADAM17 wyłączono metodą TALEN (T). Ze względu na ograniczoną ilość typów komórek, które mogły zostać wykorzystane do eksperymentu, nie testowano kontroli dedykowanej komórkom T, uznając że w innych testach komórki K i TK nie różniły się swoimi właściwościami. Aby

sprawdzić czy sama iniekcja wpływa na nieprawidłowości w rozwoju żył SIV do embrionów wstrzykiwano także jedynie bufor PBS.

Angiogeneza wywołana u embrionów, na skutek jej stymulacji poprzez wydzielane przez komórki nowotworowe białka, nie była silna. Ograniczała się do powstawanie pojedynczych nowych naczyń skierowanych najczęściej w kierunku nowotworu (**Rysunek 23A i B**). Po wstrzyknięciu komórek M zmiany w obrębie żyły SIV u embrionów występowały u  $32,3 \pm 2,5\%$  embrionów. W przypadku podania komórek S i T nieprawidłowości takie obserwowane były odpowiednio u  $25,3 \pm 3,5\%$  i  $21,7 \pm 4,7\%$  embrionów. Naturalnie występujące zaburzenia w budowie SIV lub te wywołane samym procesem iniekcji zaobserwowano u  $4,7 \pm 2,4\%$  embrionów (**Rysunek 23C**).

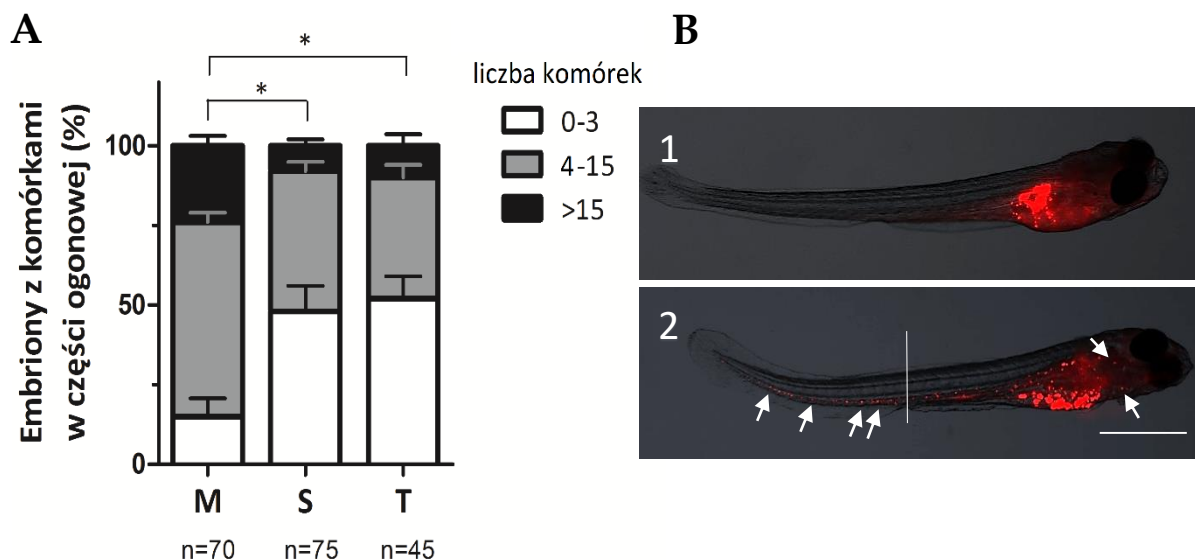
Nie jest pewne, które białka komórek B16F10 wpływają na angiogenezę u danio pręgowanego. Jako, że mysz VEGFA, różni się od tego czynnika u ryb i w badaniach praktycznie nie wpływał na rozwój ich naczyń krwionośnych (D. Britto, B. Wyroba et al. - Macrophages drive angiogenesis in an embryonic zebrafish tumour xenograft – manuskrypt w przygotowaniu) raczej to nie to białko odpowiedzialne jest za obserwowany wynik. FGF, który zgodnie z badaniami literaturowymi bardzo silnie stymuluje angiogenezę u ryb [166], nie jest produkowany przez badane przez nas komórki (danych nie pokazano). Niektóre prace pokazują wpływ na ten proces IL-8 (i jej mysiego odpowiednika CXCL-1). [169] Zaobserwowano różnice pomiędzy komórkami M i S w poziomie CXCL1 wydzielanego do medium (danych nie pokazano) co mogłoby tłumaczyć obserwowane w eksperymencie różnice. Konieczne byłyby jednak dalsze eksperymenty, aby móc wyciągnąć wnioski, że to właśnie ta cytokina wpływa na obserwowaną różnicę w indukcji angiogenezy w badanym modelu.



**Rysunek 23. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 w komórkach B16F10 na stymulację angiogenezy w modelu danio pręgowanego. (A i B) Wpływ sublinii B16F10 - M na angiogenezę w embrionach danio. Do pęcherzyka żółtkowego podano PBS lub 150 komórek nowotworowych. (A) Zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego wykonane 48 godzin po iniekcji PBS (zdjęcie 1, prawidłowo rozwinięta żyła SIV) lub komórek B16F10- M (zdjęcia 2, 3, 4, nieprawidłowy rozwój, wyindukowana angiogeneza). Białymi strzałkami oznaczono nowo powstające naczynia krwionośne. Podziałka odpowiada 100  $\mu$ m. (B) Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego złożony ze zdjęć wykonanych w świetle zielonym i niebieskim. Strzałka wskazuje naczynie krwionośne (zielone) kiełkujące w stronę komórek nowotworowych (czerwone) (C) Aktywność pro-angiogenna sublinii B16F10 M, S i T, wyrażona jako procent embrionów, w których dwa dni po iniekcji zaobserwowano wyindukowanie angiogenezy. Kontrolnym embrionom podano PBS. Litera n pod wykresami oznacza liczbę analizowanych embrionów z łącznie 4 (dla M i S) i 3 (dla T) niezależnych eksperymentów. \* $P < 0.01$  vs PBS, # $P < 0.05$  vs M.**

Kolejnym eksperymentem było sprawdzenie, czy komórki B16F10 są zdolne do migracji z miejsca iniekcji, przedostania się do krwioobiegu i przeżycia w nowej niszy. Proces ten wymaga od komórek podobnych właściwości jak w przypadku zdolności do przerzutowania u ssaków. W tym celu komórki nowotworowe różnych sublinii

B16F10 barwiono fluorescencyjnie, a następnie wstrzyknięto (ok. 150 komórek) do przestrzeni okołozółtkowej embrionów. 5 dni po iniekcji komórek liczone ich ilość w ogonowej części embrionu.



**Rysunek 24. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na zdolność komórek B16F10 do migracji do naczynia krwionośnego w modelu danio pręgowanego. (A)** Potencjał migracyjny sublinii B16F10 M, S i T wyrażony jako procent embrionów, u których 5 dni po infekcji można było zaobserwować odpowiednio 0-3, 4-15 lub powyżej 15 komórek w części ogonowej.  $\chi^2 < 0,0001$  vs M. Litera n oznacza liczbę analizowanych embrionów z łącznie 4 (dla M i S) i 3 (dla T) niezależnych eksperymentów. **(B)** Zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego wykonane 5 dni po iniekcji komórek nowotworowych do pęcherzyka żółtkowego (złożono zdjęcia wykonane w świetle białym i niebieskim) embrionu bez (1) lub z komórkami nowotworowymi poza pęcherzykiem żółtkowym (2). Białe strzałki wskazują na przykładowe komórki. W analizie eksperymentu przyjęto, że części ogonową i przednią rozdziela biała linia. Podziałka odpowiada 500  $\mu\text{m}$ .

Wśród embrionów, którym podano komórki M,  $15 \pm 5,8\%$  miało od 0 do 3 komórek w tym obszarze,  $61 \pm 3\%$  miało od 4 do 15 komórek, a  $24 \pm 3,2\%$  ponad 15 komórek. Po podaniu S lub T liczba komórek nowotworowych w ogonowej części embrionu była znacząco niższa – ok 50% embrionów miało tam od 0-3 komórek, ok 40% 4-15 a tylko ok 10% powyżej 15 komórek (**Rysunek 24A**). Wyniki te świadczą o ograniczonej zdolności komórek z niskim poziomem białka ADAM17 do migracji w tkankach lub o ich ograniczonym przeżyciu w krwioobiegu.

Badania *in vitro*, jak i *in vivo* w modelu danio przegowane dostarczyły informacji na temat wpływu białka ADA17 na proliferację, migrację czy na zdolność wpływania na te procesy w komórkach śródbłonna przez komórki B16F10. W rozwoju i przerzutowaniu nowotworów jednak bardzo duże znaczenie odgrywają różne komórki układu immunologicznego, które mogą zarówno hamować te procesy jak i je wspomagać. Aby więc móc potwierdzić znaczenie białka ADAM17 na wzrost nowotworu z komórek B16F10 i na jego metastazę, konieczne było zbadanie tych procesów *in vivo* w modelu mysim.

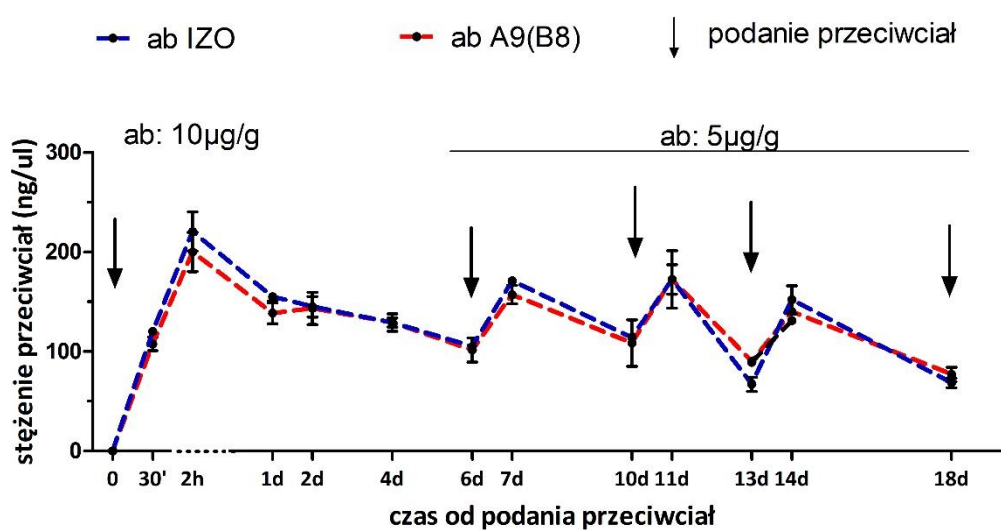
Do badań wykorzystano komórki z wyciszoną różnymi metodami ekspresją białka ADAM17: poprzez transdukcję lentiwirusową shRNA (komórki S), systemem TALEN (komórki T) i CRISPi (komórki C) oraz komórki kontrole, odpowiednio M, TK i CK. Dodatkowo, zdecydowano się sprawdzić czy zahamowanie aktywności białka ADAM17 nie tylko w guzie, ale także w jego otoczeniu może hamować rozwój nowotworu i jego przerzutowanie. Stało się to możliwe dzięki współpracy z Prof. Murphy, której zespół stworzył specyficzne dla mysiego białka przeciwciała anti-ADAM17, które podawano myszom z rosnącym nowotworem (z komórek B16F10 typu dzikiego – WT). Wyniki tych badań były istotne aby ocenić czy hamowanie aktywności ADAM17 u pacjentów z czerniakiem mogłoby mieć charakter terapeutyczny.

## 15. Poziom przeciwciał hamujących aktywność białka ADAM17 w surowicy i w tkankach myszy

Wykorzystane w badaniach przeciwciała A9(B8) zostały stworzone poprzez umieszczenie części zmiennej przeciwciała (scFV) rozpoznającej białko ADAM17 (zarówno ludzkie jak i mysie) w zrębie ludzkiego przeciwciała klasy IgG2. Jako kontrolę wpływu podawania myszom przeciwciał tego typu, zdecydowano się zastosować więc ludzkie przeciwciała IgG2 (dalej nazywane kontrolą izotypową IZO).

Aby ocenić jak długo po ich podaniu przeciwciała utrzymują się w organizmie myszy, zbadano, metodą ELISA, stężenie przeciwciał w surowicy krwi, 30 min po ich podaniu dootrzewnowym (10  $\mu\text{g/g}$  masy ciała), a także po 2, 24, 48, 96 i 144 h. W metodzie tej wykorzystano fakt, że przeciwciała posiadały fragment ludzkiego IgG2, co pozwalało rozróżnić to białko spośród wszystkich innych - mysich.

Stężenia przeciwciał kontrolnych i przeciwciał anti-ADAM17 w czasie od ich podania myszom były niemal identyczne. Ich najwyższe stężenie obserwowano po ok. 2 h po podaniu (nieco  $<200$   $\text{ng}/\mu\text{l}$ ), które w ciągu doby spadało do poziomu 150  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , a następnie obniżało się powoli osiągając wartość 100  $\text{ng}/\text{ml}$  po 6 dniach. Aby



Rysunek 25. Schemat podawania przeciwciał myszom oraz kinetyka zmian ich stężenia w surowicy

utrzymać stężenie przeciwciał w granicach 100-150 ng/ $\mu$ l, zdecydowano się podawać myszom połowę pierwotnej dawki w 6, 10, 13 dniu eksperymentu (**Rysunek 25**).

Istotne było sprawdzenie, czy i czy w dużej ilości przeciwciała lokalizują się w guzach nowotworowych, gdzie ich działanie byłoby najbardziej wskazane, a także gdzie jeszcze w organizmie będą się znajdowały. Badania pokazują, że podane myszy przeciwciała monoklonalne, oprócz krwi, często gromadzą się w śledzionie, ze względu, że komórki jej naczyń włosowatych nie przylegają do siebie ściśle i są przepuszczalne dla białek z surowicy krwi, co nie ma miejsca w przypadku innych narządów [170]. Dlatego też, metodą ELISA zbadano poziom przeciwciał izotypowych oraz anty ADAM17 w lizatach: ze śledziony, wątroby, a także we fragmentach guzów myszy, pobranych po zakończeniu eksperymentu.

Obecność przeciwciał stwierdzono zarówno w tkankach jak i guzie, chociaż w wątrobie były to niewielkie ilości (ok 1,5 ng/ $\mu$ g białka uzyskanego z tkanki). Zgodnie z przewidywaniami, dużo więcej przeciwciał znajdowało się w śledzionie. Stwierdzone, nieduże różnice w stężeniach przeciwciał kontrolnych i hamujących aktywność ADAM17 w tym organie, odpowiednio ok 5,2 i 8,7 ng/ $\mu$ g białka uzyskanego z tkanki, mogą wynikać z faktu, że znajduje się w nim dużo komórek, które mają wysoką ekspresję białka ADAM17 (limfocytów i makrofagów), a więc do których przeciwciała anty-ADAM17 mogły się przyłączyć. Obecność przeciwciał stwierdzono także w guzach myszy, którym je podawano. Bardzo zróżnicowane wyniki stężenia przeciwciał w nowotworach mogą wynikać z faktu, że do eksperymentu i lizy pobierano tylko ich niewielki fragment – mógł być on np. blisko lub daleko od naczynia krwionośnego lub zawierać różne proporcje rozmaitych populacji komórek (komórki nowotworowe, komórki immunologiczne, fibroblasty, komórki żywe vs. nekrotyczne) czy nawet różne proporcje białek komórkowych i białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Poziom przeciwciał w tkance nowotworowej nie przekroczył jednak kilkunastu ng na  $\mu$ g białka. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 6**.

**Tabela 6. Analiza stężenia podawanych dootrzewnowo przeciwciał w tkankach myszy**

<i>Przeciwciało</i>	<i>Wątroba</i>	<i>Śledziona</i>	<i>Guz</i>
<i>Ab A9(B8)</i>	1,5 ± 1,2*	8,7 ± 3,7*	3,1 – 11**
<i>Kontrola izotypowa</i>	1,6 ± 1,3*	5,2 ± 2,5*	1,1 - 12,5**

\* Stężenie podane w ng na µg białka danej tkanki. Przedstawiono wartości średnich arytmetycznych ± SD z danych od 8 myszy z dwóch niezależnych eksperymentów. \*\*zakres stężeń przeciwciał (ng/µg białka) oznaczony we fragmentach tkanki pochodzących z 8 guzów.

## 15. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na wzrost i przerzutowanie komórek B16F10 w modelu mysim

Na rozwój nowotworu, oprócz właściwości samych jego komórek, bardzo silnie wpływa jego otoczenie. Są to m.in. komórki układu immunologicznego, które mogą zarówno hamować jak i promować jego wzrost, ale także komórki naczyń krwionośnych czy fibroblasty. Dlatego tak istotne jest badanie rozwoju komórek nowotworowych w miejscu czy w narządzie, z którego wywodzi się dana linia komórkowa tak aby odtworzyć warunki jakie panują przy samoistnym powstaniu takiego guza [105]. Czerniak – jako typ nowotworu skóry – podawany jest myszy najczęściej śródskórnice.

Ze względu na potwierdzony w badaniach *in vitro* i *in vivo* wpływ białka ADAM17 na proliferację różnych typów komórek nowotworowych [43], [53], [54], [171], [172], a także jego postulowany wpływ na oddziaływanie niektórych komórek immunologicznych z nowotworem [31], [51], [173], zdecydowano sprawdzić czy zahamowanie jego ekspresji lub aktywności zahamuje rozwój guza z komórek B16F10.

W tym celu, komórki podawano ortotopowo w okolicę grzbietu myszy i monitorowano wzrost guza, za pomocą elektronicznej suwmiarki, dwa razy w tygodniu przez 3 tygodnie. Części myszy podawano przeciwciała anti-ADAM17 lub izotypowe zgodnie z opisanym protokołem, pierwszą dawkę dozując 3 dni po wstrzyknięciu komórek nowotworowych typu dzikiego. Narządy i guza pobierano

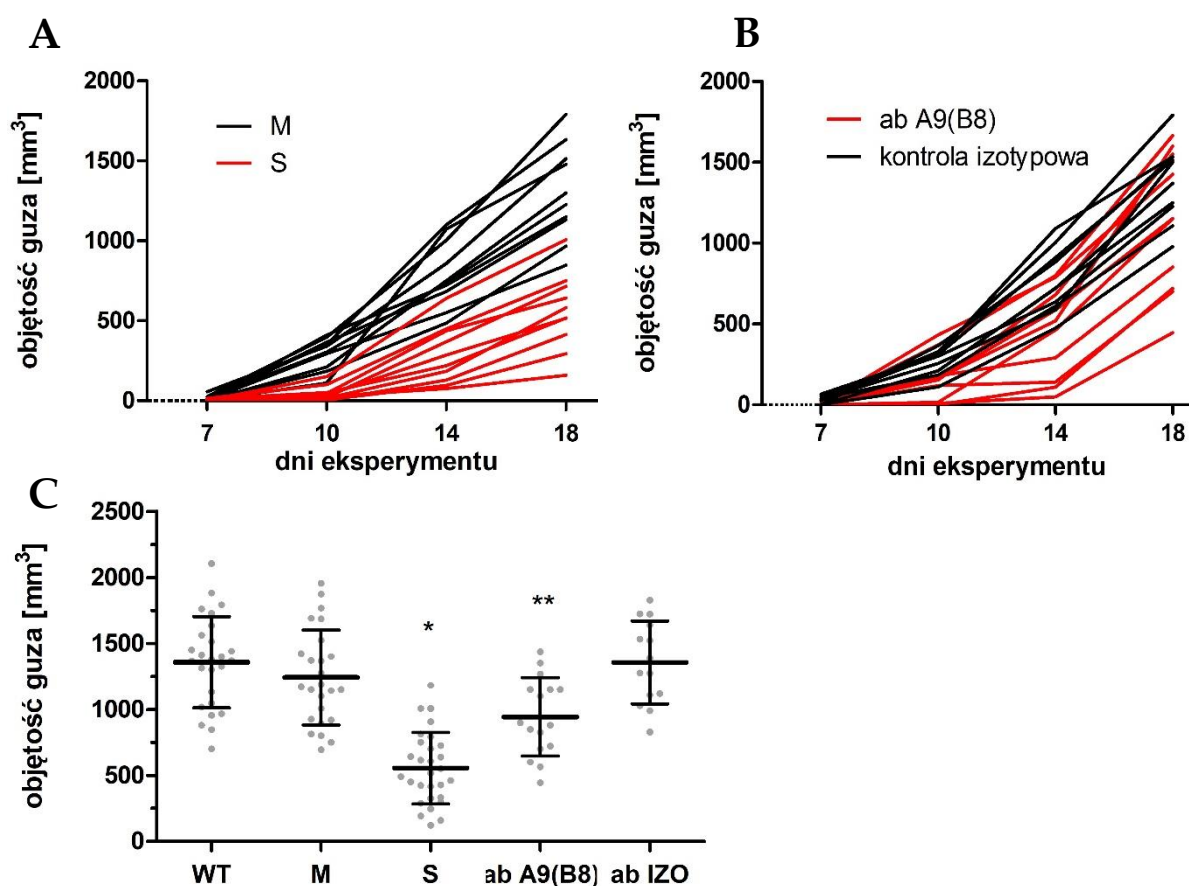
jedynie od zwierząt, które przeżyły do ostatniego dnia eksperymentu. Śmiertelność myszy była, na przestrzeni wszystkich eksperymentów, porównywalna we wszystkich grupach badawczych.

Guzy stawały się wyczuwalne pod koniec pierwszego/ na początku drugiego tygodnia od iniekcji. Te powstałe z komórek S, na koniec eksperymentu były wyraźnie mniejsze od guzów z komórek kontrolnych czy typu dzikiego (**Rysunek 26C**). Wydaje się, że tempo wzrostu nowotworów było porównywalne we wszystkich subliniach, jednak komórki z niskim poziomem białka ADAM17 rozpoczynały wzrost z kilkudniowym opóźnieniem (**Rysunek 26A**). Nieco inaczej wyglądała sytuacja, kiedy myszom z guzem z komórek typu dzikiego podawano przeciwciała hamujące aktywność ADAM17. U części zwierząt w ogóle nie zaobserwowano wpływu tych przeciwciał na wzrost nowotworów. U niektórych jednak wzrost guza został zahamowany do ok. 14 dnia eksperymentu, po czym następował jego bardzo szybki wzrost (**Rysunek 26B**).

Trzeba wspomnieć, że w wynikach nie uwzględniono rezultatów z jednego eksperymentu, dotyczących grupy myszy, którym podawano przeciwciała izotypowe. Guzy w ogóle nie pojawiły się lub były one bardzo niewielkie. Uznano, że była to wina niewystarczająco oczyszczonych przeciwciał (niewystarczająca dializa w celu pozbycia się zawartego w kupionym preparacie azydku sodu). Kolejne partie przeciwciał izotypowych nie wpływały na wzrost guzów co potwierdzono w trzech niezależnych eksperymentach.

Uzyskane wyniki świadczą, że białko ADAM17 może wpływać na rozwój nowotworów z komórek B16F10 w modelu mysim. Opóźnienie w rozpoczęciu proliferacji komórek S (co widoczne jest na rysunku 26A) jest zgodne z wynikami uzyskanymi w badaniach *in vitro*. Może wynikać to np. z dłuższego przystosowania się ich do nowego środowiska. Komórki, po osiągnięciu odpowiedniej gęstości, nie różniły się już tempem wzrostu. W przypadku zahamowania wzrostu guzów poprzez podawanie myszom przeciwciał hamujących aktywność białka ADAM17, nie wyjaśniono, czemu efekt był widoczny tylko u części zwierząt i tylko przez określony

czas. Możliwe, że ilość przeciwciał w guzie i jego okolicy nie była wystarczająca aby zahamować aktywność tego białka na wszystkich komórkach, lub oddziaływanie przeciwciał z komórkami nowotworu było niestabilne w warunkach *in vivo*. Biorąc pod uwagę, że nawet u tych myszy, u których początkowo rozwój guza został zahamowany, po pewnym czasie następował jego szybki wzrost wydaje się, że hamowanie aktywności białka ADAM17 przez wiązanie się do niego przeciwciał nie jest wystarczające aby powstrzymać rozwój guza.



**Rysunek 26. Wzrost guzów sublinii B16F10 po podaniu ortotopowym u myszy.** Wykresy wzrostu guzów WT, M i S **(A)** oraz guzów WT u myszy którym podawano dootrzewnowo przeciwciała izotypowe lub hamujące aktywność ADAM17 – A9(B8) **(B)**. Dla czytelności wykresu przedstawiono 10 przykładowych krzywych dla każdego przypadku, a krzywe oznaczono ciągłymi liniami. **(C)** Wykres przedstawiający średnią i odchylenie standardowe objętości guza w 18 dniu eksperymentu. Kropki przedstawiają pojedyncze myszy. WT n=24, M n=25, S n=29, abA9(B8) n=16, kontrola izotypowa n=15, dane pochodzą z pięciu niezależnych eksperymentów w przypadku komórek WT, M i S i z trzech w przypadku podawania myszom przeciwciał. \*P<0,001 vs M, \*P<0,001 vs kontrola izotypowa. Objętość guza liczono według wzoru  $V=(\text{szerokość guza}^2 \times \text{długość guza})/2$  [249].

Z badań *in vitro* wynikało także, że ADAM wpływa nie tylko na proliferację, ale także na migrację komórek B16F10. Na tej podstawie postawiono hipotezę, że ADAM17 pełni funkcję w przerzutowaniu nowotworów. Aby ją zweryfikować po zakończeniu eksperymentów od myszy pobierano narządy – węzły chłonne, płuca, wątrobę i śledzionę. Tkanki poddano działaniu kolagenazy w celu strawienia tkanki łącznej i uwolnieniu komórek, które wysiewano na płytki. Przez kolejne 3 tygodnie obserwowano czy w hodowlach pojawią się klony komórek B16F10. Sposób ten nie był jednak wystarczająco dokładny ani wiarygodny, gdyż w części próbek w ogóle nie udawało się uzyskać hodowli komórkowej – nawet komórek danego narządu. Dlatego też analizę obecności potencjalnych przerzutów zdecydowano przeprowadzać w inny sposób. Sprawdzano, czy cDNA przepisany z RNA wyizolowanego z węzłów lub płuc, zawiera sekwencję kodującą tyrozinazę, enzym szlaku syntezy melaniny charakterystyczny dla komórek czerniaka. Stosując tę metodę stwierdzono, że niski poziom białka ADAM17 wpływa na ograniczenie przerzutów do węzłów chłonnych, jednak w badanym przedziale czasowym nie wpływa na przerzuty do płuc (**Tabela 7**). Wyniki ilości obserwowanych przerzutów u myszy, którym podano komórki T lub C zamieszczono w suplemencie (**Tabela 3 sup**) Jako kontrolę ich wzrostu u myszy uznano komórki WT.

**Tabela 7. Analiza przerzutowania komórek sublinii B16F10 i wpływu przeciwciał anti-ADAM17 ten proces.**

<i>nowotwór/ przeciwciało</i>	<i>hodowla – najbliższy węzeł*</i>	<i>lizat – węzły – mRNA**</i>	<i>lizat – płuca – mRNA**</i>
WT	63% (5/8)***	83% (10/12)	29% (4/14)
M	56% (5/9)	75% (9/12)	27% (4/15)
S	33% (3/9)	55% (6/11)	20% (3/15)
WT/Ab A9(B8)	-	61% (8/13)	27% (4/15)
WT/kontrola izotypowa	-	71% (5/7)	30% (3/10)

\*na podstawie obecności klonów czerniaka w hodowli komórek węzła, \*\*na podstawie obecności mRNA tyrozinazy w tkance, \*\*\* procent myszy u których stwierdzono przerzuty, w nawiasie podano liczbę myszy, u których stwierdzono przerzuty w stosunku do liczby analizowanych zwierząt.

Z wyników badań *in vitro* wynikało także, że białko ADAM17 może wpływać na zdolność komórek do przeżycia w nowej niszy i podjęcia w niej proliferacji. Jest to bardzo istotna cecha w kontekście potencjału komórek do tworzenia przerzutów. Dlatego zdecydowano się zweryfikować tę teorię w modelu *in vivo*. Powszechnie używanym modelem do badaniach takich predyspozycji komórek jest podanie ich myszy dożylnie (do żyły ogonowej). Komórki nowotworowe wraz z krwią docierają do płuc i tam więzną w naczynkach i zaczyna proliferować [174]. Po określonym czasie od podania myszom komórek, w płucach widoczne są ich kolonie, gdzie przeważnie 1 kolonia powstaje z 1 „uwięzionej” komórki. O badanej cesze świadczy zarówno ilość jak i wielkość kolonii.

Kiedy podano myszom do żyły ogonowej komórki B16F10 kontrolne (M) lub z niską ekspresją ADAM17 (S), po 3 tygodniach widoczna była znacząca różnica w obrazie płuc. W przypadku podania komórek M, kolonie w płucach były znacznie większe i liczniejsze niż przy podaniu komórek S (**Rysunek 27 A i B**). Czarny kolor kolonii wynika z obecności w komórkach melaniny. W przypadku podaniu dożylnie myszy komórek T, kolonii w płucach było jeszcze mniej (**Rysunek 3 sup**).



**Rysunek 27. Wzrost guzów sublinii B16F10 u myszy.** Model zasiedlania nowej niszy. Myszom podawano komórki M lub S ( $5 \times 10^5$ ) do żyły ogonowej. Po trzech tygodniach pobierano płuca i liczono kolonie komórek nowotworowych. **(A)** Przedstawiono fotografie reprezentatywnych płuc (po 3 z każdej grupy) oraz **(B)** wykres wartości średnich arytmetycznych  $\pm$  SD liczby kolonii w płucach. Analizowano 13 płuc w 3 niezależnych eksperymentach). \* $P < 0,01$  vs M.

Otrzymane wyniki potwierdzają obserwacje *in vitro* dotyczące ograniczenia zdolności komórek z niską ekspresją białka ADAM17 do podjęcia proliferacji w nowej niszy. Cecha ta może mieć bardzo duże znaczenie w obserwowanych różnicach w przerzutowaniu komórek B16F10 M i S.

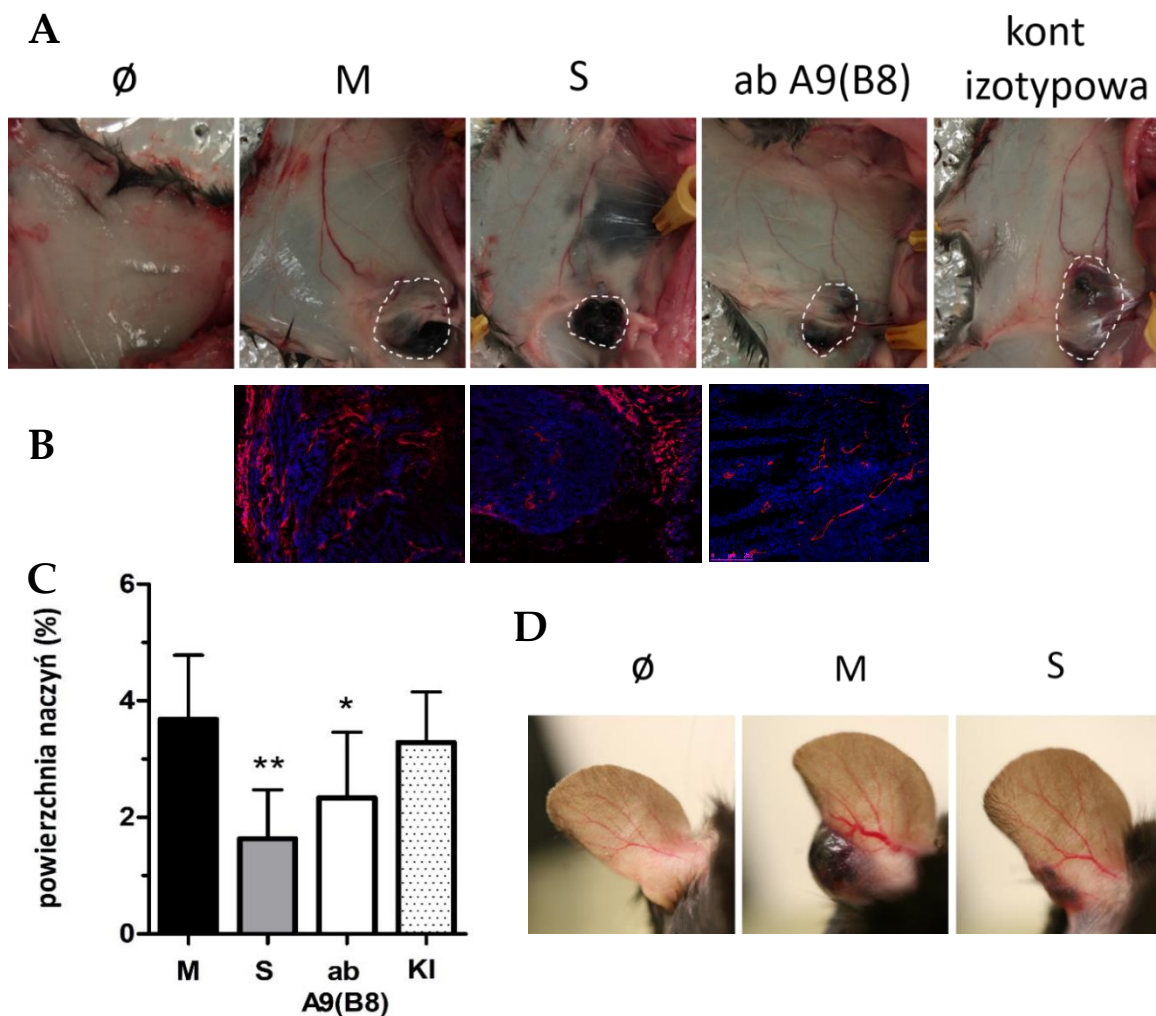
## **16. Wpływ białka ADAM17 na nowotworową angiogenezę w modelu mysim**

Na metastazę bardzo duży wpływ, oprócz właściwości samych komórek nowotworowych, ma także dostępność naczyń krwionośnych i limfatycznych. Jako, że stwierdzono wpływ białek uwalnianych z komórek B16F10 na komórki śródbłonna (**punkt 13 wyników**) postawiono hipotezę, że zahamowanie białka ADAM17 w tych komórkach ograniczy towarzyszącą wzrostowi guza angiogenezę.

Kiedy myszom podawano komórki ortotopowo, podczas izolacji nowotworów obserwowano w okolicy guza bardzo wyraźne naczynia krwionośne. W przypadku podania komórek z niską ekspresją białka ADAM17 lub zastosowania przeciwciał hamujących jego aktywność, średnica poszczególnych naczyń i sieć naczynek krwionośnych zdawała się być dużo mniejsza. Obserwacje dotyczyły jednak tylko okolic guza i miały charakter jakościowy a nie ilościowy. Aby porównać ilość naczyń w obrębie nowotworu, jego fragmenty (z otaczającą je skórą) mrożono w O.T.C, a następnie przygotowywano skrawki i wykrywano na nich metodą immunochemiczną sygnał od przeciwciał rozpoznających antygeny charakterystyczne dla komórek śródbłonna krwionośnych (CD31), a także dla naczyń limfatycznych (LYVE1). Analiza ilości naczyń w danym guzie była możliwa dzięki porównaniu na zdjęciach skrawków powierzchni zajmowanej przez naczynia i samego guza.

Analiza wykazała, że w guzach z komórek S w porównaniu do komórek M znajdowało się istotnie statystycznie mniej naczyń krwionośnych. Zajmowały one ok 1,8 % powierzchni guza, kiedy w guzach z komórek kontrolnych było to ok 3,7 %

(Rysunek 28C). Ilość naczyń krwionośnych wydawała się być jednak zależna od wielkości guza. Stwierdzono natomiast, że przeciwciała hamujące aktywność białka ADAM17 wpłynęły na ograniczenie angiogenezy, także w tych nowotworach, które wielkością odpowiadały guzom z komórek kontrolnych. Może to wskazywać, że przeciwciała te działały nie tylko na komórki nowotworowe ale także na komórki śródbłonna naczyń krwionośnych np. hamując ich migrację lub proliferację lub na komórki otaczające guza np. ograniczając wydzielanie lub złuszczenie z nich czynników o działaniu proangiogennym.



**Rysunek 28. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 w komórkach B16F10 oraz wpływ przeciwciał anti-ADAM17 na angiogenezę.** Mysiom podano komórki WT, M lub S. Część myszy, którym podano komórki WT otrzymywały również przeciwciała anti-ADAM17 – A9(B8), lub izotypowe – KI. Mysiom kontrolnym (∅) podano objętość PBS równą objętości zawiesiny komórek nowotworowych. *ciąg dalszy opisu na następnej stronie*

(A) Zdjęcia naczyń krwionośnych w otoczeniu guzów B16F10 M lub S podanych ortotopowo w prawą stronę grzbietu (w dzień zakończenia eksperymentu) (B) Analiza immunohistochemiczna. Zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego skrawków guzów B16F10 M lub S barwionych przeciwciałem anti-CD31 (kolor czerwony) oraz wybarwionych barwnikiem DAPI jąder komórkowych (kolor niebieski). (C) Powierzchnia zajmowana przez naczynia krwionośne w obrębie skrawków guzów (B16F10 M, S, WT+anty-ADAM17, WT+kontrola izotypowa) wyznaczona na podstawie barwienia immunohistochemicznego. Jako 100% przyjęto analizowaną powierzchnie skrawka. Wyniki to wartości średnich arytmetycznych  $\pm$  SD uzyskane w wyniku analizy 6 preparatów dla każdej grupy doświadczalnej (po 2 guzy z trzech niezależnych eksperymentów). W każdym preparacie analizowano dwa przypadkowe niezachodzące na siebie pola widzenia. \* $P < 0,05$  vs kontrola izotypowa, \*\* $P < 0,001$  vs M. (D) Zdjęcia naczyń krwionośnych w otoczeniu guzów B16F10 M lub S podanych ortotopowo do płątka ucha (18 dzień od podania komórek).

Aby móc lepiej obserwować proces angiogenezy komórki nowotworowe podawano myszy także do płątka jej ucha. Ze względu na brak w tym miejscu futerka, a także bardzo cienką skórę, naczynia były szczególnie widoczne. Ze względów technicznych, nie udało się niestety przeprowadzić analizy ilościowej dla tych wyników. Na zdjęciach widać jednak wyraźnie, że w przypadku komórek kontrolnych guzy nie tylko były większe, ale otaczające go naczynia krwionośne miały większą średnicę, a także więcej odgałęzień (**Rysunek 28D**).

W guzach, starano się także sprawdzić, czy zależnie od poziomu białka ADAM17, występować będzie różnica w ilości naczyń limfatycznych w i wokół niego. Nieoczekiwanie okazało się, że wykorzystywane komórki B16F10 podane myszy, w okresie trwania eksperymentu, nie stymulowały limfangiogenezy na poziomie, który pozwoliłby to zanalizować ilościowo. Naczynia limfatyczne były widoczne tylko na pojedynczych skrawkach w bardzo niewielkiej liczbie, przeważnie na granicy ze guza ze skórą (zdjęć nie pokazano). Próba analizy ilościowej takich wyników mogła prowadzić do błędnych wniosków ze względu na występowanie naczyń limfatycznych tylko w pojedynczych próbkach – dlatego jej zaniechano.

## 17. Wpływ wyciszenia poziomu białka ADAM17 w guzie i jego otoczeniu na odpowiedź immunologiczną u myszy

Wzrost guzów zależny jest nie tylko od właściwości samych komórek nowotworowych, ale także od tego co dzieje się w jego otoczeniu. W wielu badaniach wykazano np., że podwyższony poziom komórek infiltrujących guza (TILs) jest związany z lepszymi prognozami dla pacjentów [175], [176]. Jednak to nie ilość, a rodzaj komórek immunologicznych determinuje to czy będą one hamować rozwój nowotworu, czy promować jego wzrost [177].

Postawiono hipotezę, że wyciszenie ekspresji białka ADAM17 na komórkach guza i/lub w jego otoczeniu może mieć wpływ na miejscową regulację odpowiedzi immunologicznej, a także, na napływające do nowotworu populacje komórek immunologicznych.

W pierwszej kolejności sprawdzano, czy wzrost guza, z komórek kontrolnych lub z wyciszoną ekspresją białka ADAM17, a także zastosowanie przeciwciał hamujących jego aktywność, będzie wywoływać u myszy różnicę w ogólnej stymulacji układu odpornościowego. W tym celu w dzień przed zakończeniem eksperymentu pobierano krew z ogonów myszy i poddawano analizie w analizatorze krwi. Porównywano ogólną liczbę leukocytów (WBC), a także procentową w ilość limfocytów, granulocytów i monocytów.

Wyniki morfologii myszy z wszystkich grup badawczych były porównywalne i nie zależały od poziomu białka ADAM17 w komórkach nowotworowych ani od podanych przeciwciał izotypowych lub A9(B8). Pośród analizowanych populacji komórek immunologicznych procentowo najwięcej było limfocytów, następnie granulocytów i monocytów (**Tabela 8**).

**Tabela 8. Analiza ilości różnych typów leukocytów we krwi myszy pobranej z ogona, po 17 dniach od podania im komórek nowotworowych**

<i>Komórki immunologiczne</i>	<i>M</i>	<i>S</i>	<i>A9(B8)</i>	<i>IZO</i>
<i>WBC (<math>\times 10^6/ml</math>)</i>	15,7 $\pm$ 4,2	17,2 $\pm$ 5,1	14,8 $\pm$ 4,6	16,6 $\pm$ 7,3
<i>Granulocyty (%)</i>	33,3 $\pm$ 9,2	26,7 $\pm$ 11,1	30,5 $\pm$ 8,7	23,2 $\pm$ 7,8
<i>Limfocyty (%)</i>	62,5 $\pm$ 11,3	68,9 $\pm$ 8,3	64,6 $\pm$ 7,5	73,2 $\pm$ 9,1
<i>Monocyty (%)</i>	4,2 $\pm$ 1,5	4,4 $\pm$ 1,2	4,9 $\pm$ 3,3	4,6 $\pm$ 2,3

Przedstawiono wartości średnich arytmetycznych  $\pm$  SD z danych pochodzących z trzech niezależnych eksperymentów od łącznie 16 myszy w przypadku grup gdzie podawano komórki M lub S i 12 myszy z grupy w których oprócz komórek WT podawano myszom przeciwciała A9(B8) lub IZO.

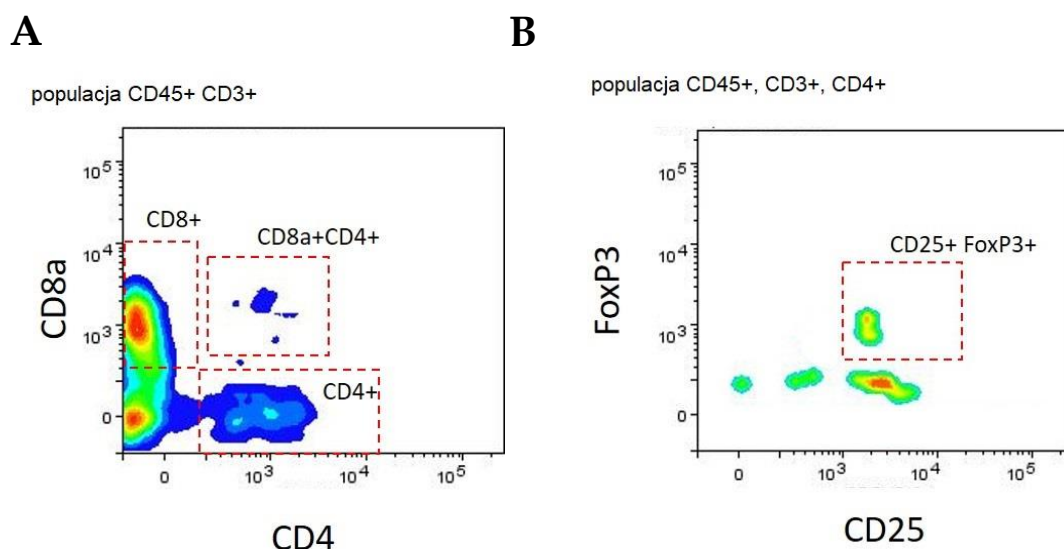
Lepszy obraz tego, jak białko ADAM17 wpływa na komórki immunologiczne była ich analiza w samym guzie. Skupiono się na profilu limfocytów T. Uzyskaną poprzez trawienie guza mieszaninę komórek B16F10 oraz immunologicznych, barwiono przeciwciałami skierowanymi przeciw specyficznym antygenom. Podczas analizy, limfocyty charakteryzowano jako komórki na których występowała ekspresja CD45 oraz CD3. Wśród tej populacji rozróżniano limfocyty pomocnicze (CD4+) cytotoksyczne (CD8+) [178], regulatorowe (CD4+, CD25+, FoxP3+) [177] oraz komórki na których występowała równoczesna ekspresja CD4 i CD8 – DP (*double positive*) (**Rysunek A i B**).

Limfocyty T cytotoksyczne mają zdolność wywoływania apoptozy, poprzez wydzielanie cytotoksycznych granul po związaniu się do specyficznych antygenów na powierzchni komórek nowotworowych. Limfocyty pomocnicze, zależnie od podtypu wydzielają różne cytokiny, co prowadzi do stymulowani odpowiedzi humoralnej (limfocytów B) lub komórkowej (limfocyty cytotoksyczne, NK, makrofagi) Limfocyty regulatorowe odpowiedzialne są natomiast za tłumienie zbyt nasilonej odpowiedzi immunologicznej, a w nowotworach często sprzyjają jego rozwojowi [179]. Pochodzenie i rola w nowotworach komórek DP nie zostały jeszcze wyjaśnione. Wydaje się, że mogą pełnić w nowotworach funkcję zarówno cytotoksyczną jak

i supresorową. Ich występowanie stwierdzono u pacjentów z melanomą, nowotworem piersi i jelita grubego [178].

Mimo obserwowanych różnic we wzroście guzów z komórek z różną ekspresją białka ADAM17 oraz u części nowotworów, u myszy którym podano przeciwciała A9(B8), nie wykazano istotnych różnic w populacjach limfocytów napływających do guza (Tabela 9). Pośród limfocytów, największą populację w guzach z komórek B16F10, stanowią limfocyty cytotoksyczne, mniejszą pomocnicze, natomiast limfocyty regulatorowe stanowiły bardzo niewielki procent (poniżej 1%).

Zgodnie z otrzymanymi wynikami, wydaje się, że poziom białka ADAM17 w komórkach nowotworowych, a także w jego otoczeniu, nie wpływa na napływające do guza populację komórek immunologicznych, a przez to na wzrost guza i jego przerzutowanie. Jest jednak możliwe, że to nie sama obecność komórek immunologicznych, a ich aktywacja może mieć znaczenie w tym procesie.



**Rysunek 29 Analiza cytometryczna typów limfocytów T w guzach myszy.** Wykresy przedstawiają sposób bramkowania danych populacji na reprezentatywnej próbce z guza z komórek M. **(A)** Rozróżnienie limfocytów na cytotoksyczne (CD8+) i regulatorowe (CD4+). **(B)** Bramkowanie limfocytów regulatorowych CD45+, CD3, CD4+, CD25+, FoxP3+

**Tabela 9. Analiza ilości różnych typów limfocytów w nowotworach myszy.**

<i>Limfocyty (%)</i>	<i>M</i>	<i>S</i>	<i>A9(B8)</i>	<i>IZO</i>
<i>cytotoksyczne</i>	52,2 ± 18,3	47,0 ± 22,1	61,4 ± 15,2	54,6 ± 11,9
<i>pomocnicze</i>	18,4 ± 8,9	21,8 ± 10,2	16,2 ± 5,3	28,6 ± 12,4
<i>regulatorowe</i>	0,4 ± 0,3	0,5 ± 0,4	0,7 ± 0,5	0,3 ± 0,3
<i>DP</i>	5,1 ± 2,8	7,3 ± 5,6	6,3 ± 4,4	4,8 ± 3,7

Przedstawiono wartości średnich arytmetycznych ± SD z danych pochodzących z trzech niezależnych eksperymentów od łącznie 16 myszy w przypadku grup gdzie podawano komórki M lub S i 12 myszy z grupy w których oprócz komórek WT podawano myszom przeciwciała A9(B8) lub IZO. DP – limfocyty CD4+ oraz CD8+.

## DYSKUSJA

### **Badanie wpływu wyciszenia białka ADAM17 – modele komórkowe**

Jedną z powszechnie wykorzystywanych metod badania funkcji białek jest tworzenie linii komórkowych z nadekspresją lub z wyciszoną ekspresją danego białka i ocena wynikających z tego zmian fenotypowych w komórkach. Aby uzyskać stały biologiczny efekt, najczęściej do genomu komórki wprowadzany jest odpowiednio zaprojektowany transgen. Obserwowane następnie zmiany w funkcjonowaniu czy morfologii komórek mogą wynikać jednak z innej przyczyny niż zmiana poziomu danego białka. Transgen może zostać wbudowany w dowolne miejsce w genomie np. w obrębie sekwencji kodującej innego genu lub jego regiony regulatorowe, spowodować zmianę jego metylacji czy nawet delecję fragmentów DNA, a przez to wpływać na daną komórkę. Co więcej, wprowadzenie zaprojektowanej sekwencji do komórek może powodować zahamowanie działania innych białek [180].

Wynika z tego potrzeba prowadzenia badań na wielu modelach komórkowych, lub potwierdzanie obserwowanych efektów przy pomocy innych metod modyfikacji aktywności białek, takich jak np. inhibitory/stymulatory ich aktywności, lub szlaków sygnałowych, w których odgrywają kluczową rolę. W opisywanych w powyższej pracy eksperymentach, starano się potwierdzać specyficzność działania białka ADAM17 na proliferację, migrację, inwazyjność i inne cechy komórek LEC i B16F10.

Powszechnie używana i akceptowana metoda transdukcji lentiwirusowej, jako metoda wprowadzania transgenu do genomu komórek niesie niebezpieczeństwo wystąpienia „off-targetów” czyli wspomnianej zmiany ekspresji innego białka niż planowano, a także wzbudzenia odpowiedzi interferonowej [134], [135].

W przypadku komórek LEC (sublinia L1) była to jednak jedyna możliwa metoda wyciszenia ekspresji białka ADAM17. Komórki te potrzebują do wzrostu stosunkowo dużej gęstości hodowli oraz mają niską wydajność transfekcji wykonywanej metodami chemicznymi lub fizycznymi. Z tego powodu, nie wykorzystano innych metod np.

TALEN lub CRISPRi. Choć pozwalają one na uzyskanie komórek z nokautem wybranego białka, zamiast jedynie wyciszenia jego ekspresji, jednym z ich etapów pośrednich jest wzrost klonalny komórek. Aby mieć pewność, że zastosowana sekwencja shRNA była specyficzna, a obserwowane cechy komórek LEC po transdukcji lentiwirusowej wynikają wyłącznie z wyciszenia w nich ekspresji białka ADAM17, stworzono dodatkową sublinię komórek LEC – L2. Wyciszenie ekspresji badanego enzymu uzyskano w niej poprzez transdukcję komórek LEC dwoma innymi sekwencjami shRNA. Poziom białka w tych komórkach utrzymywał się w okolicach 50-60% w porównaniu do kontroli, kiedy w komórkach L1 wynosił ok. 80%. W części eksperymentów zaobserwowano gradację wpływu białka ADAM17 zależnie od jego poziomu na: migrację komórek, poziom w lizatach i mediach białek HB-EGF i TGF $\alpha$ . Z kolei w innych, niewielkie zahamowanie aktywności ADAM17 nie było wystarczające do zaobserwowania jakiegokolwiek efektu, lub co najwyżej do zaistnienia pewnych tendencji (różnice w adhezji komórkowej, zmiany poziomu łańcuchów integrzyn na błonie).

Na linii komórkowej B16F10, oprócz wykorzystywanego modelu lentiwirusowego, badania prowadzono także na komórkach z nokautem ADAM17, uzyskanych metodą TALEN oraz na populacji komórek transfekowanych plazmidami CRISPR. Najsilniejszy efekt zahamowania ekspresji ADAM17 na badane cechy, obserwowano przeważnie w przypadku komórek z nokautem tego białka uzyskanego metodą TALEN (komórki T). Ze względu na fakt, że jest to klon komórkowy, nie można jednak wykluczyć, że obserwowane efekty wynikały nie tylko z braku w nich ekspresji białka ADAM17, ale także np. z dodatkowych mutacji. Bardzo silnie wyciszenie białka ADAM17 metodą lentiwirusową, w większości przypadków powodowało efekt zbliżony do komórek T (migracja komórek, wzrost guza u myszy po podaniu ortotopowym) lub pośredni pomiędzy nimi a kontrolą (wzrost pojedynczych komórek, wzrost w płucach myszy po ich podaniu dożylnym). Nie jest to zaskakujący wynik, jako że można podejrzewać, że nawet niewielka aktywność ADAM17 może wpływać na uwalnianie z błony niektórych czynników wzrostu czy innych białek

i wpływać przez to na różne procesy w komórkach. Badania *in vitro* prowadzone na modelu stworzonym metodą CRISPR pokrywały się z tymi otrzymanymi w przypadku modeli lentiwirusowego i uzyskanych metodą TALEN. W przypadku badań *in vivo* wzrost nowotworów był jednak zauważalnie szybszy niż we wspomnianych modelach, a metastaza komórek pozostawała na podobnym poziomie jak u myszy z guzami kontrolnymi.

Porównując stworzone modele komórkowe, w których wyciszono ekspresję białka ADAM17, z tymi opisywanymi w literaturze, zarówno zastosowane metody jak i poziom wyciszenia badanego enzymu wydaje się być porównywalny.

W większości przypadków szedząc tę badano w ludzkich komórkach nowotworowych m.in.: płuc A549 [29], wątroby [181] piersi [30], [182], jajników [183], ale jej ekspresję wyciszano także w komórkach prawidłowych np. w linii monocytarnej (THP-1) i izolowanych z krwi ludzkich limfocytach [184], szczurzych komórkach mięśni gładkich naczyń [185], ludzkich komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych [186] i limfatycznych [137] czy embrionalnych nerki – HEK293T [187]. Najczęściej wykorzystywanymi metodami wyciszenia ekspresji białka ADAM17 w komórkach było: wprowadzanie do nich specyficznego shRNA poprzez transdukcję lentiwirusową [29], [181], [184], [188] lub transfekcję plazmidem [4], [30], ale część badań przeprowadzanych było na komórkach, które transfekowano siRNA, przez co efekt zahamowania aktywności białka ADAM17 miał charakter przejściowy np. [183], [185]. Uzyskiwany przez inne zespoły badawcze poziom wyciszenia ekspresji białka był przeważnie stosunkowo wysoki i sięgał nawet do 80-90% [29], [137], [185] chociaż wykazano, że nawet 40% obniżenie ekspresji tego białka ma efekt biologiczny jak np. zahamowanie wzrostu komórek MCF-7 *in vitro* i *in vivo* u myszy po podaniu śródskórnym [182]. Całkowite zahamowanie ekspresji białka ADAM17 uzyskano w komórkach HEK293T dzięki metodzie TALEN. W badaniach tych wykorzystywano dwa uzyskane w ten sposób klony i nie obserwowano po między nimi rozbieżności w wynikach eksperymentów [187].

## Wpływ białka ADAM17 na wzrost i przerzutowanie nowotworów

ADAM17 może wpływać na proliferację komórek poprzez działanie na niektóre swoje substraty, przede wszystkim czynniki wzrostu m.in. TNF, TGF $\alpha$ , AREG, HB-EGF, EREG [34], [189]–[192]. W nowotworach, gdzie jego ekspresja jest często podwyższona, można się więc spodziewać przyspieszenia podziałów komórkowych. Takie obserwacje otrzymano m.in. w badaniach *in vitro* na liniach z nadekspresją ADAM17: komórkach nowotworu piersi MCF-7 [37] czy komórkach raka prostaty PC-3 i DU145 [53]. Z kolei w komórkach: raka piersi MDA-MB-435 [37], MDA-MB-231 [30], T4-2 [190] i MCF-7 [28], wątroby - SMMC-7721 [171], płuc – NSCLC [29] i glejaka - U87 [54], wyciszenie ekspresji ADAM17 powodowało zahamowanie podziałów komórkowych i ograniczenie inwazyjności. W niektórych badaniach jednak, zmiana ekspresji ADAM17 nie wpływała w ogóle na proliferację komórek nowotworowych [4], [44]. Jako mechanizm tłumaczący wpływ białka ADAM17 na wzrost komórek nowotworowych, a w niektórych przypadkach także ich inwazyjność i tempo migracji wskazywana jest najczęściej aktywacja osi sygnałowej EGFR/PI3K/Akt przez substraty białka ADAM17: TNF [37], [192], TGF $\alpha$  [54], [190], AREG [190]–[192]. Wykazano także, że w komórkach nowotworowych piersi występuje korelacja między poziomem białka ADAM17 a ekspresją urokinazowego aktywatora plazminogenu (uPa) – prawdopodobnie poprzez jego aktywację poprzez uwalnianie z błony substraty ADAM17 – AREG i TNF [37], [193]. UPa, poprzez przekształcanie plazminogenu w plazminę, wpływa na trawienie macierzy zewnątrzkomórkowej, co ułatwia migrację komórek nowotworowych, a przez wiązanie się do swojego receptora może stymulować także adhezję, migrację i proliferację komórek [194]. Białko uPa może również aktywować receptor EGFR i przez to stymulować te procesy [193]. AREG może też indukować aktywność receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR) a przez to ich transaktywację receptora EGFR [195].

Podczas badań opisanych w niniejszej pracy nie zaobserwowano wpływu ADAM17 na proliferację komórek LEC, niezależnie od warunków ich hodowli. Początkowo, nie stwierdzono także różnic w proliferacji między komórkami o różnym poziomie ekspresji ADA17 w subliniach B16F10. Eksperymenty te prowadzono jednak w stosunkowo dużej gęstości hodowli, co mogło wpłynąć na obserwowany efekt. Kiedy komórki wysiano tak, aby obserwować wzrost klonalny, zarówno w warunkach zależnych (zaadherowane do płytki), jak i niezależnych od podłoża (zawieszane w agarze), brak lub niski poziom ekspresji ADAM17 powodował ograniczoną proliferację i prawdopodobnie także niższą przeżywalność komórek. W obu przypadkach obserwowano mniej klonów komórek S i ich mniejszą powierzchnię - zawierały mniejszą liczbę komórek (**Rysunek 19**). Podobny wynik uzyskała grupa, która do hodowli różnych typów komórek ludzkiego raka piersi dodała przeciwciało monoklonalne hamujące aktywność ADAM17 [59]. W przypadku linii HCC1937, zarówno liczba kolonii, jak i ich powierzchnia po 7 dniach hodowli była mniejsza, w porównaniu do komórek hodowanych z przeciwciałem kontrolnym. W innej linii, HCC1143, zahamowanie aktywności ADAM17 zmniejszyło jedynie powierzchnię kolonii - spowolniło wzrost komórek, przy prawdopodobnym braku wpływu na ich przeżywalność. Jako powód zahamowania wzrostu komórek sugerowano ograniczenie uwalniania z komórek białka  $TGF\alpha$ , a przez to obniżony poziom aktywacji receptora EGFR [59].

W przypadku komórek B16F10 za obserwowany efekt musi odpowiadać jednak inny mechanizm niż stymulacja osi sygnałowania wynikająca z aktywacji receptora EGFR przez czynniki wzrostu, gdyż w analizie RT-PCR nie stwierdzono jego ekspresji w tych komórkach. Dodatkowo, przeprowadzone eksperymenty dotyczące proliferacji sublinii B16F10 wskazują, że to nie substancje wydzielane do medium za sprawą ADAM17 wpływają na różnicę wzrostu w komórkach kontrolnych lub z niską ekspresją tego białka. Określenie tego mechanizmu wymaga jednak dalszych badań.

Białko ADAM17 może wpływać na komórki nowotworowe w inny sposób niż przez aktywację receptora EGFR przez swoje substraty, co udowodniono także w innych badaniach. W jednym z nich myszom atymicznym podano komórki Colo205, nieposiadające ekspresji tego receptora, a następnie podawano przeciwciała monoklonalne, hamujące aktywność białka ADAM17 lub receptora EGFR. U pierwszej grupy zaobserwowano silne spowolnienie wzrostu guza w porównaniu do myszy kontrolnych, natomiast w drugiej, podane przeciwciała nie miały znaczenia dla wzrostu guzów. Sposób, w jaki białko ADAM17 wpływa na wzrost tych komórek nowotworowych nie został do tej pory wyjaśniony, jednak autorzy pracy, jako możliwy mechanizm, sugerują jego wpływ na jego prawdopodobny substrat - białko PTPRS [196]. Pełni ono rolę supresorową w przypadku nowotworów jelita [197], a jego niski poziom na błonie komórek nowotworowych OE21 znacząco wzrastał po zahamowaniu w nich aktywności sekretazy ADAM17 [196].

Innym proponowanym mechanizmem, w jaki ADAM17 może wpływać na rozwój nowotworów w sposób niezależny od EGFR, jest jego rola jako szedazy dla białek, których uwalnianie z błony komórkowej może pośrednio stymulować w komórkach nowotworowych utrzymanie ich fenotypu komórek macierzystych (tzw. nowotworowe komórki macierzyste - CSC). Mimo, że istnienie takiej populacji w guzach litych nie jest udowodnione, to w badaniach wskazuje się, że to właśnie niezróżnicowane, samoodnawiające się komórki CSC są odpowiedzialne za inwazyjny charakter nowotworu i jego przerzutowanie [9]. Substratami białka ADAM17, które mogłyby odgrywać rolę w tym mechanizmie są np. Jagged-1, Jagged-2, DLL1 i FZD6 [196]. Wykazano m.in., że uwolnione przez szedazę ADAM17 z komórek śródbłonna lub nowotworu białko Jagged-1 stymuluje aktywność Notch, co z kolei bezpośrednio wpływa na utrzymanie fenotypu CSC przez komórki nowotworowe jelita grubego [198] czy glejaka wielopostaciowego [170].

Podwyższona ekspresja ADAM17, wpływa silnie nie tylko na proliferację, ale również na migrację komórek. Badania wskazują, że dzieje się to, podobnie jak

w przypadku stymulacji ich wzrostu, poprzez aktywację receptorów ErbB przez substraty ADAM17: TGF $\alpha$  [30], [199], AREG [191], HB-EGF [186], NRG [4].

Stymulacja komórek MBE mediami z nad hodowli kontrolnych komórek czerniaka, przyspieszała ich wzrost i migrację w porównaniu do tych, do których dodawano media z nad hodowli komórek S. Sugeruje to, że badane sublinie różnią się ilością uwalnianych czynników wzrostu, a przez to aktywacją receptorów ErbB. Hipotezę tę potwierdza również eksperyment, w którym tworzenie się pseudokapilar na matrigelu przez komórki MBE po stymulacji mediami z nad komórek kontrolnych, zostało zahamowane przez dodanie inhibitora aktywności EGFR (**Rysunek 22D**).

W przeprowadzonych eksperymentach, zahamowanie aktywności ADAM17 wpłynęło także na ograniczenie ruchliwości komórek B16F10. Dodanie do hodowli komórek z niską ekspresją ADAM17 mediów z nad komórek kontrolnych, nie przyspieszało szybkości ich migracji. Wskazuje to na inny niż stymulacja receptorów ErbB mechanizm, poprzez jaki ADAM17 wpływa na migrację tych komórek.

Jako cząsteczki adhezyjne wpływające na ruch komórek i adhezję do macierzy zewnątrzkomórkowej wymienia się m.in. integryny [200]. ADAM17, poprzez swoją domenę dezintegrynową może oddziaływać z niektórymi z nich. W doświadczeniach *in vitro* pokazano, że białko ADAM17 może promować adhezję komórek poprzez oddziaływanie z integryną  $\alpha 5\beta 1$  na sąsiednich komórkach – oddziaływanie trans, zaś w komórkach HeLa z nadekspresją tej integryny występuje ich kolokalizacja wskazując na możliwe oddziaływanie cis (na tej samej komórce) [10]. Dodatkowo wykazano, że ADAM17 wpływa na zwiększoną migrację i inwazyjność komórek HCC (nowotworu wątroby) poprzez aktywację sygnałowania poprzez integrynę  $\beta 1$ . Ma to miejsce prawdopodobnie dzięki uwalnianiu z błony białka Notch-1, co aktywuje przekaz sygnału zależny od tego białka [201]. Oprócz wpływu na adhezję i migrację komórek, oddziaływanie ADAM17 z integrynami może wpływać na inne procesy w komórkach. Udowodniono np., że oddziaływanie tego białka z integryną  $\alpha 5\beta 1$  może hamować jego aktywność jako szedazy. Przy wyciszonej ekspresji  $\alpha 5\beta 1$

w komórkach mezangialnych, stymulowane przez aktywację receptora serotoninowego 1D białko ADAM17 silnie uwalniało z błony HB-EGF. Nadekspresja integryny  $\alpha 5\beta 1$  całkowicie hamowała wspomniany proces. W testach bezkomórkowych pokazano dodatkowo, że aktywność białka ADAM17 jest zależna wprost proporcjonalnie od ilości integryny  $\alpha 5\beta 1$ , a nawet samego łańcucha  $\beta 1$  [9]. Wykazano również, że ADAM17 może oddziaływać z integryną  $\alpha 6\beta 1$  na tej samej komórce. Wiązanie to silnie stymulowało ADAM17 do uwalniania z błony czynników wzrostu: HB-EGF oraz TGF $\alpha$ . Postuluje się, że proces ten ma szczególne znaczenie w prawidłowym rozwoju płuc [202]. Nie wiadomo jednak czy funkcja białka ADAM17 jako dezintegryny odgrywa jakąkolwiek rolę w migracji komórek B16F10.

Substratami białka ADAM17 jest wiele cząstek adhezyjnych, których nadekspresja często obserwowana jest w nowotworach: m.in. ALCAM [203], CD44 [204], I-CAM [205], JAM-A[206]. Aktywność badanej szedazy mogłaby więc wpływać na ilość tych białek na błonie komórek, a przez to na oddziaływanie z podłożem lub sąsiednimi komórkami i ich zdolność do migracji [1], [180]. W przypadku komórek B16F10 pokazano, że z spośród substratów ADAM17, mogących wpływać na migrację komórek, posiadają one ekspresję m.in: E-kadheryny [207], NCAM[208], PECAM[209] i CD44 [210]. Nie sprawdzono jednak, czy na wykorzystywanych w naszych eksperymentach komórkach również zachodzi ekspresja tych cząsteczek adhezyjnych, ani czy ich poziom na błonie komórkowej skorelowany jest z aktywnością białka ADAM17.

Wpływ ADAM17 na nowotwory zaobserwowano także *in vivo*. W powyższej pracy prowadzono badania na dwóch modelach zwierzęcych, podając komórki B16F10 w różny sposób. Eksperymenty wykonane na embrionach danio przegowanego, pozwoliły na wyciągnięcie ciekawych wniosków. Co więcej, uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z tymi otrzymanymi podczas badań na modelach mysich. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że komórki B16F10 mają zdolność do migracji z miejsca iniekcji, najpierw do okolic aorty embrionu, a następnie w obszar

główny, a także z krwioobiegami do części środkowej i ogonowej. Przeżycie komórek nowotworowych w krwioobiegu i ich dotarcie do odległej części organizmu, uznano za wyznacznik zdolności przerzutowania i przeżycia w nowej niszy. Komórki bez lub z niską ekspresją ADAM17, w porównaniu do komórek kontrolnych, migrowały do krwioobiegu rzadziej i/lub wolniej, co wskazuje na ich mniejszy potencjał do przerzutowania.

Do tej pory nie badano roli ADAM17 w kontekście rozwoju nowotworów w modelu dano pręgowanego. Jednak w badaniach nad komórkami guza wątroby Bel-7402, zastosowanie inhibitora angiogenezy – batimastatu, który działa na metaloproteinazy, w tym ADAM17, widocznie zahamowało rozwój nowotworu w tym modelu [211].

Potwierdzenie wpływu białka ADAM17 na zdolność komórek do inwazji i zwiększenia potencjału metastatycznego uzyskano także, podając komórki B16F10 – kontrolne lub z obniżoną ekspresją ADAM17, do żyły ogonowej myszy. Jest to znany sposób na ocenę zdolności do osiedlania się komórek nowotworowych, szczególnie jako modelu tworzenia wtórnych ognisk nowotworu. Komórki podane dożylnie muszą przeżyć w krwioobiegu, dotrzeć do odległego organu i tam rozpocząć proliferację [212]. Jest to podobna droga, jaką muszą pokonać przerzutujące komórki nowotworowe. Według innej teorii, komórki podane dożylnie więzną w drobnych żyłach płucnych i tam rozpoczynają wzrost [174]. Nie mniej jednak, model ten pozwala na porównanie zdolności do zasiedlania i wzrostu nowotworów w nowej niszy, a także jest szczególnie przydatny w badaniach nad skutecznością terapii antynowotworowych [213]. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki w tym modelu eksperymentalnym pokrywają się z tymi otrzymanymi *in vitro* w teście wzrostu pojedynczych komórek. Brak aktywności ADAM17 nie tylko ograniczył liczbę kolonii w płucach, ale też wpływał na ich wielkość. Może to świadczyć, że zahamowanie aktywności białka ADAM17 w komórkach nowotworowych może ograniczyć ich zdolność do tworzenia przerzutów np. poprzez ograniczenie ich przeżycia poza guzem pierwotnym.

Badanie przerzutowania w powyższych modelach opierało się na pewnych charakterystycznych cechach komórek nowotworowych, takich jak zdolność do adhezji, migracji czy proliferacji. Aby jednak uzyskać pełny obraz wpływu białka ADAM17 na wzrost guza i jego przerzutowanie, konieczne było podanie komórek ortotopowo. Pozwala to na uzyskanie warunków zbliżonych do tych, w jakich rozwija się zwykle nowotwór, a także na obserwowanie wpływu układu immunologicznego na ten proces. Komórki B16F10 z różną ekspresją ADAM17 podawane były więc śródskórnym w dole grzbietu lub do płątka ucha myszy. Pozwoliło to na obserwację procesów wzrostu, angiogenezy i przerzutowania czerniaka. Wszystkie te procesy zostały spowolnione w przypadku podania komórek z niską ekspresją białka ADAM17. Dużo mniejszą różnicę we wzroście zaobserwowano jednak w przypadku komórek C (stworzonych metodą CRISPR). Można to wytłumaczyć faktem, że w populacji komórek C1 pozostawały również te z wysoką ekspresją białka ADAM17 i jego aktywność na ich powierzchni była wystarczająca do zachodzenia pewnych procesów. Istotne jest, że komórki C1 wyizolowane z guza, jako populacja wciąż posiadały niski poziom ADAM17 (danych nie pokazano). Sugeruje to, że nie doszło do selekcji komórek - a więc te z wyższym poziomem ADAM17 nie zaczęły rozwijać się szybciej. Mogły stworzyć jednak odpowiednie środowisko do rozwoju nowotworu. Dlatego też ten wynik nie przekreśla hipotezy, zgodnie z którą brak aktywności ADAM17 wpływa na opóźnienie zagnieżdżania się komórek nowotworowych w nowej niszy lub rozpoczęcia przez nich proliferacji.

Wpływ ekspresji ADAM17 na rozwój nowotworów *in vivo* był już badany, szczególnie u myszy atymicznych, którym podawano ludzkie komórki nowotworowe z zahamowaną ekspresją białka ADAM17 [28], [29], [54], [182]. Pokazane w tych pracach krzywe wzrostu nowotworów wskazują, że brak aktywności ADAM17 w komórkach, w porównaniu do komórek kontrolnych, spowalniał ich wzrost przez cały czas trwania eksperymentu. Nieco inaczej zależność ta wyglądała w naszych doświadczeniach. U myszy, którym podano komórki z niską ekspresją białka ADAM17, obserwowano opóźnione o kilka dni pojawienie się wyczuwalnego guza,

w porównaniu do myszy którym podano komórki kontrolne. Jednak od chwili jego pojawienia się, tempo wzrostu guzów wywodzących się z obu sublinii było porównywalne. Wskazuje to na istotną rolę białka ADAM17 w implantacji komórek B16F10 i rozpoczęcia przez nich wzrostu w nowej niszy raczej niż ich bezpośredni wpływ na tempo proliferacji.

Z eksperymentów wykonywanych na myszach atymicznych, którym podano komórki z zahamowaną ekspresją białka ADAM17 nie można wyciągać wniosków dotyczących wpływu układu immunologicznego na rozwój nowotworu. Dlatego też w opisywanych w tej pracy badaniach starano się określić, czy poziom ekspresji ADAM17 wpływa na ilość i rodzaj komórek immunologicznych napływających do guza.

Większość komórek infiltrujących guz to limfocyty T: pomocnicze CD4+, cytotoksyczne CD8+ i regulatorowe CD4+ FoxP3, ale znajdują się tam także limfocyty B, komórki NK i makrofagi. Liczebność, wzajemny stosunek ilości populacji danego typu może i ich lokalizacja może wpływać na rokowania pacjenta [176], [214], [215]. W nowotworach piersi stwierdzono np., że większa ilość TIL, a w szczególności komórek NK koreluje z bardziej zaawansowanym stadium jego rozwoju i związany jest z gorszymi prognozami przeżycia [216].

W niniejszej pracy określono poziom głównych typów limfocytów T, jednak nie stwierdzono różnic w ich procentowej ilości pomiędzy badanymi grupami – w guzach z komórek M i S, a także w przypadku guzów uzyskanych od myszy, którym podawano przeciwciała hamujące aktywność ADAM17 lub kontrolne.

ADAM17 może uwalniać z błony komórek nowotworowych ligandy ważne dla aktywacji limfocytów T cytotoksycznych takich jak ULBP2 [217] i MICA [218], których ekspresję stwierdza się w komórkach czerniaka. Możliwe więc, że jego ekspresja wpływa nie na ich ilość, ale na ograniczenie aktywności cytotoksycznej.

W toku badań zaobserwowano różnicę w melanogenezie w komórkach B16F10, zależnie od ich poziomu białka ADAM17. Szczególnie widoczne było to przy wzroście pojedynczych komórek *in vitro* i *in vivo* (model płucny). Komórki kontrolne szybko stawały się ciemne od melaniny, w przeciwieństwie do komórek bez lub z niską ekspresją ADAM17, gdzie była ona widoczna tylko w pojedynczych komórkach i pojawiała się znacznie wolniej. W literaturze pokazany został wpływ inhibitora ADAM17 na to zjawisko, na przykładzie pierwotnych komórek keratynocytów – NHEM. Prawdopodobnie wynika to z wpływu ADAM17 na białko PMEL17 (gp100). Ta glikoproteina odpowiedzialna jest za tworzenie w melanosomach macierzy - „włókienkowego rusztowania”, na którym może gromadzić się melanina. Brak aktywności ADAM17 pośrednio powoduje zaburzenie funkcji tego białka poprzez wpływ na jego C-kończącą domenę, a przez to na budowę owego rusztowania [219]. Ta obserwacja może mieć istotne znaczenie w kontekście wykorzystania inhibitorów ADAM17 w leczeniu czerniaka. Wykazano, że silniejsze upigmentowanie komórek jest obserwowane u pacjentów z gorszymi prognozami, w zaawansowanych stadiach nowotworu [220]. Dodatkowo, duża zawartość melaniny w komórkach uniemożliwia zastosowanie takich terapii jak radioterapia i zmniejsza skuteczność chemioterapii i terapii fotodynamicznej [221], co wynika ze zdolności melaniny do pochłaniania promieniowania i hamowania działania wolnych rodników. Zahamowanie melanogenezy może wpłynąć na lepsze wyniki leczenia pacjentów z czerniakiem tymi metodami [220].

Trzeba jednak zaznaczyć, że w przypadku przeprowadzonych w tej pracy badań, przy podawaniu komórek myszom ortotopowo i w dużej ich liczbie, po 3 tygodniach eksperymentu, wszystkie guzy były jednakowo ciemne niezależnie od użytej sublinii komórek B16F10.

### **Wpływ białka ADAM17 na proces angiogenezy**

W opisanych eksperymentach, białko ADAM17 miało bardzo silny wpływ na komórki śródbłonna naczyń krwionośnych. W eksperymentach *in vivo* ograniczenie

aktywności ADAM17 zarówno przez zmniejszenie jego ekspresji, jak i poprzez przeciwciała monoklonalne, silnie hamowało nowotworową angiogenezę, co wykazano przez histologiczną analizę tkanki nowotworowej (**Rysunek 28B**). W poprzednich badaniach naszego zespołu, dotyczących wpływu ADAM17 na komórki mysiego guza jelita grubego MC38, również stwierdzono, że jego poziom był istotny dla ukrwienia guza i jego okolic [4]. Dodatkowo, komórki śródbłonna MBE stymulowane mediami z nad hodowli B16F10 z ograniczoną aktywnością białka ADAM17 tworzyły dużo mniej pseudokapilar w matrygelu oraz migrowały znacznie wolniej w porównaniu do komórek stymulowanych medium z nad kontrolnych B16F10 (**Rysunek 22**). Dodatkowo, w komórkach B16F10 zahamowanie ekspresji ADAM17 wiązało się z obniżeniem poziomu wydzielanej do medium rozpuszczalnej formy VEGFA.

W kilku pracach pokazywano już, że ADAM17 może wpływać na ekspresję VEGFA na drodze różnorodnych mechanizmów. W keratynocytach wynikało to z aktywacji kinazy MAPK poprzez czynnik AP-2, aktywowany przez TGF $\alpha$  uwalniany przez ADAM17 [165]. W komórkach raka piersi [30] i glejaka [54] stwierdzono, że poprzez złuszczenie TGF $\alpha$ , aktywowany zostaje szlak EGFR-PI3K-Akt, który reguluje ekspresję czynnika HIF-1, wpływającego bezpośrednio na ekspresję VEGFA. W badaniach tych wykazano, że poziom białka ADAM17 jest skorelowany zarówno z poziomem ekspresji jak i jego wydzielaniem z komórek nowotworowych.

Oprócz wpływu ADAM17 na uwalnianie przez komórki nowotworowe substancji proangiogennych, poziom tego białka ma znaczenie także w samych komórkach śródbłonna. Grupa Carla Blobela pokazała, że komórki śródbłonna wyizolowane z myszy z warunkową delecją ADAM17 (myszy Adam17flox/flox/Tie2-Cre) miały ograniczoną zdolność do tworzenia pseudokapilar w matrygelu, która jednak wzrastała po dodaniu do hodowli HB-EGF. Co ciekawe, u zwierząt tych, wzrost guza z podanych im komórek B16 był znacznie ograniczony, w porównaniu do myszy kontrolnych, mimo, że nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w gęstości naczyń krwionośnych wokół guza [52]. Na rolę białka HB-EGF w opisanych procesach

wskazują też badania przeprowadzone na linii HUVEC [26]. Na tych komórkach wykazano też, że zahamowanie w nich ekspresji ADAM17, poprzez transdukcję siRNA, ograniczało ich proliferację oraz tworzenie przez nie pseudokapilar w matrygelu i zdolność do inwazji *in vitro*, poprzez hamowanie aktywacji MMP-2, zarówno w sposób niezależny, jak i zależny od VEGF. Mechanizm tego zjawiska nie został jeszcze dokładnie wyjaśniony [25].

Wpływ białka ADAM17 na angiogenezę nie ogranicza się tylko do aktywności opisanych wyżej białek. Stwierdzono, że zahamowanie aktywności ADAM17 w ludzkich komórkach śródbłonna naczyń włosowatych serca HMvECs, prowadzi w nich do zwiększenia ekspresji negatywnego regulatora angiogenezy, trombospondyny-1 (TSP1). Z kolei stymulacja aktywności ADAM17 prowadzi do odwrotnej zależności – zmniejszenia ekspresji TSP1 i nasilenia procesu angiogenezy. Może być ona ponownie hamowana egzogennym dodaniem TSP1. Mechanizm działania tego zjawiska, na tę chwilę nie został jeszcze wyjaśniony [222]

Opisane wyżej badania wskazują na fakt, że aktywność ADAM17 zarówno w komórkach nowotworowych jak i śródbłonna sprzyja angiogenezie, a zahamowanie jego aktywności może ten proces ograniczać.

Kolejnym dowodem na to, że białko ADAM17 poprzez złuszczenie swoich substratów lub pośrednio wpływając na ekspresję innych białek może mieć znaczenie w patologicznej angiogenezie, były eksperymenty wykonane na modelu danio pręgowane. Badania angiogenezy nowotworowej, a szczególnie jej pierwszych stadiów, stymulowanej komórkami czerniaka były już wielokrotnie podejmowane w tym modelu. Pokazano, że nawet pojedyncza komórka czerniaka, która znajduje się poza obszarem pierwotnego guza, może wywoływać powstawanie nowych naczyń krwionośnych [223]. Dodatkowo, kiedy wstrzykiwano nieprzerzutujące komórki B16, do wywołania angiogenezy konieczne było od 100 do 300 komórek. W przypadku przerzutujących B16F10 wystarczało do tego nawet 15-30 komórek [224]. W naszych eksperymentach, aby zaobserwować ten efekt u ok. 40 % embrionów konieczne było

podanie ok. 150 komórek. Mniejsza ilość komórek potrzebnych do wywołania angiogenezy w tym modelu wynikać może z miejsca ich podania – nie do przestrzeni okołozółtkowej, ale do kanału cuviera (gdzie przebiega żyła główna) [115], [224].

Wiarygodność i sens badania wpływu komórek nowotworowych na angiogenezę w modelu danio pręgowanego potwierdzają także prace, w których obserwowano wywołanie zjawiska angiogenezy lub/i jego nasilenie w zależności od inwazyjnego charakteru guzów [166], [167], [225]–[228]

W naszych badaniach komórki kontrolne powodowały tworzenie się nieprawidłowości w rozwoju żyły SIV w postaci dodatkowych naczyń u większej liczby embrionów, niż komórki z niskim poziomem ADAM17 (**Rysunek 23**). Mimo, że nie wykazano jakie czynniki proangiogenne były za ten proces odpowiedzialne, są to prawdopodobnie substraty ADAM17. W modelu danio pręgowane pokazano również, że hamowanie aktywności receptora EGFR poprzez jego specyficzne inhibitory, może ograniczać proces angiogenezy [229], [230].

### **Wpływ białka ADAM17 na proces limfangiogenezy**

Komórki guza, które w skutek mutacji zdolne są odłączyć się od guza pierwotnego, mogą spowodować powstanie wtórnych ognisk nowotworowych, jeśli przeżyją i będą zdolne do podjęcia proliferacji w nowej niszy. Badania wskazują, że komórki nowotworowe mogą tworzyć odległe przerzuty poprzez (i) ich transport naczyniami limfatycznymi do węzłów chłonnych, a stamtąd z układem krwionośnym lub limfatycznym do innych organów (ii) pomijając układ limfatyczny, dostając się do innych miejsc w organizmie prawdopodobnie przez układ krwionośny. Na istnienie obu tych dróg przerzutowania wskazują ostatnie badania. Wykazano, że u 65% pacjentów z nowotworem jelita grubego, komórki nowotworowe w przerzutach były innymi subklonami komórek z guza pierwotnego, niż te, które znajdowały się w węzłach chłonnych. U 35% pacjentów, zidentyfikowano klony komórek guza w węzłach chłonnych jako te, które rozprzestrzeniły się w organizmie i były

odpowiedzialne za wzrost guza poza ogniskiem pierwotnym [231]. Badania te wymagają jednak potwierdzenia na większej grupie pacjentów i w innych typach nowotworów.

Często zdarza się, że naczynia powstające wokół, a zwłaszcza we wnętrzu guza, są zapadnięte lub niedrożne [72]. U myszy, którym podano komórki B16F10 z nadekspresją VEGFC stwierdzono, że żadne z powstałych w guzie naczyń nie jest funkcjonalne i nie jest zdolne do zbierania i transportowania limfy. Wykazano, że naczynia powstałe na obrzeżach guza lub w jego okolicy nie tylko są drożne, ale także w 40% z nich występowały proliferujące komórki LEC, wskazując na ciągłą ich przebudowę i dalszy rozwój [232]. Niektóre badania pokazują, że sama limfangiogeneza nie jest konieczna do przerzutowania komórek drogą naczyń limfatycznych, jednak proces ten może im ułatwiać przedostawanie się do układu limfatycznego [233], [234]. W rozwoju guza mogą mieć znaczenie jednak nawet niefunkcjonalne naczynia limfatyczne. Udowodniono, że mogą one wpływać na ograniczenie odpowiedzi immunologicznej w okolicy guza m.in. poprzez wysoką ekspresję PD-L1 [235], a dzięki wydzielanych przez nie różnych chemokinach mogą promować kierowanie się komórek nowotworowych do węzłów chłonnych [164].

Do tej pory bardzo niewiele było wiadomo na temat wpływu białka ADAM17 na rozwój naczyń limfatycznych. W opisanych w tej pracy eksperymentach na komórkach LEC stwierdzono, że ADAM17 wpływa na ich migrację, adhezję do fibronektyny, kolagenu i plastiku oraz zdolność do inwazji i tworzenia wypustek w modelu 3D.

ADAM17 może wpływać na zdolność do adhezji i migracji komórek naczyń limfatycznych poprzez różne mechanizmy: (i) uwalnianie z błony czynników wzrostu aktywujących receptory ErbB, a przez to na ich oś sygnalowania i regulowanie przez to procesów zachodzących w komórkach, (ii) poprzez białka adhezyjne na powierzchni LEC, które są jego substratami (iii) na drodze oddziaływania z integrzynami oraz (iv) przez pośredni wpływ na stymulację aktywności lub ekspresji

białek zaangażowanych w procesy migracji.

(i) W badaniach nad linią LEC bardzo wyraźnie widoczna była różnica w poziomie czynnika wzrostu HB-EGF w postaci rozpuszczalnej lub związanej z błoną w komórkach z niską lub wyjściową ekspresją ADAM17. Zahamowanie receptorów EGFR i HER2 znosiło różnicę w potencjale migracyjnym badanych sublinii komórek LEC wskazując, że ten lub dodatkowo inne czynniki wzrostu działające na receptory HER mają wpływ na zdolność migracji komórek LEC. Na proces migracji tych komórek wpływać też mogą inne białka z rodziny czynników wzrostu.

(ii) Na komórkach LEC wykazano obecność takich białek adhezyjnych jak ALCAM, CD44, JAM-A będących substratami białka ADAM17. Różnice w ich poziomie pomiędzy komórkami kontrolnymi i tymi o niskim poziomie białka ADAM17 wykryto tylko w przypadku białka JAM-A. Teoretycznie, jako że ADAM17 złuszcza je z błony komórkowej, powinno być go mniej w lizatach komórek kontrolnych w porównaniu do komórek z niską ekspresją ADAM17, co mogłoby tłumaczyć obserwowane różnice w szybkości poruszania się komórek. Jak stwierdzono, poziom błonowej formy JAM-A na komórkach nowotworowych piersi jest odwrotnie proporcjonalny do ich zdolności do migracji [236]. Nieoczekiwanie jednak w komórkach LEC białka tego było więcej nie tylko w mediach, ale także w lizatach komórek K (**Tabela 2 sup**).

(iii) ADAM17 może wpływać na wzajemne interakcje komórek oraz ich adhezję do ECM poprzez wpływanie na aktywność niektórych integrzyn czy oddziaływanie z nimi [9], [201], [202]. W lizatach komórek kontrolnych LEC stwierdzono znacząco wyższy poziom łańcuchów integrzyn  $\beta 3$  i  $\beta 4$ . Wyższy poziom łańcucha  $\beta 4$  na błonie wykazano także w teście wiązania się komórek LEC do immobilizowanych przeciwciał anty-integryny (**Rysunek 15A**). Nie jest wiadome, czy wpływa to na efekt biologiczny i czy np. tworzy się przez to więcej białek integrzynowych poprzez łączenie się z łańcuchami  $\alpha$ . W badaniach pokazano, że np.  $\alpha 6\beta 4$  promuje migrację komórek, bezpośrednio wpływając na ich szkielet aktynowy, a także poprzez działanie na cząsteczki sygnałowe stymulujące migrację komórek przez szlak PI3-K [236]. Możliwe jest także,

że ADAM17, poprzez oddziaływanie łańcuchem integrynowym  $\alpha 5$  na tej samej komórce, uniemożliwia jej oddziaływanie z podłożem czy macierzą zewnątrzkomórkową [10]. Przy braku ekspresji badanej metaloproteazy, w wyniku nieobecności takich oddziaływań, zwiększona mogłaby zostać adhezja komórek LEC do podłoża, a przez to migracja komórek byłaby wolniejsza, co zaobserwowano w przeprowadzonych doświadczeniach.

(iv) Dodatkowo, w badaniach nad komórkami LEC wykazano, że ADAM17 pośrednio może wpływać na poziom różnych białek w komórce, niebędących jego substratami. Może działać się tak w przypadku białka BIG-H3, którego nadekspresję stwierdzono w komórkach z niską ekspresją ADAM17. Znaczenie tego białka w adhezji LEC udowodniano już wcześniej. Wykazano, że jego poziom znacząco rośnie podczas hodowania komórek LEC w warunkach hipoksji i prawdopodobnie jest jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za zwiększenie adhezji pomiędzy nim a komórkami nowotworowymi (co pokazano na przykładzie komórek guza płuc) w porównaniu do komórek rosnących w standardowych warunkach [237]. Białko BIG-H3 uznano także za istotne w promowaniu adhezji komórek fibroblastów błony maziowej do komórek śródbłonna oraz adhezji i migracji komórek naczyń mięśni gładkich z nim oddziałujących [238]. Udowodniono też, że oddziałuje z integryną  $\alpha 5 \beta 1$  na powierzchni komórek mięśniówki gładkiej naczyń, przez co może wpływać na ich zwiększoną adhezję do innych komórek [239]. Ekspresja BIG-H3 stymulowana jest silnie przez białko TGF $\beta$ 2, którego poziom w komórkach z niską ekspresją ADAM17 był znacznie wyższy, niż w przypadku komórek kontrolnych. Receptor dla białek z rodziny TGF $\beta$  – TGF $\beta$ RI jest substratem ADAM17 [240]. Przy obniżonej aktywności badanej metaloproteazy można więc spodziewać się nasilonego działania różnych izoform TGF $\beta$ . Jest to szczególnie istotne, jako że udowodniono hamujące działanie białek tej rodziny na proces limfangiogenezy [235]. Większa ekspresja TGF $\beta$ 2 może być więc powodem obserwowanej zmniejszonej inwazyjności komórek L1.

Jakkolwiek, zwiększoną produkcję BIGH3 w komórkach o niskiej aktywności ADAM17 można tłumaczyć podwyższonym poziomem TGF $\beta$ 2, nie jest jasne, w jaki

sposób ADAM17 promuje ekspresję właśnie tego czynnika wzrostu. Dodatkowo, niewytłumaczony zostaje fakt, dlaczego poziom BIGH3 w mediach znad komórek kontrolnych jest wyższy niż w komórkach z niską ekspresją ADAM17. Jako, że jest to białko rozpuszczalne, nie może wynikać to z funkcji proteazowej ADAM17. Jednym z możliwych wyjaśnień tego zjawiska, pozostającym jednak w sferze spekulacji, jest to, że białko ADAM17 może wpływać pośrednio na strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej. Jego niska aktywność powoduje silniejsze usieciwienie ECM i/lub silniejsze oddziaływanie z nią komórek, przez co białka wydzielnicze mogłyby w niej „utknąć” i być w mniejszej ilości wykrywane w medium. Wykazano, że większa gęstość macierzy komórkowej może powodować zwiększenie adhezji komórek do podłoża, jednocześnie ograniczając oddziaływania komórka-komórka [241].

Taki właśnie wynik uzyskano w przypadku komórek LEC z niską ekspresją białka ADAM17 – mimo zwiększonej adhezji do białek macierzy zewnątrzkomórkowej dużo słabiej adherowały do nich komórki nowotworowe: MCF-7, Caco-2, THP-1. Ma to bardzo duże znaczenie, ponieważ jak wskazują badania – im silniejsza adhezja komórek nowotworowych do naczyń limfatycznych, tym łatwiej mogą się przez nie przemieszczać [237]. Obserwowana różnica w oddziaływaniach pomiędzy komórkami LEC z różną ekspresją białka ADAM17 a komórkami nowotworowymi, mogłaby także wynikać ze wspomnianej wcześniej funkcji ADAM17 jako dezintegryny. Przyjmując, że białko to oddziałuje z integrynami występującymi na innych komórkach [9], jego wyższy poziom mógłby promować ich wzajemną adhezję.

Trudno powiedzieć coś o wpływie ADAM17 na proces limfangiogenezy *in vivo*, ze względu na wybrany do badań model komórkowy. Podanie myszom komórek B16F10 nie stymulowało powstawania nowych naczyń limfatycznych, mimo, że zgodnie z danymi literaturowymi jest to linia, która powinna wywołać ten efekt u myszy [242], [243]. Ze względu na stwierdzoną obecność komórek nowotworowych w węzłach chłonnych myszy, którym podano te komórki ortotopowo, można przypuszczać, że do metastazy komórek doszło między innymi drogą naczyń

limfatycznych. Możliwe, że komórki nowotworowe wykorzystały w tym celu istniejące już naczynia limfatyczne znajdujące się wokół nowotworu.

### **Przeciwciała hamujące aktywność ADAM17 i ich znaczenie w terapii antynowotworowej**

Badanie wyciszenia białka ADAM17 w komórkach nowotworowych może dostarczyć informacji o jego wpływie na rozwój guza, czy przerzutowanie. Wiadomo jednak, że białko to ma znaczenie także w komórkach otaczających guza – komórkach śródbłonna oraz immunologicznych, które również wpływają na te procesy. Dlatego też, interesujące było sprawdzenie czy zahamowanie aktywności tego enzymu nie tylko w guzie, ale także wokół niego, wpłynie na wzrost i przerzutowanie nowotworu. Dodatkowo, informacja ta byłaby cenna w kontekście możliwego terapeutycznego wykorzystania hamowania aktywności białka ADAM17 u pacjentów z czerniakiem.

W tym celu konieczne było wykorzystanie do badań *in vivo* specyficznego inhibitora białka ADAM17. W prowadzonych eksperymentach wykorzystano przeciwciała monoklonalne hamujące aktywność białka ADAM17 – A9(B8) stworzone przez zespół prof. Murphy. Przeciwciało to powstało jako modyfikacja przeciwciała D1(A12), mającego specyficzność tylko względem ludzkiego białka, które w toku dalszych prac zmodyfikowano w taki sposób, aby rozróżniało również mysie białko, m.in. w celu szerszych możliwości potencjalnego testowania *in vivo*. Przeciwciało to zostało wyselekcjonowane jako fragment z użyciem techniki ekspresji fagowej. Części zmienne łańcuchów ciężkich (D1) oddziałują z jedną z domen białka ADAM17 (bogatą w reszty cysteiny), a części zmienne łańcuchów lekkich (A12) blokują aktywność jego domeny katalitycznej. Metodami inżynierii genetycznej, części zmienne zostały umieszczone w zrębie ludzkiego przeciwciała klasy IgG2. Było to istotne ze względu na fakt, że ta klasa przeciwciał ma ograniczone funkcje efektorowe – nie wywołuje ADCC i nie aktywuje efektywnie dopełniacza [244]. Udowodniono, że D1(A12) hamuje uwalnianie kilku substratów ADAM17 takich jak: TNF, TGF $\alpha$ , HB-EGF, AREG, i TNFR1. W badaniach *in vitro* potwierdzono także, że ogranicza

migrację i wzrost, a także zwiększa śmiertelność komórek HCC1143, oraz inwazyjność komórek HCC1937 – linii nowotworowych TNBC (potrójnie ujemnego raka piersi) [59]. W badaniach tych potwierdzono również, że przeciwciało to nie wywołuje ADCC, co wykazano także w naszych badaniach nad A9(B8) (danych nie pokazano).

W warunkach *in vitro* przeciwciała nie hamowały proliferacji komórek B16F10 rosnących w dużej gęstości, jednak silnie ograniczały ich migrację, a w przypadku komórek śródbłonna naczyń krwionośnych (MBE) także tworzenie pseudokapilar w matrygelu.

Przeprowadzone eksperymenty wskazują, że, mimo że, to silnie mogą. W modelu *in vivo*, stężenie przeciwciał w surowicy krwi na poziomie ok 2  $\mu$ M może spowalniać indukowaną przez nowotwór z komórek B16F10 angiogenezę. Zaobserwowano także tendencję w hamowaniu metastazy nowotworowej. Otrzymano jednak niejednoznaczne wyniki dotyczące wpływu tego przeciwciała na wzrost nowotworów. U części myszy krzywa wzrostu guzów była podobna jak w przypadku wzrostu nowotworów z komórek z niskim poziomem białka ADAM17, a u części jak u tych, którym podano komórki kontrolne. Zależność ta utrzymywała się w każdym z trzech eksperymentów i nie była uwarunkowana wielkością ani wagą myszy. Wykluczono także ewentualne błędy w podaniu przeciwciał (np. podanie ich do organu zamiast dootrzewnowo, co wiązałoby się z częściową ich utratą). Zgodnie z wynikami morfologii krwi, myszy nie różniły się znacząco ilościami monocytów, limfocytów i granulocytów. Być może większa grupa badawcza myszy pozwoliłaby na znalezienie powodu różnej wrażliwości komórek B16F10 lub innych komórek w otoczeniu guza na działanie tych przeciwciał *in vivo*.

W wykonanych badaniach sprawdzono poziom przeciwciał A9(B8) i izotypowych w różnych tkankach myszy. Kinetyka zmian ich poziomu w surowicy krwi i biodystrybucja mogą wynikać m.in z masy molekularnej przeciwciała, siły przepływu krwi, różnorodności i struktury danej tkanki lub guza a także poziomu ekspresji docelowego antygeny w różnych tkankach [245]. Interesujące było odkrycie,

że u myszy, stężenie badanych przez nas przeciwciał, w stosunku do przeciwciał kontrolnych, było do siebie zbliżone, zarówno w guzie, surowicy krwi jak i w tkankach. Ten sam poziom przeciwciał można by wytłumaczyć brakiem wysokiej ekspresji białka ADAM17 na komórkach B16F10, przez co niewiele przeciwciał A9(B8) się do nich wiązało.

Wykorzystanych przez nas w badaniach przeciwciał używały także inne zespoły badawcze. Wykazano m.in, że A9(B8) działa jak inhibitor allosteryczny ADAM17, wiążąc się poza jego miejscem katalitycznym, zmieniając tym jego zdolność do wiązania substratów [246]. Potwierdzono jego skuteczność w hamowaniu aktywności ADAM17 *in vitro* i *in vivo*, stosując różne linie komórkowe nowotworów trzustki. Kiedy stymulowano przez PMA aktywność ADAM17 w linii DT8082 (gruczolakoraka przewodowego), rósł poziom uwalnianej przez te komórki amfireguliny (AREG). Dodatek przeciwciał skutecznie hamował ten proces [246]. Z kolei w linii PANC-1 zastosowanie A9(B8) w 250 nM stężeniu, mimo, że nie wpływało na ich proliferację, bardzo silnie hamowało migrację komórek w teście rany, a także ograniczało uwalnianie z powierzchni komórek TNF i AREG po stymulacji aktywności ADAM17 przez PMA. W mysim modelu spontanicznie rozwijającym guzy trzustki: Pdx1Cre;LSL-KrasG12D;Trp53flox/+ podanie tych przeciwciał znacząco ograniczało powstawanie nowotworów typu gruczolakoraka przewodowego trzustki [247].

Niedługo po stworzeniu specyficznych monoklonalnych przeciwciał hamujących aktywność białka ADAM17 przez zespół prof. Murphy, udało się to także firmie biotechnologicznej MedImmune, LLC. Przeciwciało MEDI3622 rozpoznawało ludzkie białko ADAM17 i podawane myszom atymicznym (*nude*), którym wstrzyknięto wcześniej ludzkie komórki raka przełyku (OE21) lub nowotworu jelita (Colo205), hamowało wzrost guzów odpowiednio siedmio- i prawie dwukrotnie w porównaniu do kontroli [196]. We wspomnianych powyżej badaniach nie pokazano aby pomiędzy zwierzętami występowały znaczące różnice w wielkości guzów po podaniu im przeciwciał.

Otrzymane w niniejszej pracy wyniki, dotyczące wpływu hamowania aktywności lub ekspresji białka ADAM17 w komórkach nowotworowych i komórkach go otaczających, nie dostarczyły jednoznacznej odpowiedzi czy mogłoby to przynieść korzyści w terapii czerniaka u pacjentów. Mimo, że obserwowano zahamowanie wzrostu guza, dotyczyło to tylko jego początkowego etapu rozwoju, a w przypadku stosowania przeciwciał monoklonalnych tylko części zwierząt którym je podano. Pewne nadzieje budzi fakt, że zahamowanie aktywności białka ADAM17 ograniczało nowotworową angiogenezę oraz przerzutowanie. Być może więc terapia wykorzystująca ten efekt mogłaby być stosowana jako uzupełniająca, oprócz chemio czy radioterapii. Hipotezę tę zdają się potwierdzać badania, w których wykazano, że zahamowanie aktywności białka ADAM17 w komórkach nowotworu jelita grubego może zwiększyć jego wrażliwość na terapię oksaliplatyną [248] a także cisplatyną w komórkach nowotworowych jajnika [183]. Dodatkowo, w komórkach nowotworowych wątroby Huh7 CD133+, które przeżyły radioterapię, zahamowanie aktywności białka ADAM17 ogranicza nabywanie przez nich inwazyjnego charakteru [181].

## WNIOSKI

Na podstawie wyników zamieszczonych w poniżej pracy można stwierdzić, że:

1). Metaloproteaza ADAM17 ma znaczący wpływ na profil białkowy w komórkach naczyń limfatycznych LEC. Nie tylko wpływa na stosunek białek błonowych i rozpuszczalnych w tych komórkach, ale także pośrednio wpływa na ich transkryptom i proteom.

2). Ograniczenie aktywności ADAM17 wpływa na właściwości komórek LEC, istotne w procesie limfangiogenezy m.in. zahamowanie szybkości ruchu, transmigracji, zdolności tworzenia wypustek przez skupiska komórek. Może wynikać to m.in. z uwalnianych przez tę metaloproteazę z błony komórkowej czynników wzrostu działających na receptory z rodziny EGF, regulacji poziomu integryn na błonie, a także z jego wpływu na poziom białka macierzy zewnątrzkomórkowej np. BIG-H3

4). Zahamowanie ekspresji białka ADAM17 powoduje ograniczony wzrost klonalny, ruch i melanogenezę komórek B16F10 *in vitro*.

5). Niski poziom ekspresji ADAM17 w komórkach B16F10 może hamować wzrost i przerzutowanie guzów oraz angiogenezę związaną z nowotworem w modelach *in vivo*.

6). Biologiczne hamowanie aktywności białka ADAM17 w modelu mysim, poprzez stosowanie odpowiednich przeciwciał, może ograniczać angiogenezę związaną z nowotworem, wzrost guza i jego przerzutowanie. Efekty te nie są jednak obserwowane u wszystkich myszy którym je podano.

Wykonane w powyższej pracy eksperymenty, oprócz wskazania pewnych zjawisk i próby ich wytłumaczenia, pozostawiły wiele znaków zapytania w kwestii biologii komórek naczyń limfatycznych i nowotworowych związanych z aktywnością białka ADAM17. Jednak jak powiedział George Bernard Shaw: „Nauka nie potrafi rozwiązać żadnego problemu bez tworzenia kolejnych dziesięciu”. Zgodnie z tą sentencją, chociaż wiele pozostaje do odkrycia, wierzę, że opisane tutaj badania, były krokiem w dobrym kierunku w celu poznania roli białka ADAM17 w procesach związanych ze wzrostem i przerzutowaniem nowotworów.

## SUPLEMENT

**Tabela 1 sup. Spis typów nowotworów, ich skrótów oraz ilości pacjentów w danej kohorcie, wykorzystanych w porównaniu poziomu mRNA ADAM17 między guzem a zdrową tkanką.**

<i>Typ nowotworu</i>	<i>Skrót</i>	<i>Ilość pacjentów</i>
Adrenocortical Carcinoma	ACC-TP	38
Bladder Urothelial Carcinoma	BLCA-TP	42
Breast Invasive Carcinoma	BRCA-TP	49
Cervical Squamous Cell Carcinoma and Endocervical Adenocarcinoma	CESC-TP	42
Cholangiocarcinoma	CHOL-TP	38
Colon Adenocarcinoma	COAD-TP	44
Colorectal Adenocarcinoma	COADREAD-TP	44
Lymphoid Neoplasm Diffuse Large B-cell Lymphoma	DLBC-TP	38
Esophageal Carcinoma	ESCA-TP	42
Glioblastoma Multiforme	GBM-TP	44
Glioma	GBMLGG-TP	51
Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	HNSC-TP	42
Kidney Chromophobe	KICH-TP	38
Pan-kidney cohort (KICH+KIRC+KIRP)	KIPAN-TP	45
Kidney Renal Clear Cell Carcinoma	KIRC-TP	45
Kidney Renal Papillary Cell Carcinoma	KIRP-TP	40
Acute Myeloid Leukemia	LAML-TB	30
Brain Lower Grade Glioma	LGG-TP	46
Liver Hepatocellular Carcinoma	LIHC-TP	37
Lung Adenocarcinoma	LUAD-TP	49
Lung Squamous Cell Carcinoma	LUSC-TP	48
Mesothelioma	MESO-TP	28
Ovarian Serous Cystadenocarcinoma	OV-TP	48
Pancreatic Adenocarcinoma	PAAD-TP	38
Pheochromocytoma and Paraganglioma	PCPG-TP	38
Prostate Adenocarcinoma	PRAD-TP	39
Rectum Adenocarcinoma	READ-TP	44
Sarcoma	SARC-TP	38
Skin Cutaneous Melanoma	SKCM-TM	42
Stomach Adenocarcinoma	STAD-TP	39
Stomach and Esophageal carcinoma	STES-TP	42
Testicular Germ Cell Tumors	TGCT-TP	38

Thyroid Adenocarcinoma	THCA-TP	42
Thymoma	THYM-TP	38
Uterine Corpus Endometrioid Carcinoma	UCEC-TP	49
Uterine Carcinosarcoma	UCS-TP	38
Uveal Melanoma	UVM-TP	35

Dane pochodzą z bazy firebrowse (<http://firebrowse.org/>).

**Tabela 1 sup. Poziom sygnału chemiluminescencyjnego różnych białek w lizatach i mediach sublinii komórek LEC uzyskanych w wyniku analizy macierzy białkowych**

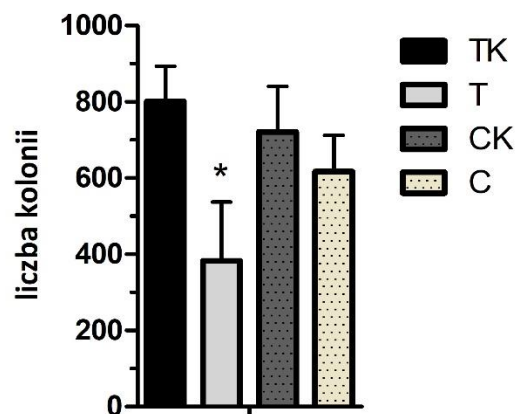
Białko	Chemiluminescencja 10 <sup>-3</sup>			
	Lizaty		Media <sup>1</sup>	
	M	S1	M	S1
ADAM15	662	623	BS <sup>2</sup>	BS
ADAM9	1593	1434	351	311
ALCAM	557	456	298	273
BACE-1	130	220	BS	BS
BCAM/CD239	62	BS	BS	BS
BIG-H3	5	270	1188	830
C1q R1/CD93	1265	1353	WNW <sup>3</sup>	1275
Cathepsin D	1654	1792	1277	WNW
Cadherin 13	BS	406	262	160
P-Cadherin	BS	BS	109	30
CD155	202	WNW	BS	BS
CD31/PECAM-1	965	867	363	336
CD36/SR-B3	278	356	BS	BS
CD40 Ligand	217	189	BS	BS
CD44H	110	60	BS	BS
CD58/LFA-3	81	140	BS	BS
CD99	544	577	BS	BS
Clusterin	BS	BS	276	269
CREGD2	2889	3095	291	WNW

*Chemiluminescencja 10<sup>-3</sup>*

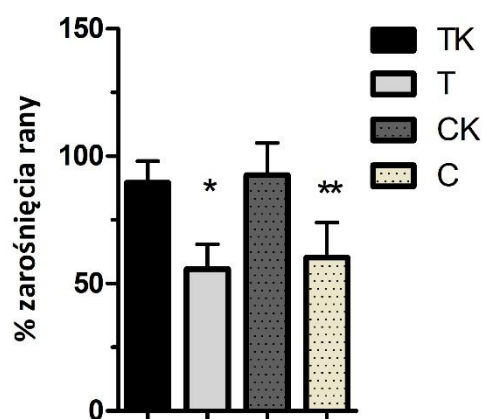
Białko	<i>Lizaty</i>		<i>Media<sup>1</sup></i>	
	<i>M</i>	<i>S1</i>	<i>M</i>	<i>S1</i>
	CXCL8/IL-8	857	421	WNW
ECM-1	473	410	1488	648
EMMPRIN/CD147	2813	3106	809	402
Endoglin/CD105	723	653	297	246
ESAM	2293	1760	1208	1720
Galectin-1	334	241	BS <sup>2</sup>	BS
Galectin-3	1653	1777	338	83
Galectin-3BP/MAC-2BP	112	33	313	248
HB-EGF	29	70	BS	BS
ICAM-2/CD102	GD <sup>4</sup>	GD	382	301
IL-15 R alpha	338	296	BS	BS
Integrin alpha v/CD51	2	455	BS	BS
Integrin alpha 5/CD49e	658	735	205	81
Integrin beta 1/CD29	2621	3406	473	402
Integrin beta 2/CD18	135	156	GD	GD
Integrin beta 3/CD61	100	52	BS	BS
Integrin beta 4/CD104	100	GD	BS	BS
Integrin beta 5	1976	1698	263	53
JAM-A	509	211	174	GD
JAM-C/JAM3	1066	1057	387	248
Lipocalin-2	BS	75	BS	BS
MCAM/CD146	701	638	212	210
MD-1/LY86	188	87	BS	BS
MMP-2 (total)	GD	GD	279	187
Nectin-2/CD112	1029	1202	672	WNW
PAR1	156	GD	BS	BS
Pref-1/GDK-1/FA1	148	72	BS	BS
RECK	73	10	156	71

Białko	Chemiluminescencja 10 <sup>-3</sup>			
	Lizaty		Media <sup>1</sup>	
	M	S1	M	S1
Semaphorin 3A	BS	BS	74	47
SREC-I/SR-F1	1322	1162	206	111
Stanniocalcin 1	BS	BS	112	87
Syndecan-4	BS	BS	<b>141</b>	<b>38</b>
TACE/ADAM17	336	238	BS	BS
Thrombospondin-1	1014	967	436	491
TIMP-1	463	390	926	WNW
TIMP-2	BS	BS	630	698
TIMP-4	BS	BS	183	157
TNFR2	47	48	BS	BS
TROP-2	499	432	<b>90</b>	GD
VEGFR2	BS	BS	106	104

<sup>1</sup>Sygnaly chemiluminescencyjne pochodzące z lizatów i mediów nie powinny być ze porównywane jako, że lizaty pochodzą z ok. 2,5 razy mniejszej ilości komórek niż media. <sup>2</sup>BS – brak sygnału. <sup>3</sup>WNW – wynik niewiarygodny, jako że różnice pomiędzy sygnałami chemiluminescencyjnymi kropek w duplikatach były większe niż 10%. <sup>4</sup>GD – sygnał na granicy detekcji. Pogrubioną czcionką oznaczono te białka, które różniły się intensywnością sygnału  $\geq 50\%$ .



**Rysunek 1 sup.** Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na proliferację komórek B16F10. Wykres przedstawia średnią liczbę kolonii powstałych po wysianiu na płytce komórek w niskiej gęstości, po 21 dniach od rozpoczęcia eksperymentu. Dane prezentowane są jako średnia  $\pm$  SD z 3 niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach. \* $P < 0.05$  vs K.

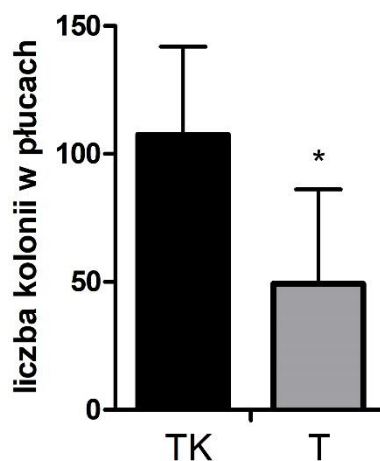


**Rysunek 2 sup.** Test rany komórek B16F10 T i TK oraz C i CK. Wykres przedstawia stopień zarośnięcia rany przez komórki M i S w różnych warunkach po 18 h od zranienia. Dane prezentowane są jako średnia  $\pm$  SD z 3 niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach. \* $P < 0,001$  vs TK, \*\* $P < 0,001$  vs CK.

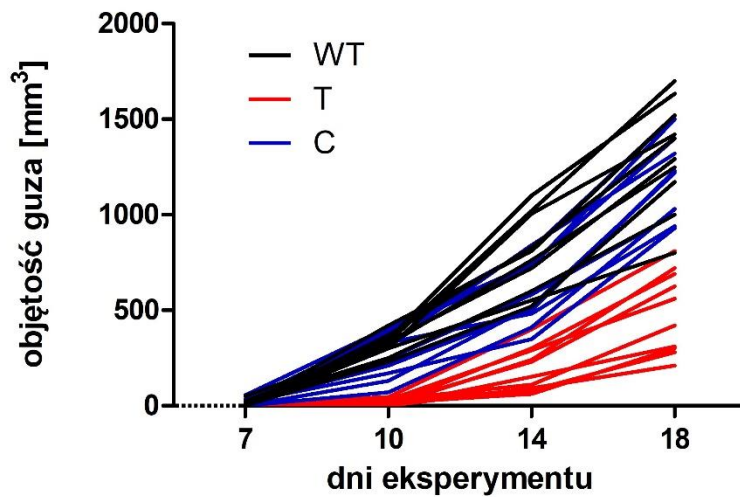
Tabela 1 sup Analiza przerzutowania komórek WT, C i T

<i>nowotwór/ przeciwciało</i>	<i>lizat – węzły – mRNA*</i>	<i>lizat – płuca – mRNA*</i>
WT	83%** (10/12)	29% (4/14)
C	75% (6/8)	22% (2/9)
T	37,5% (3/8)	13% (1/8)

\* na podstawie obecności mRNA tyrozynazy w tkance, \*\* procent myszy, u których stwierdzono przerzuty, w nawiasie podano liczbę myszy, u których stwierdzono przerzuty w stosunku do liczby analizowanych zwierząt.



**Rysunek 3 sup. Wzrost guzów sublinii T i TK u myszy.** Mysiom podawano komórki TK lub T ( $5 \times 10^5$ ) do żyły ogonowej. Po trzech tygodniach pobierano płuca i liczone kolonie komórek nowotworowych. Wykres przedstawia wartości średnich arytmetycznych  $\pm$  SD liczby kolonii w płucach. Analizowano 10 płuc w 2 niezależnych eksperymentach. \* $P < 0,01$  vs TK



Rysunek 4 sup. Wzrost guzów sublinii B16F10 po podaniu ortotopowym u myszy. Wykresy wzrostu guzów WT, T i C (B). Dla czytelności wykresu przedstawiono 10 przykładowych krzywych dla każdego przypadku, a krzywe oznaczono ciągłymi liniami. Dane pochodzą z dwóch niezależnych eksperymentów. Objętość guza liczono według wzoru  $V=(\text{szerokość guza}^2 \times \text{długość guza})/2$  [249].

## STRESZCZENIE

Celem terapii antynowotworowych jest hamowanie wzrostu i przerzutowania komórek nowotworowych. Jednym z kluczowych etapów tworzenia nowych form leczenia jest identyfikacja białek zaangażowanych w te procesy. Metaloproteinaza ADAM17 może być jedną z takich cząsteczek. Poprzez modyfikację mikrośrodowiska guza poprzez złuszczenie z powierzchni komórek różnych czynników wzrostu, cytokin, receptorów i białek adhezyjnych, wpływa na procesy proliferacji, migracji oraz odpowiedź immunologiczną. Nadekspresję tego białka stwierdzono w wielu typach nowotworów, a jej poziom w niektórych guzach stanowi marker stopnia zaawansowania choroby.

Aby zbadać rolę ADAM17 w rozwoju nowotworów oraz w procesie limfangiogenezy często towarzyszącej ich wzrostowi stworzono, używając metody stabilnej transdukcji lentiwirusowej, dwa modele komórkowe: model ludzkich komórek śródbłonna naczyń limfatycznych (LEC) oraz mysich komórek czerniaka B16F10 ze znikomą ekspresją tego białka.

Stwierdzono, że ograniczenie aktywności ADAM17 w LEC spowodowało zmianę profilu ekspresji i/lub zmianę poziomu w błonie komórkowej m.in. takich białek jak: TGFB2, BIG-H3, HB-EGF, integryny alfa 1, ICAM-1. Zmianom tym towarzyszyły zmiany w potencjale migracyjnym LEC i ich zdolności do adhezji do różnych powierzchni i innych komórek. Dodatkowo, w tzw. teście limfangiogenezy *in vitro* zahamowaniu uległ proces tworzenia wypustek w macierzy kolagenowej pod wpływem VEGFC.

W komórkach B16F10 zarówno wyciszenie ekspresji ADAM17 jak i zahamowanie jego aktywności poprzez przeciwciała monoklonalne, wpłynęło na ich proliferację i migrację. Obserwacje te potwierdzono w badaniach *in vivo*, gdzie przy podaniu ortotopowym tych komórek spowolniony był wzrost guza i ich potencjał metastatyczny, a przy podaniu dożylnym, zdolność do ich migracji do płuc i wzrostu w tkance płucnej. Podobne wyniki otrzymano, kiedy komórki z niskim poziomem

ADAM17 wstrzykiwano do embrionów danio przegowanego; ich zdolność do przeżycia, wywoływania angiogenezy i migracji w nowym środowisku były znacznie ograniczone w porównaniu do komórek kontrolnych.

Powyższe wyniki wskazują, że białko ADAM17 wpływa na procesy nowotworzenia i przerzutowania i może być obiecującym celem terapii antynowotworowych.

## ABSTRACT

Identification of proteins involved in tumor growth and metastasis is a crucial step in designing new potential therapeutic strategies. One of such molecules is ADAM17, a membrane metalloproteinase. It regulates various processes such as cell proliferation, adhesion and the immune response via shedding of ectodomains of numerous membrane proteins, cytokines, growth factors, and receptors. Overexpression of ADAM17 is observed in many types of neoplasms and is correlated with tumor growth, progression, metastasis, and entails a poor disease progression prognosis for patients.

To study this issue ADAM17 expression were silenced in lymphatic endothelial cells (LEC) and mouse skin melanoma cells (B16F10) by using a lentiviral vector encoding ADAM17 shRNA.

It was found that silencing of ADAM17 in LEC did not affect cell proliferation but significantly decreased their migratory potential, as analyzed in a single cell motility test, and increased adhesion of the cells to various surfaces. Analysis of the cell surface proteins demonstrated elevated levels of some molecules such as integrin alpha 1, CD31 and ICAM-1, which might be, at least partially, responsible for the observed effects. Moreover, the inhibition of ADAM17 expression significantly diminished VEGFC-induced sprouting from spheroids of LEC embedded in a matrix of type I collagen in in vitro 'angiogenesis' assay.

It was also discovered that silencing of ADAM17 activity in B16F10, both by lentiviral vector and by using antibodies, affected cell proliferation when growing in low density, and decreased their migratory potential. In an in vivo model both tumor growth and metastatic potential were decreased after orthotopic injection, as well as the number of lesions in the lungs in intravenous cell injection model. These findings were also confirmed in a zebrafish model, where after transplantation of B16F10 with low expression of ADAM17 into fish embryos, tumor vasculature remodeling and cancer cell invasion were inhibited in comparison to those injected with control cells.

These results suggest that ADAM17 may play a role in tumor growth, metastasis and lymphangiogenesis, making the molecule a promising target for anticancer therapy.

## SPIS ILUSTRACJI I TABEL

Rysunek 1. Schemat uwalniania z błony komórkowej substratów białka ADAM17 i ich działanie na receptory ErbB. ....	14
Rysunek 2. Poziom mRNA Adam17 w różnych typach nowotworów w porównaniu do zdrowej tkanki.....	17
Rysunek 3. Zdjęcie miejsca iniekcji komórek nowotworowych do embrionu danio pręgowanego.....	56
Rysunek 4. Schemat eksperymentu na badanie wpływu komórek B16F10 na angiogenezę u danio pręgowanego.....	57
Rysunek 5. Schemat analizy zdolności komórek B16F10 do migracji i przeżycia poza miejscem iniekcji w organizmie danio pręgowanego.....	57
Rysunek 6. Ocena skuteczności wyciszenia ekspresji mRNA i białka ADAM17 w komórkach LEC.....	64
Rysunek 7. Membrany prezentujące poziom białek w lizatach i mediach z komórek LEC69	
Rysunek 8. Wpływ wyciszenia białka ADAM17 na proliferację komórek LEC.....	71
Rysunek 9. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na ruch pojedynczych komórek LEC.....	73
Rysunek 10. Analiza ekspresji receptorów HER w komórkach LEC.....	75
Rysunek 11 Wyniki analizy ruchu komórek LEC w obecności inhibitorów HER1 (AG-1478) oraz HER2 (AG-825).....	76
Rysunek 12. Analiza Western blotting poziomu białka HB-EGF w lizatach i mediach hodowlanych komórek.....	77
Rysunek 13. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na "limfangiogenezę in vitro" w hodowlach 3D.....	80
Rysunek 14. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na adhezję komórek LEC do różnych podłoży.....	81
Rysunek 15. Wpływ białka ADAM17 na poziom integryn i ich rolę w adhezji komórek L1 i K.....	85
Rysunek 16. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na ekspresję białka BIG-H3 i TGFβ w L1, L2 i K.....	87
Rysunek 17. Analiza adhezji różnych typów komórek do sublinii LEC.....	90
Rysunek 18. Ocena poziomu białka ADAM17 w subliniach B16F10.....	94
Rysunek 19. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na proliferację komórek B16F10.....	97
Rysunek 20. Test rany komórek B16F10. ....	99
Rysunek 21. Test proliferacji i migracji komórek śródbłonna po stymulacji mediami znad komórek S i M B16F10.....	103
Rysunek 22. Test tworzenia pseudokapilar w matrygelu przez komórki MBE i MSI.....	106
Rysunek 23. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 w komórkach B16F10 na stymulację angiogenezy w modelu danio pręgowanego.....	110
Rysunek 24. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na zdolność komórek B16F10 do migracji do naczynia krwionośnego w modelu danio pręgowanego.....	111

Rysunek 25. Schemat podawania przeciwciał myszom oraz kinetyka zmian ich stężenia w surowicy .....	113
Rysunek 26. Wzrost guzów sublinii B16F10 po podaniu ortotopowym u myszy .....	117
Rysunek 27. Wzrost guzów sublinii B16F10 u myszy.....	119
Rysunek 28. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 w komórkach B16F10 oraz wpływ przeciwciał anti-ADAM17 na angiogenezę.....	121
Rysunek 29 Analiza cytometryczna typów limfocytów T w guzach myszy.....	125
Rysunek 1 sup. Wpływ wyciszenia ekspresji białka ADAM17 na proliferację komórek B16F10.....	155
Rysunek 2 sup. Test rany komórek B16F10 T i TK oraz C i CK.....	155
Rysunek 3 sup. Wzrost guzów sublinii T i TK u myszy .....	156
Rysunek 4 sup. Wzrost guzów sublinii B16F10 po podaniu ortotopowym u myszy.....	157
Tabela 1 Substraty białka ADAM17 .....	11
Tabela 2. Zestawienie lentiwirusowych sekwencji shRNA .....	36
Tabela 3. Zestawienie używanych w pracy przeciwciał. ....	37
Tabela 4. Sekwencje wykorzystanych starterów.....	38
Tabela 5. Optymalizacja liczby komórek nowotworowych B16F10 wstrzykiwanych do embrionu. ....	108
Tabela 6. Analiza stężenia podawanych dootrzewnowo przeciwciał w tkankach myszy	115
Tabela 7. Analiza przerzutowania komórek sublinii B16F10 i wpływu przeciwciał anti-ADAM17 ten proces.....	118
Tabela 1 sup. Spis typów nowotworów, ich skrótów oraz ilości pacjentów w danej kohorcie, wykorzystanych w porównaniu poziomu mRNA ADAM17 między guzem a zdrową tkanką.....	152
Tabela 2 sup. Poziom sygnału chemiluminescencyjnego różnych białek w lizatach i mediach sublinii komórek LEC uzyskanych w wyniku analizy macierzy białkowych .	153
Tabela 3 sup. Analiza przerzutowania komórek WT, C i T .....	157

## BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Gooz, "ADAM-17: the enzyme that does it all.," *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 45, no. 2, pp. 146–69, Apr. 2010.
- [2] GeneCards, "ADAM17 gene." [Online]. Available: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ADAM17>. [Accessed: 20-Nov-2017].
- [3] M. L. Moss and D. Minond, "Recent Advances in ADAM17 Research: A Promising Target for Cancer and Inflammation," *Mediators Inflamm.*, vol. 2017, pp. 1–21, Nov. 2017.
- [4] S. Das, M. Czarnek, M. Bzowska, R. Mężyk-Kopeć, K. Stalińska, B. Wyroba, and et.all, "ADAM17 silencing in mouse colon carcinoma cells: the effect on tumoricidal cytokines and angiogenesis.," *PLoS One*, vol. 7, no. 12, p. e50791., Jan. 2012.
- [5] J. Arribas and C. Esselens, "ADAM17 as a therapeutic target in multiple diseases.," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 15, no. 20, pp. 2319–35, Jan. 2009.
- [6] J. Pruessmeyer and A. Ludwig, "The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer.," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 20, no. 2, pp. 164–74, Apr. 2009.
- [7] A. Sommer, F. Kordowski, J. Büch, T. Maretzky, A. Evers, J. Andrä, S. Düsterhöft, M. Michalek, I. Lorenzen, P. Somasundaram, A. Tholey, F. D. Sönnichsen, K. Kunzelmann, L. Heinbockel, C. Nehls, T. Gutschmann, J. Grötzinger, S. Bhakdi, and K. Reiss, "Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function," *Nat. Commun.*, vol. 7, p. 11523, May 2016.
- [8] I. Lorenzen, J. Lokau, Y. Korpys, M. Oldefest, C. M. Flynn, U. Künzel, C. Garbers, M. Freeman, J. Grötzinger, and S. Düsterhöft, "Control of ADAM17 activity by regulation of its cellular localisation," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 35067, Dec. 2016.
- [9] P. Gooz, Y. Dang, S. Higashiyama, W. O. Twal, C. J. Haycraft, and M. Gooz, "A Disintegrin and Metalloenzyme (ADAM) 17 Activation Is Regulated by  $\alpha 5\beta 1$  Integrin in Kidney Mesangial Cells," *PLoS One*, vol. 7, no. 3, p. e33350, Mar. 2012.
- [10] D. V. Bax, A. J. Messent, J. Tart, M. Van Hoang, J. Kott, R. A. Maciewicz, and M. J. Humphries, "Integrin  $\alpha 5\beta 1$  and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 21, pp. 22377–22386, May 2004.
- [11] A. Saha, S. Backert, C. E. Hammond, M. Gooz, and A. J. Smolka, "Helicobacter pylori CagL Activates ADAM17 to Induce Repression of the Gastric H, K-ATPase  $\alpha$  Subunit," *Gastroenterology*, vol. 139, no. 1, pp. 239–248, Jul. 2010.
- [12] J. Scheller, A. Chalaris, C. Garbers, and S. Rose-John, "ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration," *Trends Immunol.*, vol. 32, no. 8, pp. 380–387, Aug. 2011.
- [13] M. A. Lemmon, J. Schlessinger, and K. M. Ferguson, "The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 6, no. 4, p. a020768, Apr. 2014.
- [14] S. R. Needham, S. K. Roberts, A. Arkhipov, V. P. Mysore, C. J. Tynan, L. C. Zanetti-Domingues, E. T. Kim, V. Losasso, D. Korovesis, M. Hirsch, D. J. Rolfe, D. T. Clarke, M. D. Winn, A. Lajevardipour, A. H. A. Clayton, L. J. Pike, M. Perani, P. J. Parker, Y. Shan, D. E. Shaw, and M. L. Martin-Fernandez, "EGFR oligomerization organizes kinase-active dimers into competent signalling platforms," *Nat. Commun.*, vol. 7, p. 13307, Oct. 2016.
- [15] S. I. Liang, B. van Lengerich, K. Eichel, M. Cha, D. M. Patterson, T.-Y. Yoon, M. von Zastrow, N. Jura, and Z. J. Gartner, "Phosphorylated EGFR Dimers Are Not Sufficient to Activate Ras.," *Cell Rep.*, vol. 22, no. 10, pp. 2593–2600, Mar. 2018.
- [16] M. J. Wieduwilt and M. M. Moasser, "The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics.," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 65, no. 10, pp. 1566–84, May 2008.
- [17] P. J. Brennan, T. Kumogai, A. Berezov, R. Murali, and M. I. Greene, "HER2/Neu: mechanisms of dimerization/oligomerization," *Oncogene*, vol. 19, no. 53, pp. 6093–6101, Dec. 2000.
- [18] S. W. Sunnarborg, C. L. Hinkle, M. Stevenson, W. E. Russell, C. S. Raska, J. J. Peschon, B. J.

- Castner, M. J. Gerhart, R. J. Paxton, R. A. Black, and D. C. Lee, "Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Converting Enzyme (TACE) Regulates Epidermal Growth Factor Receptor Ligand Availability," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 15, pp. 12838–12845, Apr. 2002.
- [19] J. J. Peschon, J. L. Slack, P. Reddy, K. L. Stocking, S. W. Sunnarborg, D. C. Lee, W. E. Russell, B. J. Castner, R. S. Johnson, J. N. Fitzner, R. W. Boyce, N. Nelson, C. J. Kozlosky, M. F. Wolfson, C. T. Rauch, D. P. Cerretti, R. J. Paxton, C. J. March, and R. A. Black, "An essential role for ectodomain shedding in mammalian development.," *Science*, vol. 282, no. 5392, pp. 1281–4, Nov. 1998.
- [20] R. Iwamoto, S. Yamazaki, M. Asakura, S. Takashima, H. Hasuwa, K. Miyado, S. Adachi, M. Kitakaze, K. Hashimoto, G. Raab, D. Nanba, S. Higashiyama, M. Hori, M. Klagsbrun, and E. Mekada, "Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 6, pp. 3221–3226, Mar. 2003.
- [21] J. Zhao, H. Chen, J. J. Peschon, W. Shi, Y. Zhang, S. J. Frank, and D. Warburton, "Pulmonary Hypoplasia in Mice Lacking Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Converting Enzyme Indicates an Indispensable Role for Cell Surface Protein Shedding during Embryonic Lung Branching Morphogenesis," *Dev. Biol.*, vol. 232, no. 1, pp. 204–218, Apr. 2001.
- [22] L. F. Jackson, T. H. Qiu, S. W. Sunnarborg, A. Chang, C. Zhang, C. Patterson, and D. C. Lee, "Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling.," *EMBO J.*, vol. 22, no. 11, pp. 2704–16, Jun. 2003.
- [23] N. C. Luetkeke, T. H. Qiu, S. E. Fenton, K. L. Troyer, R. F. Riedel, A. Chang, and D. C. Lee, "Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development.," *Development*, vol. 126, no. 12, pp. 2739–50, Jun. 1999.
- [24] D. Nanba, A. Mammoto, K. Hashimoto, and S. Higashiyama, "Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF," *J. Cell Biol.*, vol. 163, no. 3, pp. 489–502, Nov. 2003.
- [25] C. Liu, P. Xu, S. Lamouille, J. Xu, and R. Derynck, "TACE-Mediated Ectodomain Shedding of the Type I TGF- $\beta$  Receptor Downregulates TGF- $\beta$  Signaling," *Mol. Cell*, vol. 35, no. 1, pp. 26–36, Jul. 2009.
- [26] E. Scarpa and R. Mayor, "Collective cell migration in development.," *J. Cell Biol.*, vol. 212, no. 2, pp. 143–55, Jan. 2016.
- [27] K. Mendelson, S. Swendeman, P. Saftig, and C. P. Blobel, "Stimulation of Platelet-derived Growth Factor Receptor  $\beta$  (PDGFR $\beta$ ) Activates ADAM17 and Promotes Metalloproteinase-dependent Cross-talk between the PDGFR $\beta$  and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Signaling Pathways," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 32, pp. 25024–25032, Aug. 2010.
- [28] X. Meng, B. Hu, M. M. Hossain, G. Chen, Y. Sun, and X. Zhang, "ADAM17-siRNA inhibits MCF-7 breast cancer through EGFR-PI3K-AKT activation," *Int. J. Oncol.*, vol. 49, no. 2, pp. 682–690, Aug. 2016.
- [29] X. Lv, Y. Li, M. Qian, C. Ma, H. Jing, Z. Wen, and D. Qian, "ADAM17 silencing suppresses the migration and invasion of non-small cell lung cancer," *Mol. Med. Rep.*, vol. 9, no. 5, pp. 1935–1940, May 2014.
- [30] X. Zheng, F. Jiang, M. Katakowski, Z. G. Zhang, Q. Lu, and M. Chopp, "ADAM17 promotes breast cancer cell malignant phenotype through EGFR-PI3K-AKT activation.," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 8, no. 11, pp. 1045–54, Jun. 2009.
- [31] P. Boutet, S. Agüera-González, S. Atkinson, C. J. Pennington, D. R. Edwards, G. Murphy, H. T. Reyburn, and M. Valés-Gómez, "Cutting edge: the metalloproteinase ADAM17/TNF- $\alpha$ -converting enzyme regulates proteolytic shedding of the MHC class I-related chain B protein.," *J. Immunol.*, vol. 182, no. 1, pp. 49–53, Jan. 2009.
- [32] K. Maeda, S.-M. Kang, T. Sawada, Y. Nishiguchi, M. Yashiro, Y. Ogawa, M. Ohira, T. Ishikawa, and K. Hirakawa-YS Chung, "Expression of intercellular adhesion molecule-1 and prognosis in colorectal cancer.," *Oncol. Rep.*, vol. 9, no. 3, pp. 511–4, 2002.

- [33] R. A. Black, C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March, and D. P. Cerretti, "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells," *Nature*, vol. 385, no. 6618, pp. 729–733, Feb. 1997.
- [34] M. L. Moss, S.-L. C. Jin, M. E. Milla, W. Burkhart, H. L. Carter, W.-J. Chen, W. C. Clay, J. R. Didsbury, D. Hassler, C. R. Hoffman, T. A. Kost, M. H. Lambert, M. A. Leesnitzer, P. McCauley, G. McGeehan, J. Mitchell, M. Moyer, G. Pahel, W. Rocque, L. K. Overton, F. Schoenen, T. Seaton, J.-L. Su, J. Warner, D. Willard, and J. D. Becherer, "Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- $\alpha$ ," *Nature*, vol. 385, no. 6618, pp. 733–736, Feb. 1997.
- [35] S. Rose-John, G. H. Waetzig, J. Scheller, J. Grötzinger, and D. Seegert, "The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches," *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 11, no. 5, pp. 613–624, May 2007.
- [36] P. Göoz, M. Göoz, A. Baldys, and S. Hoffman, "ADAM-17 regulates endothelial cell morphology, proliferation, and in vitro angiogenesis," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 380, no. 1, pp. 33–8, Mar. 2009.
- [37] P. M. McGowan, B. M. Ryan, A. D. K. Hill, E. McDermott, N. O'Higgins, and M. J. Duffy, "ADAM-17 expression in breast cancer correlates with variables of tumor progression," *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 8, pp. 2335–43, May 2007.
- [38] P. M. McGowan, E. McKiernan, F. Bolster, B. M. Ryan, A. D. K. Hill, E. W. McDermott, D. Evoy, N. O'Higgins, J. Crown, and M. J. Duffy, "ADAM-17 predicts adverse outcome in patients with breast cancer," *Ann. Oncol.*, vol. 19, no. 6, pp. 1075–81, Jul. 2008.
- [39] U. Lendeckel, J. Kohl, M. Arndt, S. Carl-McGrath, H. Donat, C. Röcken, and C. Röcken, "Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 131, no. 1, pp. 41–8, Jan. 2005.
- [40] D. Narita, E. Seclaman, S. Ursoniu, and A. Anghel, "Increased expression of ADAM12 and ADAM17 genes in laser-capture microdissected breast cancers and correlations with clinical and pathological characteristics," *Acta Histochem.*, vol. 114, no. 2, pp. 131–9, Mar. 2012.
- [41] G. Sinnathambiy, J. Zerfass, J. Hafner, P. Block, Z. Nickens, A. Hobeika, A. A. Secord, H. K. Lysterly, M. A. Morse, and R. Philip, "ADAM metalloproteinase domain 17 (ADAM17) is naturally processed through major histocompatibility complex (MHC) class I molecules and is a potential immunotherapeutic target in breast, ovarian and prostate cancers," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 163, no. 3, pp. 324–32, Mar. 2011.
- [42] B. B. S. Zhou, M. Peyton, B. He, C. Liu, L. Girard, E. Caudler, Y. Lo, F. Baribaud, I. Mikami, N. Reguart, G. Yang, Y. Li, W. Yao, K. Vaddi, A. F. Gazdar, S. M. Friedman, D. M. Jablons, R. C. Newton, J. S. Fridman, J. D. Minna, and P. A. Scherle, "Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer," *Cancer Cell*, vol. 10, no. 1, pp. 39–50, Jul. 2006.
- [43] A. Baumgart, S. Seidl, P. Vlachou, L. Michel, N. Mitova, N. Schatz, K. Specht, I. Koch, T. Schuster, R. Grundler, M. Kremer, F. Fend, J. T. Siveke, C. Peschel, J. Duyster, and T. Dechow, "ADAM17 regulates epidermal growth factor receptor expression through the activation of Notch1 in non-small cell lung cancer," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 13, pp. 5368–78, Jul. 2010.
- [44] J. J. Ringel, R. Jesnowski, N. Moniaux, J. Lüttges, A. Choudhury, S. K. Batra, G. Klöppel, and M. Löhr, "Aberrant expression of a disintegrin and metalloproteinase 17/tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme increases the malignant potential in human pancreatic ductal adenocarcinoma," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 18, pp. 9045–53, Sep. 2006.
- [45] T. Zhang, W. Zhu, M. Huang, R. Fan, and X. Chen, "Prognostic value of ADAM17 in human gastric cancer," *Med. Oncol.*, vol. 29, no. 4, pp. 2684–90, Dec. 2012.
- [46] Z.-X. Shou, X. Jin, and Z.-S. Zhao, "Upregulated expression of ADAM17 is a prognostic marker for patients with gastric cancer," *Ann. Surg.*, vol. 256, no. 6, pp. 1014–22, Dec. 2012.

- [47] F. Blanchot-Jossic, A. Jarry, D. Masson, K. Bach-Ngohou, J. Paineau, M. G. Denis, C. L. Laboisse, and J.-F. Mosnier, "Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells.," *J. Pathol.*, vol. 207, no. 2, pp. 156–63, Oct. 2005.
- [48] J.-W. Kornfeld, S. Meder, M. Wohlberg, R. E. Friedrich, T. Rau, L. Riethdorf, T. Löning, K. Pantel, and S. Riethdorf, "Overexpression of TACE and TIMP3 mRNA in head and neck cancer: association with tumour development and progression.," *Br. J. Cancer*, vol. 104, no. 1, pp. 138–45, Jan. 2011.
- [49] S.-S. Ni, J. Zhang, W.-L. Zhao, X.-C. Dong, and J.-L. Wang, "ADAM17 is overexpressed in non-small cell lung cancer and its expression correlates with poor patient survival.," *Tumour Biol.*, vol. 34, no. 3, pp. 1813–8, Jul. 2013.
- [50] S. Mochizuki and Y. Okada, "ADAMs in cancer cell proliferation and progression.," *Cancer Sci.*, vol. 98, no. 5, pp. 621–8, May 2007.
- [51] I. Waldhauer, D. Goehlsdorf, F. Gieseke, T. Weinschenk, M. Wittenbrink, A. Ludwig, S. Stevanovic, H.-G. Rammensee, and A. Steinle, "Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases.," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 15, pp. 6368–76, Aug. 2008.
- [52] G. Weskamp, K. Mendelson, S. Swendeman, S. Le Gall, Y. Ma, S. Lyman, A. Hinoki, S. Eguchi, V. Guaiquil, K. Horiuchi, and C. P. Blobel, "Pathological neovascularization is reduced by inactivation of ADAM17 in endothelial cells but not in pericytes.," *Circ. Res.*, vol. 106, no. 5, pp. 932–40, Mar. 2010.
- [53] P. Lin, X. Sun, T. Feng, H. Zou, Y. Jiang, Z. Liu, D. Zhao, and X. Yu, "ADAM17 regulates prostate cancer cell proliferation through mediating cell cycle progression by EGFR/PI3K/AKT pathway.," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 359, no. 1–2, pp. 235–43, Jan. 2012.
- [54] X. Zheng, F. Jiang, M. Katakowski, Y. Lu, and M. Chopp, "ADAM17 promotes glioma cell malignant phenotype.," *Mol. Carcinog.*, vol. 51, no. 2, pp. 150–64, Feb. 2012.
- [55] O. Rosso, T. Piazza, I. Bongarzone, A. Rossello, D. Mezzanzanica, S. Canevari, A. M. Orengo, A. Puppo, S. Ferrini, and M. Fabbi, "The ALCAM shedding by the metalloprotease ADAM17/TACE is involved in motility of ovarian carcinoma cells.," *Mol. Cancer Res.*, vol. 5, no. 12, pp. 1246–53, Dec. 2007.
- [56] S. Van Schaeybroeck, J. N. Kyula, A. Fenton, C. S. Fenning, T. Sasazuki, S. Shirasawa, D. B. Longley, and P. G. Johnston, "Oncogenic Kras promotes chemotherapy-induced growth factor shedding via ADAM17.," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 3, pp. 1071–80, Feb. 2011.
- [57] B. Santiago-Josefat, C. Esselens, J. J. Bech-Serra, and J. Arribas, "Post-transcriptional up-regulation of ADAM17 upon epidermal growth factor receptor activation and in breast tumors.," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 11, pp. 8325–31, Mar. 2007.
- [58] K. Ieguchi and Y. Maru, "Savior or not: ADAM17 inhibitors overcome radiotherapy-resistance in non-small cell lung cancer.," *J. Thorac. Dis.*, vol. 8, no. 8, pp. E813–5, Aug. 2016.
- [59] F. Caiazza, P. M. McGowan, M. Mullooly, A. Murray, N. Synnott, N. O'Donovan, L. Flanagan, C. J. Tape, G. Murphy, J. Crown, and M. J. Duffy, "Targeting ADAM-17 with an inhibitory monoclonal antibody has antitumour effects in triple-negative breast cancer cells," *Br. J. Cancer*, vol. 112, no. 12, pp. 1895–1903, Jun. 2015.
- [60] WHO, "Cancer," WHO, 2017. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. [Accessed: 24-Mar-2015].
- [61] Rządowa Rada Ludnościowa, *Zachorowalność i umieralność na nowotwory, a sytuacja demograficzna Polski*. Warszawa, 2014.
- [62] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer.," *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, Jan. 2000.
- [63] M. A. Jafri, S. A. Ansari, M. H. Alqahtani, and J. W. Shay, "Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies.," *Genome Med.*, vol. 8, no. 1, p. 69, 2016.
- [64] A. Letai, "Apoptosis and Cancer," *Annu. Rev. Cancer Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 275–294, Mar. 2017.

- [65] P. Mehlen and A. Puisieux, "Metastasis: a question of life or death.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, no. 6, pp. 449–58, Jun. 2006.
- [66] I. Albrecht and G. Christofori, "Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in development and cancer.," *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 55, no. 4–5, pp. 483–94, Jan. 2011.
- [67] F. Pezzella, A. L. Harris, M. Tavassoli, and K. C. Gatter, "Blood vessels and cancer much more than just angiogenesis," *Cell Death Discov.*, vol. 1, no. 1, p. 15064, Dec. 2015.
- [68] N. Maishi and K. Hida, "Tumor endothelial cells accelerate tumor metastasis," *Cancer Sci.*, vol. 108, no. 10, pp. 1921–1926, Oct. 2017.
- [69] D. S. Micalizzi, S. Maheswaran, and D. A. Haber, "A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology.," *Genes Dev.*, vol. 31, no. 18, pp. 1827–1840, Sep. 2017.
- [70] M. De Palma, D. Biziato, and T. V. Petrova, "Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 17, no. 8, pp. 457–474, Jul. 2017.
- [71] T. V Petrova, P. Bono, W. Holnthoner, J. Chesnes, B. Pytowski, H. Sihto, P. Laakkonen, P. Heikkilä, H. Joensuu, and K. Alitalo, "VEGFR-3 expression is restricted to blood and lymphatic vessels in solid tumors.," *Cancer Cell*, vol. 13, no. 6, pp. 554–6, Jun. 2008.
- [72] A. Christiansen and M. Detmar, "Lymphangiogenesis and cancer.," *Genes Cancer*, vol. 2, no. 12, pp. 1146–58, Dec. 2011.
- [73] C. Cursiefen, L. Chen, L. P. Borges, D. Jackson, J. Cao, C. Radziejewski, P. A. D'Amore, M. R. Dana, S. J. Wiegand, and J. W. Streilein, "VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment.," *J. Clin. Invest.*, vol. 113, no. 7, pp. 1040–50, Apr. 2004.
- [74] S. F. Schoppmann, P. Birner, J. Stöckl, R. Kalt, R. Ullrich, C. Caucig, E. Kriehuber, K. Nagy, K. Alitalo, and D. Kerjaschki, "Tumor-Associated Macrophages Express Lymphatic Endothelial Growth Factors and Are Related to Peritumoral Lymphangiogenesis," *Am. J. Pathol.*, vol. 161, no. 3, pp. 947–956, Sep. 2002.
- [75] A. J. Anna Banyś, Lucyna Bułaś, Ewa Długosz, Beata Szulc-Musiał, "Angiogeneza w chorobie nowotworowej," *Patofizjologia*, vol. 65, no. 4, pp. 247–250, 2009.
- [76] I. Sacewicz, M. Wiktorska, and T. Wysocki, "Mechanisms of cancer angiogenesis Mechanizmy angiogenezy nowotworowej \* Mechanisms of cancer angiogenesis," *Postep. Hig Med Dosw*, vol. 63, pp. 159–168, 2016.
- [77] A. Chachaj and A. Szuba, "Developmental and Pathological Lymphangiogenesis," in *Angiogenesis and Vascularisation*, Vienna: Springer Vienna, 2013, pp. 27–65.
- [78] M.-X. Da, Z. Wu, and H.-W. Tian, "Tumor lymphangiogenesis and lymphangiogenic growth factors.," *Arch. Med. Res.*, vol. 39, no. 4, pp. 365–72, May 2008.
- [79] J. D. Shields and M. A. Swartz, "Lymphangiogenesis in Cancer Metastasis," Springer Science & Business Media, 2009, pp. 231–243.
- [80] F. E. Lennon and P. A. Singleton, "Hyaluronan regulation of vascular integrity.," *Am. J. Cardiovasc. Dis.*, vol. 1, no. 3, pp. 200–13, 2011.
- [81] T. C. Laurent and J. R. Fraser, "Hyaluronan.," *FASEB J.*, vol. 6, no. 7, pp. 2397–404, Apr. 1992.
- [82] S. A. Stacker, S. P. Williams, T. Karnezis, R. Shayan, S. B. Fox, and M. G. Achen, "Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 14, no. 3, pp. 159–72, Mar. 2014.
- [83] M. Katsura, F. Shoji, T. Okamoto, S. Shimamatsu, F. Hirai, G. Toyokawa, Y. Morodomi, T. Tagawa, Y. Oda, and Y. Maehara, "Correlation between CXCR4/CXCR7/CXCL12 chemokine axis expression and prognosis in lymph-node-positive lung cancer patients.," *Cancer Sci.*, vol. 109, no. 1, pp. 154–165, Jan. 2018.
- [84] M. Olbryt, "Role of tumor microenvironment in the formation and progression of skin melanoma," *Postepy Hig. Med. Dosw.*, vol. 67, pp. 413–432, May 2013.
- [85] J. L. Orgaz and V. Sanz-Moreno, "Emerging molecular targets in melanoma invasion and metastasis," *Pigment Cell Melanoma Res.*, vol. 26, no. 1, pp. 39–57, Jan. 2013.
- [86] S. M. Goldinger, C. Murer, P. Stieger, and R. Dummer, "Targeted therapy in melanoma - the

- role of BRAF, RAS and KIT mutations.," *EJC Suppl. EJC Off. J. EORTC, Eur. Organ. Res. Treat. Cancer.. [et al.]*, vol. 11, no. 2, pp. 92–6, Sep. 2013.
- [87] WHO, "Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 ECUADOR.," 2012.
- [88] A. Tang, M. S. Eller, M. Hara, M. Yaar, S. Hirohashi, and B. A. Gilchrest, "E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro.," *J. Cell Sci.*, vol. 107 ( Pt 4), pp. 983–92, Apr. 1994.
- [89] D. Ruitter, T. Bogenrieder, D. Elder, and M. Herlyn, "Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects.," *Lancet. Oncol.*, vol. 3, no. 1, pp. 35–43, Jan. 2002.
- [90] E. A. Seftor, K. M. Brown, L. Chin, D. A. Kirschmann, W. W. Wheaton, A. Protopopov, B. Feng, Y. Balagurunathan, J. M. Trent, B. J. Nickoloff, R. E. B. Seftor, and M. J. C. Hendrix, "Epigenetic transdifferentiation of normal melanocytes by a metastatic melanoma microenvironment.," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 22, pp. 10164–9, Nov. 2005.
- [91] N. Cireap and D. Narita, "Molecular profiling of ADAM12 and ADAM17 genes in human malignant melanoma.," *Pathol. Oncol. Res.*, vol. 19, no. 4, pp. 755–62, Oct. 2013.
- [92] R. Gangemi, A. Amaro, A. Gino, G. Barisione, M. Fabbi, U. Pfeffer, A. Brizzolara, P. Queirolo, S. Salvi, S. Boccardo, M. Gualco, F. Spagnolo, M. J. Jager, C. Mosci, A. Rossello, and S. Ferrini, "ADAM10 correlates with uveal melanoma metastasis and promotes in vitro invasion.," *Pigment Cell Melanoma Res.*, vol. 27, no. 6, pp. 1138–1148, Nov. 2014.
- [93] E. Schlecker, N. Fiegler, A. Arnold, P. Altevogt, S. Rose-John, G. Moldenhauer, A. Sucker, A. Paschen, E. P. von Strandmann, S. Textor, and A. Cerwenka, "Metalloprotease-Mediated Tumor Cell Shedding of B7-H6, the Ligand of the Natural Killer Cell-Activating Receptor NKp30.," *Cancer Res.*, vol. 74, no. 13, pp. 3429–3440, Jul. 2014.
- [94] E. G. Elias, J. H. Hasskamp, and B. K. Sharma, "Cytokines and Growth Factors Expressed by Human Cutaneous Melanoma.," *Cancers (Basel)*, vol. 2, no. 2, pp. 794–808, May 2010.
- [95] U. Rodeck and M. Herlyn, "Growth factors in melanoma.," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 10, no. 2, pp. 89–101, Jun. 1991.
- [96] A. Thies, M. Schachner, I. Moll, J. Berger, H.-J. Schulze, G. Brunner, and U. Schumacher, "Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma.," *Eur. J. Cancer*, vol. 38, no. 13, pp. 1708–16, Sep. 2002.
- [97] E. B. Voura, R. A. Ramjeesingh, A. M. Montgomery, and C. H. Siu, "Involvement of integrin alpha(v)beta(3) and cell adhesion molecule L1 in transendothelial migration of melanoma cells.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 12, no. 9, pp. 2699–710, Sep. 2001.
- [98] L. C. L. T. van Kempen, J. J. van den Oord, G. N. P. van Muijen, U. H. Weidle, H. P. J. Bloemers, and G. W. M. Swart, "Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin.," *Am J Pathol*, vol. 156, no. 3, Mar. 2000.
- [99] P. G. Natali, C. V Hamby, B. Felding-Habermann, B. Liang, M. R. Nicotra, F. Di Filippo, D. Giannarelli, M. Temponi, and S. Ferrone, "Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions.," *Cancer Res.*, vol. 57, no. 8, pp. 1554–60, Apr. 1997.
- [100] J. C. Becker, C. Termeer, R. E. Schmidt, and E. B. Bröcker, "Soluble intercellular adhesion molecule-1 inhibits MHC-restricted specific T cell/tumor interaction.," *J. Immunol.*, vol. 151, no. 12, pp. 7224–32, Dec. 1993.
- [101] A. Hamai, F. Meslin, H. Benlalam, A. Jalil, M. Mehrpour, F. Faure, Y. Lecluse, P. Vielh, M. F. Avril, C. Robert, and S. Chouaib, "ICAM-1 has a critical role in the regulation of metastatic melanoma tumor susceptibility to CTL lysis by interfering with PI3K/AKT pathway.," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 23, pp. 9854–9864, 2008.
- [102] H. Szymańska, "Genetycznie zmodyfikowane myszy jako modele do badań w onkologii.," *Postpy Hig. i Med. doświadczalnej*, vol. 61, pp. 639–645, 2007.
- [103] K. S. Ho, P. C. Poon, S. C. Owen, and M. S. Shoichet, "Blood vessel hyperpermeability and

- pathophysiology in human tumour xenograft models of breast cancer: a comparison of ectopic and orthotopic tumours," *BMC Cancer*, vol. 12, no. 1, p. 579, Dec. 2012.
- [104] A. K. Wege, "Humanized Mouse Models for the Preclinical Assessment of Cancer Immunotherapy," *BioDrugs*, vol. 32, no. 3, pp. 245–266, Jun. 2018.
- [105] S. J. Jackson and G. J. Thomas, "Human tissue models in cancer research: looking beyond the mouse," *Dis. Model. Mech.*, vol. 10, no. 8, pp. 939–942, Aug. 2017.
- [106] D.-J. Cheon and S. Orsulic, "Mouse Models of Cancer," *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, vol. 6, no. 1, pp. 95–119, Feb. 2011.
- [107] N. C. Walsh, L. L. Kenney, S. Jangalwe, K.-E. Aryee, D. L. Greiner, M. A. Brehm, and L. D. Shultz, "Humanized Mouse Models of Clinical Disease.," *Annu. Rev. Pathol.*, vol. 12, pp. 187–215, Jan. 2017.
- [108] K. Szade, M. Zukowska, A. Szade, G. Collet, D. Kloska, C. Kieda, A. Jozkowicz, and J. Dulak, "Spheroid-plug model as a tool to study tumor development, angiogenesis, and heterogeneity in vivo," *Tumor Biol.*, vol. 37, no. 2, pp. 2481–2496, Feb. 2016.
- [109] K. Klimkiewicz, K. Weglarczyk, G. Collet, M. Paprocka, A. Guichard, M. Sarna, A. Jozkowicz, J. Dulak, T. Sarna, C. Grillon, and C. Kieda, "A 3D model of tumour angiogenic microenvironment to monitor hypoxia effects on cell interactions and cancer stem cell selection," *Cancer Lett.*, vol. 396, pp. 10–20, Jun. 2017.
- [110] C. Santoriello and L. I. Zon, "Hooked! Modeling human disease in zebrafish.," *J. Clin. Invest.*, vol. 122, no. 7, pp. 2337–43, Jul. 2012.
- [111] K. Dooley and L. I. Zon, "Zebrafish: a model system for the study of human disease.," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 10, no. 3, pp. 252–6, Jun. 2000.
- [112] G. J. Lieschke and P. D. Currie, "Animal models of human disease: zebrafish swim into view.," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 8, no. 5, pp. 353–67, May 2007.
- [113] R. White, K. Rose, and L. Zon, "Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, no. 9, pp. 624–36, Sep. 2013.
- [114] I. J. Marques, F. U. Weiss, D. H. Vlecken, C. Nitsche, J. Bakkers, A. K. Lagendijk, L. I. Partecke, C.-D. Heidecke, M. M. Lerch, and C. P. Bagowski, "Metastatic behaviour of primary human tumours in a zebrafish xenotransplantation model," vol. 9, no. 1, p. 128, 2009.
- [115] C. Tobia, G. Gariano, G. De Sena, and M. Presta, "Zebrafish embryo as a tool to study tumor/endothelial cell cross-talk," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1832, no. 9, pp. 1371–1377, Sep. 2013.
- [116] C. J. Ceol, Y. Houvras, R. M. White, and L. I. Zon, "Melanoma biology and the promise of zebrafish.," *Zebrafish*, vol. 5, no. 4, pp. 247–55, Dec. 2008.
- [117] S. F. Schoppmann, A. Soleiman, R. Kalt, Y. Okubo, C. Benisch, U. Nagavarapu, and et.all, "Telomerase-Immortalized Lymphatic and Blood Vessel Endothelial Cells are Functionally Stable and Retain Their Lineage Specificity," *Microcirculation*, vol. 11, no. 3, pp. 261–269, Jan. 2004.
- [118] K. J. Wiechelman, R. D. Braun, and J. D. Fitzpatrick, "Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation," *Anal. Biochem.*, vol. 175, no. 1, pp. 231–237, Nov. 1988.
- [119] T. Mahmood and P.-C. Yang, "Western blot: technique, theory, and trouble shooting.," *N. Am. J. Med. Sci.*, vol. 4, no. 9, pp. 429–34, Sep. 2012.
- [120] C. Welinder and L. Ekblad, "Coomassie Staining as Loading Control in Western Blot Analysis," *J. Proteome Res.*, vol. 10, no. 3, pp. 1416–1419, Mar. 2011.
- [121] P. Chomczynski and N. Sacchi, "The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on," *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 2, pp. 581–585, Jul. 2006.
- [122] J. E. (Julio E.. Celis, *Cell biology : a laboratory handbook*, 3th editio. Elsevier Academic, 2006.
- [123] abcam, "Cell cycle analysis with flow cytometry & propidium iodide | Abcam." [Online]. Available: <https://www.abcam.com/protocols/flow-cytometric-analysis-of-cell-cycle-with->

propidium-iodide-dna-staining. [Accessed: 28-Jul-2018].

- [124] D. H. Pluznik and L. Sachs, "The induction of clones of normal mast cells by a substance from conditioned medium.," *Exp. Cell Res.*, vol. 43, no. 3, pp. 553–63, Oct. 1966.
- [125] C.-C. Liang, A. Y. Park, and J.-L. Guan, "In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro," *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 2, pp. 329–333, Feb. 2007.
- [126] H. Chen and J. Nalbantoglu, "Ring cell migration assay identifies distinct effects of extracellular matrix proteins on cancer cell migration.," *BMC Res. Notes*, vol. 7, p. 183, Mar. 2014.
- [127] T. Korff and H. G. Augustin, "Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation.," *J. Cell Biol.*, vol. 143, no. 5, pp. 1341–52, Nov. 1998.
- [128] "Flow Cytometry Protocol for Staining Membrane-associated Proteins in Suspended Cells: R&D Systems." [Online]. Available: <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/flow-cytometry-protocol-staining-membrane-associated-proteins-suspended-cells>. [Accessed: 28-Jul-2018].
- [129] "Cell Biology Protocols." [Online]. Available: <http://www.sciencegateway.org/protocols/cellbio/antibody/elisa.htm>. [Accessed: 28-Jul-2018].
- [130] M. Westerfield, "The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 5th Edition," *Univ. Oregon Press. Eugene*, 2007.
- [131] J. B. Henry, *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, Volume 1*, 16th edition. Saunders, 1979.
- [132] T. Masek, V. Vopalensky, P. Suchomelova, and M. Pospisek, "Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels," *Anal. Biochem.*, vol. 336, no. 1, pp. 46–50, Jan. 2005.
- [133] A. J. Bridge, S. Pebernard, A. Ducraux, A.-L. Nicoulaz, and R. Iggo, "Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells.," *Nat. Genet.*, vol. 34, no. 3, pp. 263–264, Jul. 2003.
- [134] N. Morral and S. R. Witting, "ShRNA-induced interferon-stimulated gene analysis," *Methods Mol. Biol.*, vol. 820, pp. 163–177, 2012.
- [135] R. Kenworthy, D. Lambert, F. Yang, N. Wang, Z. Chen, H. Zhu, F. Zhu, C. Liu, K. Li, and H. Tang, "Short-hairpin RNAs delivered by lentiviral vector transduction trigger RIG-I-mediated IFN activation.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. 19, pp. 6587–99, Oct. 2009.
- [136] G. M. Nelson, T. P. Padera, I. Garkavtsev, T. Shioda, and R. K. Jain, "Differential gene expression of primary cultured lymphatic and blood vascular endothelial cells.," *Neoplasia*, vol. 9, no. 12, pp. 1038–45, Dec. 2007.
- [137] R. Mężyk-Kopeć, B. Wyroba, K. Stalińska, T. Próchnicki, K. Wiatrowska, W. W. W. W. Kilarski, M. A. M. A. Swartz, and J. Bereta, "ADAM17 Promotes Motility, Invasion, and Sprouting of Lymphatic Endothelial Cells.," *PLoS One*, vol. 10, no. 7, p. e0132661, Jan. 2015.
- [138] Q. Xu, M. Ying, G. Chen, A. Lin, Y. Xie, N. Ohara, and D. Zhou, "ADAM17 is associated with EMMPRIN and predicts poor prognosis in patients with uterine cervical carcinoma.," *Tumour Biol.*, vol. 35, no. 8, pp. 7575–86, Aug. 2014.
- [139] M. Beck Gooz, E. N. Maldonado, Y. Dang, M. Y. Amria, S. Higashiyama, H. E. Abboud, J. J. Lemasters, and P. D. Bell, "ADAM17 promotes proliferation of collecting duct kidney epithelial cells through ERK activation and increased glycolysis in polycystic kidney disease," *AJP Ren. Physiol.*, vol. 307, no. 5, pp. F551–F559, Sep. 2014.
- [140] A. Staruschenko, "To cleave or not to cleave: role of ADAM17 in cell proliferation in PKD.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 307, no. 6, pp. F658–9, Sep. 2014.
- [141] C. R. Justus, N. Leffler, M. Ruiz-Echevarria, and L. V Yang, "In vitro cell migration and invasion assays.," *J. Vis. Exp.*, no. 88, Jun. 2014.
- [142] M. A. Miller, A. S. Meyer, M. T. Beste, Z. Lasisi, S. Reddy, K. W. Jeng, C.-H. Chen, J. Han, K. Isaacson, L. G. Griffith, and D. A. Lauffenburger, "ADAM-10 and -17 regulate endometriotic cell migration via concerted ligand and receptor shedding feedback on kinase signaling," *Proc.*

- Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 22, pp. E2074–E2083, 2013.
- [143] Y. Huang, N. Benaich, C. Tape, H. F. Kwok, and G. Murphy, “Targeting the Sheddase Activity of ADAM17 by an Anti-ADAM17 Antibody D1(A12) Inhibits Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Proliferation and Motility via Blockage of Bradykinin Induced HERs Transactivation,” *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 10, no. 7, pp. 702–714, 2014.
- [144] V. B. Mehta, G. E. Besner, V. B. Mehta, and G. E. Besner, “HB-EGF promotes angiogenesis in endothelial cells via PI3-kinase and MAPK signaling pathways,” *Growth Factors*, vol. 25, no. 4, pp. 253–263, Jan. 2007.
- [145] Y. Poumay and C. L. de Rouvroit, “HB-EGF, the Growth Factor that Accelerates Keratinocyte Migration, But Slows Proliferation,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 132, no. 9, pp. 2129–2130, Sep. 2012.
- [146] Y. Su and G. E. Besner, “Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) promotes cell migration and adhesion via focal adhesion kinase,” *J. Surg. Res.*, vol. 189, no. 2, pp. 222–231, Jun. 2014.
- [147] E. Nishi and M. Klagsbrun, “Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor (HB-EGF) is a Mediator of Multiple Physiological and Pathological Pathways,” *Growth Factors*, vol. 22, no. 4, pp. 253–260, Dec. 2004.
- [148] R. Edmondson, J. J. Broglie, A. F. Adcock, and L. Yang, “Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors,” *Assay Drug Dev. Technol.*, vol. 12, no. 4, pp. 207–18, May 2014.
- [149] C. Scavelli, E. Weber, M. Aglianò, T. Cirulli, B. Nico, A. Vacca, and D. Ribatti, “Lymphatics at the crossroads of angiogenesis and lymphangiogenesis,” *J. Anat.*, vol. 204, no. 6, pp. 433–49, Jun. 2004.
- [150] H. Lodsih, A. Berk, and S. Ziprusky, “Molecular Cell Biology. 4th edition. Section 22.1 Cell-Cell Adhesion and Communication,” *Molecular Cell Biology. 4th edition.*, vol. 29, no. 3. W. H. Freeman, pp. 126–128, 2000.
- [151] L. Lauden, J. Siewiera, W. Boukouaci, K. Ramgolam, S. Mourah, C. Lebbe, D. Charron, F. Aoudjit, N. Jabrane-Ferrat, and R. Al-Daccak, “TGF- $\beta$ -Induced (TGFBI) Protein in Melanoma: A Signature of High Metastatic Potential,” *J. Invest. Dermatol.*, Jan. 2014.
- [152] M. P. Ween, M. K. Oehler, and C. Ricciardelli, “Transforming Growth Factor-Beta-Induced Protein (TGFBI)/( $\beta$ ig-H3): A Matrix Protein with Dual Functions in Ovarian Cancer,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, no. 8, pp. 10461–77, Jan. 2012.
- [153] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular biology of the cell*. Garland Science, 2002.
- [154] B. Geiger, J. P. Spatz, and A. D. Bershadsky, “Environmental sensing through focal adhesions,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, no. 1, pp. 21–33, Jan. 2009.
- [155] M. G. Nievers, R. Q. Schaapveld, and A. Sonnenberg, “Biology and function of hemidesmosomes,” *Matrix Biol.*, vol. 18, no. 1, pp. 5–17, Feb. 1999.
- [156] M. Czyż, “Regulacja ekspresji integrzyn,” *Acta Haematol. Pol.*, vol. 31, no. 1, 2000.
- [157] C. J. Avraamides, B. Garmy-Susini, and J. A. Varner, “Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 8, no. 8, pp. 604–17, Aug. 2008.
- [158] Y. Takada, X. Ye, and S. Simon, “The integrins,” *Genome Biol.*, vol. 8, no. 5, p. 215, 2007.
- [159] M. Barczyk, S. Carracedo, and D. Gullberg, “Integrins,” *Cell Tissue Res.*, vol. 339, no. 1, pp. 269–80, Jan. 2010.
- [160] F. Schaffner, A. M. Ray, and M. Dontenwill, “Integrin  $\alpha 5\beta 1$ , the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors,” *Cancers (Basel)*, vol. 5, no. 1, pp. 27–47, Jan. 2013.
- [161] M. Civera, D. Arosio, F. Bonato, L. Manzoni, L. Pignataro, S. Zanella, C. Gennari, U. Piarulli, and L. Belvisi, “Investigating the Interaction of Cyclic RGD Peptidomimetics with  $\alpha V\beta 6$  Integrin by Biochemical and Molecular Docking Studies,” *Cancers (Basel)*, vol. 9, no. 10, Sep. 2017.

- [162] C. Fondevila, X. D. Shen, C. Moore, R. W. Busuttill, and A. J. Coito, "Cyclic RGD Peptides With High Affinity for  $\alpha 5\beta 1$  Integrin Protect Genetically Fat Zucker Rat Livers From Cold Ischemia/Reperfusion Injury," *Transplant. Proc.*, vol. 37, no. 4, pp. 1679–1681, May 2005.
- [163] M. Irigoyen, E. Ansó, E. Salvo, J. Dotor de las Herrerías, J. J. Martínez-Irujo, and A. Rouzaut, "TGFbeta-induced protein mediates lymphatic endothelial cell adhesion to the extracellular matrix under low oxygen conditions.," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 65, no. 14, pp. 2244–55, Jul. 2008.
- [164] S. Karaman and M. Detmar, "Mechanisms of lymphatic metastasis," *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 3, pp. 922–928, Mar. 2014.
- [165] J. Gille, R. A. Swerlick, and S. W. Caughman, "Transforming growth factor-alpha-induced transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) gene requires AP-2-dependent DNA binding and transactivation.," *EMBO J.*, vol. 16, no. 4, pp. 750–9, Feb. 1997.
- [166] S. Nicoli, D. Ribatti, F. Cotelli, and M. Presta, "Mammalian Tumor Xenografts Induce Neovascularization in Zebrafish Embryos," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 7, pp. 2927–2931, Apr. 2007.
- [167] K. Stoletov, V. Montel, R. D. Lester, S. L. Gonias, and R. Klemke, "High-resolution imaging of the dynamic tumor cell vascular interface in transparent zebrafish," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 44, pp. 17406–17411, Oct. 2007.
- [168] J. Tat, M. Liu, and X.-Y. Wen, "Zebrafish cancer and metastasis models for in vivo drug discovery," *Drug Discov. Today Technol.*, vol. 10, no. 1, pp. e83–e89, Mar. 2013.
- [169] C. Gabellini, E. Gómez-Abenza, S. Ibáñez-Molero, M. G. Tupone, A. B. Pérez-Oliva, S. de Oliveira, D. Del Bufalo, and V. Mulero, "Interleukin 8 mediates bcl-xL-induced enhancement of human melanoma cell dissemination and angiogenesis in a zebrafish xenograft model," *Int. J. Cancer*, vol. 142, no. 3, pp. 584–596, Feb. 2018.
- [170] M. Cataldi, C. Vigliotti, T. Mosca, M. Cammarota, and D. Capone, "Emerging Role of the Spleen in the Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies, Nanoparticles and Exosomes.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 6, Jun. 2017.
- [171] Y. LIU, C. WU, Y. WANG, S. WEN, J. WANG, Z. CHEN, Q. HE, and D. FENG, "MicroRNA-145 inhibits cell proliferation by directly targeting ADAM17 in hepatocellular carcinoma," *Oncol. Rep.*, vol. 32, no. 5, pp. 1923–1930, Nov. 2014.
- [172] X. Zheng, F. Jiang, M. Katakowski, Z. G. Zhang, Q. Lu, and M. Chopp, "ADAM17 promotes breast cancer cell malignant phenotype through EGFR-PI3K-AKT activation.," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 8, no. 11, pp. 1045–54, Jun. 2009.
- [173] K. Horiuchi, T. Kimura, T. Miyamoto, H. Takaishi, Y. Okada, Y. Toyama, and C. P. Blobel, "Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock.," *J. Immunol.*, vol. 179, no. 5, pp. 2686–9, Sep. 2007.
- [174] M. Elkin and I. Vlodavsky, "Tail Vein Assay of Cancer Metastasis," in *Current Protocols in Cell Biology*, vol. Chapter 19, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001, p. Unit 19.2.
- [175] W. H. Clark, D. E. Elder, D. Guerry, L. E. Braitman, B. J. Trock, D. Schultz, M. Synnestvedt, and A. C. Halpern, "Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 81, no. 24, pp. 1893–904, Dec. 1989.
- [176] C. G. Clemente, M. C. Mihm, R. Bufalino, S. Zurrida, P. Collini, and N. Cascinelli, "Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma," *Cancer*, vol. 77, no. 7, pp. 1303–1310, Apr. 1996.
- [177] L. Chatenoud, "Natural and Induced T CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells," in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 677, 2010, pp. 3–13.
- [178] N. H. Overgaard, J.-W. Jung, R. J. Steptoe, and J. W. Wells, "CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage?," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 97, no. 1, pp. 31–38, Jan. 2015.
- [179] P. Yu and Y.-X. Fu, "Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes?," *Lab. Invest.*, vol. 86, no. 3, pp. 231–245, Mar. 2006.
- [180] C. De Pascalis and S. Etienne-Manneville, "Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions," *Mol. Biol. Cell*, vol. 28, no. 14, pp. 1833–1846, Jul. 2017.

- [181] S. Hong, W. Hur, J. E. Choi, J.-H. Kim, D. Hwang, S. K. Yoon, S. Hong, W. Hur, J. E. Choi, J.-H. Kim, D. Hwang, S. K. Yoon, S. W. Hong, W. Hur, J. E. Choi, J.-H. Kim, D. Hwang, and S. K. Yoon, "Role of ADAM17 in invasion and migration of CD133-expressing liver cancer stem cells after irradiation," *Oncotarget*, vol. 7, no. 17, pp. 23482–23497, Apr. 2016.
- [182] B. Hu, X. Meng, Y. Zhang, M. Hossain, L. Wu, Y. Zhang, X. Peng, and X. Zhang, "Short hairpin RNA-mediated gene silencing of ADAM17 inhibits the growth of breast cancer MCF-7 cells in vitro and in vivo and its mechanism of action," *Oncol. Rep.*, vol. 39, no. 4, pp. 1640–1648, Jan. 2018.
- [183] N. Hedemann, C. Rogmans, S. Sebens, D. Wesch, M. Reichert, D. Schmidt-Arras, H.-H. Oberg, U. Pecks, M. van Mackelenbergh, J. Weimer, N. Arnold, N. Maass, D. O. Bauerschlag, N. Hedemann, C. Rogmans, S. Sebens, D. Wesch, M. Reichert, D. Schmidt-Arras, H.-H. Oberg, U. Pecks, M. van Mackelenbergh, J. Weimer, N. Arnold, N. Maass, D. O. Bauerschlag, N. Hedemann, C. Rogmans, S. Sebens, D. Wesch, M. Reichert, D. Schmidt-Arras, H.-H. Oberg, U. Pecks, M. van Mackelenbergh, J. Weimer, N. Arnold, N. Maass, and D. O. Bauerschlag, "ADAM17 inhibition enhances platinum efficiency in ovarian cancer," *Oncotarget*, vol. 9, no. 22, pp. 16043–16058, Mar. 2018.
- [184] J. Pruessmeyer, F. M. Hess, H. Alert, E. Groth, T. Pasqualon, N. Schwarz, S. Nyamoya, J. Kollert, E. van der Vorst, M. Donners, C. Martin, S. Uhlig, P. Saftig, D. Dreymueller, and A. Ludwig, "Leukocytes require ADAM10 but not ADAM17 for their migration and inflammatory recruitment into the alveolar space.," *Blood*, vol. 123, no. 26, pp. 4077–88, Jun. 2014.
- [185] K. J. Elliott, A. M. Bourne, T. Takayanagi, A. Takaguri, T. Kobayashi, K. Eguchi, and S. Eguchi, "ADAM17 silencing by adenovirus encoding miRNA-embedded siRNA revealed essential signal transduction by angiotensin II in vascular smooth muscle cells.," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 62, pp. 1–7, Sep. 2013.
- [186] T. Maretzky, A. Evers, W. Zhou, S. L. Swendeman, P.-M. Wong, S. Rafii, K. Reiss, and C. P. Blobel, "Migration of growth factor-stimulated epithelial and endothelial cells depends on EGFR transactivation by ADAM17.," *Nat. Commun.*, vol. 2, p. 229, 2011.
- [187] B. Liu, A. Ma, F. Zhang, Y. Wang, Z. Li, Q. Li, Z. Xu, and Y. Zheng, "MAZ mediates the cross-talk between CT-1 and NOTCH1 signaling during gliogenesis," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 21534, Aug. 2016.
- [188] C.-H. Heldin, M. Landström, and A. Moustakas, "Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition.," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 21, no. 2, pp. 166–76, Apr. 2009.
- [189] F. Balkwill, "Tumor necrosis factor or tumor promoting factor?," *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 13, no. 2, pp. 135–41, Apr. 2002.
- [190] P. A. Kenny and M. J. Bissell, "Targeting TACE-dependent EGFR ligand shedding in breast cancer.," *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 2, pp. 337–45, Feb. 2007.
- [191] A. Gschwind, S. Hart, O. M. Fischer, and A. Ullrich, "TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells.," *EMBO J.*, vol. 22, no. 10, pp. 2411–21, May 2003.
- [192] H. Lemjabbar, D. Li, M. Gallup, S. Sidhu, E. Drori, and C. Basbaum, "Tobacco smoke-induced lung cell proliferation mediated by tumor necrosis factor alpha-converting enzyme and amphiregulin.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 28, pp. 26202–7, Jul. 2003.
- [193] M. Jo, K. S. Thomas, D. M. O'Donnell, and S. L. Gonias, "Epidermal growth factor receptor-dependent and -independent cell-signaling pathways originating from the urokinase receptor.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 3, pp. 1642–6, Jan. 2003.
- [194] P. Bevan and C. Mala, "The role of uPA and uPA inhibitors in breast cancer," in *Breast Care*, 2008, vol. 3, no. SUPPL. 2, pp. 1–2.
- [195] A. Gschwind, S. Hart, O. M. Fischer, and A. Ullrich, "TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells.," *EMBO J.*, vol. 22, no. 10,

pp. 2411–21, May 2003.

- [196] J. Rios-Doria, D. Sabol, J. Chesebrough, D. Stewart, L. Xu, R. Tammali, L. Cheng, Q. Du, K. Schifferli, R. Rothstein, C. C. Leow, J. Heidbrink-Thompson, X. Jin, C. Gao, J. Friedman, B. Wilkinson, M. Damschroder, A. J. Pierce, R. E. Hollingsworth, D. A. Tice, and E. F. Michelotti, "A Monoclonal Antibody to ADAM17 Inhibits Tumor Growth by Inhibiting EGFR and Non-EGFR-Mediated Pathways.," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 14, no. 7, pp. 1637–49, Jul. 2015.
- [197] T. B. Davis, M. Yang, M. J. Schell, H. Wang, L. Ma, W. J. Pledger, and T. J. Yeatman, "PTPRS Regulates Colorectal Cancer RAS Pathway Activity by Inactivating Erk and Preventing Its Nuclear Translocation," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 9296, Dec. 2018.
- [198] J. Lu, X. Ye, F. Fan, L. Xia, R. Bhattacharya, S. Bellister, F. Tozzi, E. Sceusi, Y. Zhou, I. Tachibana, D. M. Maru, D. H. Hawke, J. Rak, S. A. Mani, P. Zweidler-McKay, and L. M. Ellis, "Endothelial cells promote the colorectal cancer stem cell phenotype through a soluble form of Jagged-1.," *Cancer Cell*, vol. 23, no. 2, pp. 171–85, Feb. 2013.
- [199] J. M. Sewell, J. F. Smyth, and S. P. Langdon, "Role of TGF alpha stimulation of the ERK, PI3 kinase and PLC gamma pathways in ovarian cancer growth and migration.," *Exp. Cell Res.*, vol. 304, no. 1, pp. 305–16, Mar. 2005.
- [200] R. O. Hynes, "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.," *Cell*, vol. 110, no. 6, pp. 673–87, Sep. 2002.
- [201] Y. Li, Z. Ren, Y. Wang, Y. Z. Dang, B. X. Meng, G. D. Wang, J. Zhang, J. Wu, and N. Wen, "ADAM17 promotes cell migration and invasion through the integrin  $\beta$ 1 pathway in hepatocellular carcinoma," *Experimental Cell Research*, 30-Jun-2018.
- [202] Y. Wang, Z. Huang, P. S. Nayak, B. D. Matthews, D. Warburton, W. Shi, and J. Sanchez-Esteban, "Strain-induced differentiation of fetal type II epithelial cells is mediated via the integrin  $\alpha$ 6 $\beta$ 1-ADAM17/tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme (TACE) signaling pathway.," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 35, pp. 25646–57, Aug. 2013.
- [203] M. Burkhardt, E. Mayordomo, K.-J. Winzer, F. Fritzsche, T. Gansukh, S. Pahl, W. Weichert, C. Denkert, H. Guski, M. Dietel, and G. Kristiansen, "Cytoplasmic overexpression of ALCAM is prognostic of disease progression in breast cancer.," *J. Clin. Pathol.*, vol. 59, no. 4, pp. 403–9, Apr. 2006.
- [204] M. Mao, X. Zheng, B. Jin, F. Zhang, L. Zhu, and L. Cui, "Effects of CD44 and E-cadherin overexpression on the proliferation, adhesion and invasion of ovarian cancer cells.," *Exp. Ther. Med.*, vol. 14, no. 6, pp. 5557–5563, Dec. 2017.
- [205] C. Schröder, I. Witzel, V. Müller, S. Krenkel, R. M. Wirtz, F. Jänicke, U. Schumacher, and K. Milde-Langosch, "Prognostic value of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression in breast cancer," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 137, no. 8, pp. 1193–1201, Aug. 2011.
- [206] M. Zhang, W. Luo, B. Huang, Z. Liu, L. Sun, Q. Zhang, X. Qiu, K. Xu, and E. Wang, "Overexpression of JAM-A in Non-Small Cell Lung Cancer Correlates with Tumor Progression," *PLoS One*, vol. 8, no. 11, p. e79173, Nov. 2013.
- [207] G. Pei, Y. Lan, D. Chen, L. Ji, and Z.-C. Hua, "FAK regulates E-cadherin expression via p-SrcY416/p-ERK1/2/p-Stat3Y705 and PPAR $\gamma$ /miR-125b/Stat3 signaling pathway in B16F10 melanoma cells.," *Oncotarget*, vol. 8, no. 8, pp. 13898–13908, Feb. 2017.
- [208] Y. Shi, R. Liu, S. Zhang, Y.-Y. Xia, H.-J. Yang, K. Guo, Q. Zeng, and Z.-W. Feng, "Neural cell adhesion molecule potentiates invasion and metastasis of melanoma cells through CAMP-dependent protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 43, no. 4, pp. 682–690, Apr. 2011.
- [209] J. M. Dunleavy, L. Xiao, J. Thompson, M. M. Kim, J. M. Shields, S. E. Shelton, D. M. Irvin, V. E. Brings, D. W. Ollila, R. A. Brekken, P. A. Dayton, J. M. Melero-Martin, and A. C. Dudley, "Vascular channels formed by subpopulations of PECAM1+ melanoma cells," *Nat. Commun.*, vol. 5, no. 1, p. 5200, Dec. 2014.
- [210] M. E. Mummert, D. I. Mummert, L. Ellinger, and A. Takashima, "Functional Roles of Hyaluronan in B16-F10 Melanoma Growth and Experimental Metastasis in Mice 1," 2003.

- [211] Y. Hou, M. Chu, F. F. Du, J. Y. Lei, Y. Chen, R. Y. Zhu, X. H. Gong, X. Ma, and J. Jin, "Recombinant disintegrin domain of ADAM15 inhibits the proliferation and migration of Bel-7402 cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 435, no. 4, pp. 640–645, Jun. 2013.
- [212] M. Elkin and I. Vlodaysky, "Tail Vein Assay of Cancer Metastasis," in *Current Protocols in Cell Biology*, vol. 12, no. 1, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001, p. 19.2.1-19.2.7.
- [213] J. J. Timmons, S. Cohessy, and E. T. Wong, "Injection of Syngeneic Murine Melanoma Cells to Determine Their Metastatic Potential in the Lungs.," *J. Vis. Exp.*, no. 111, 2016.
- [214] D. Ostroumov, N. Fekete-Drimusz, M. Saborowski, F. Kühnel, and N. Woller, "CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth.," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 75, no. 4, pp. 689–713, Feb. 2018.
- [215] W. H. Fridman, F. Pagès, C. Sautès-Fridman, and J. Galon, "The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 12, no. 4, pp. 298–306, Apr. 2012.
- [216] S. Vgenopoulou, A. C. Lazaris, C. Markopoulos, E. Boltetsou, V. Kyriakou, N. Kavantzias, E. Patsouris, and P. S. Davaris, "Immunohistochemical evaluation of immune response in invasive ductal breast cancer of not-otherwise-specified type.," *Breast*, vol. 12, no. 3, pp. 172–8, Jun. 2003.
- [217] A. Paschen, A. Sucker, B. Hill, I. Moll, M. Zapatka, X. D. Nguyen, G. C. Sim, I. Gutmann, J. Hassel, J. C. Becker, A. Steinle, D. Schadendorf, and S. Ugurel, "Differential clinical significance of individual NKG2D ligands in melanoma: soluble ULBP2 as an indicator of poor prognosis superior to S100B.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, no. 16, pp. 5208–15, Aug. 2009.
- [218] G. Liu, S. Lu, X. Wang, S. T. Page, C. S. Higano, S. R. Plymate, N. M. Greenberg, S. Sun, Z. Li, and J. D. Wu, "Perturbation of NK cell peripheral homeostasis accelerates prostate carcinoma metastasis," *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 10, pp. 4410–4422, Oct. 2013.
- [219] M. Kawaguchi, Y. Hozumi, and T. Suzuki, "ADAM protease inhibitors reduce melanogenesis by regulating PMEL17 processing in human melanocytes," *J. Dermatol. Sci.*, vol. 78, no. 2, pp. 133–142, May 2015.
- [220] A. A. Brożyna, W. Józwicki, J. A. Carlson, and A. T. Slominski, "Melanogenesis affects overall and disease-free survival in patients with stage III and IV melanoma.," *Hum. Pathol.*, vol. 44, no. 10, pp. 2071–4, Oct. 2013.
- [221] R. M. Slominski, M. A. Zmijewski, and A. T. Slominski, "The role of melanin pigment in melanoma.," *Exp. Dermatol.*, vol. 24, no. 4, pp. 258–9, Apr. 2015.
- [222] V. Caolo, G. Swennen, A. Chalaris, A. Wagenaar, S. Verbruggen, S. Rose-John, D. G. M. Molin, M. Vooijs, and M. J. Post, "ADAM10 and ADAM17 have opposite roles during sprouting angiogenesis," *Angiogenesis*, vol. 18, no. 1, pp. 13–22, Jan. 2015.
- [223] M. K. Schaafhausen, W.-J. Yang, L. Centanin, J. Wittbrodt, A. Bosserhoff, A. Fischer, M. Scharl, and S. Meierjohann, "Tumor angiogenesis is caused by single melanoma cells in a manner dependent on reactive oxygen species and NF-κB.," *J. Cell Sci.*, vol. 126, no. Pt 17, pp. 3862–72, Sep. 2013.
- [224] C. Zhao, H. Yang, H. Shi, X. Wang, X. Chen, Y. Yuan, S. Lin, and Y. Wei, "Distinct contributions of angiogenesis and vascular co-option during the initiation of primary microtumors and micrometastases," *Carcinogenesis*, vol. 32, no. 8, pp. 1143–1150, Aug. 2011.
- [225] J.-H. Yang, J. Hu, L. Wan, and L.-J. Chen, "Barbigerone inhibits tumor angiogenesis, growth and metastasis in melanoma.," *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, vol. 15, no. 1, pp. 167–74, 2014.
- [226] M. Haldi, C. Ton, W. L. Seng, and P. McGrath, "Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish," *Angiogenesis*, vol. 9, no. 3, pp. 139–151, Oct. 2006.
- [227] K. S. Moshal, K. F. Ferri-Lagneau, J. Haider, P. Pardhanani, and T. C. Leung, "Discriminating different cancer cells using a zebrafish in vivo assay," *Cancers (Basel)*, vol. 3, no. 4, pp. 4102–4113, Oct. 2011.
- [228] D. Li, X. P. Li, H. X. Wang, Q. Y. Shen, X. P. Li, L. Wen, X. J. Qin, Q. L. Jia, H. F. Kung, and Y. Peng, "VEGF induces angiogenesis in a zebrafish embryo glioma model established by

- transplantation of human glioma cells," *Oncol. Rep.*, vol. 28, no. 3, pp. 937–942, Sep. 2012.
- [229] Y.-B. Li, Z.-Q. Wang, X. Yan, M.-W. Chen, J.-L. Bao, G.-S. Wu, Z.-M. Ge, D.-M. Zhou, Y.-T. Wang, and R.-T. Li, "IC-4, a new irreversible EGFR inhibitor, exhibits prominent anti-tumor and anti-angiogenesis activities," *Cancer Lett.*, vol. 340, no. 1, pp. 88–96, Oct. 2013.
- [230] Y. Pan, M. Zheng, L. Zhong, J. Yang, S. Zhou, Y. Qin, R. Xiang, Y. Chen, and S.-Y. Yang, "A Preclinical Evaluation of SKLB261, a Multikinase Inhibitor of EGFR/Src/VEGFR2, as a Therapeutic Agent against Pancreatic Cancer," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 14, no. 2, pp. 407–418, Feb. 2015.
- [231] K. Naxerova, J. G. Reiter, E. Brachtel, J. K. Lennerz, M. van de Wetering, A. Rowan, T. Cai, H. Clevers, C. Swanton, M. A. Nowak, S. J. Elledge, and R. K. Jain, "Origins of lymphatic and distant metastases in human colorectal cancer.," *Science*, vol. 357, no. 6346, pp. 55–60, Jul. 2017.
- [232] N. Isaka, T. P. Padera, J. Hagendoorn, D. Fukumura, and R. K. Jain, "Peritumor lymphatics induced by vascular endothelial growth factor-C exhibit abnormal function.," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 13, pp. 4400–4, Jul. 2004.
- [233] S. Y. Wong, H. Haack, D. Crowley, M. Barry, R. T. Bronson, and R. O. Hynes, "Tumor-secreted vascular endothelial growth factor-C is necessary for prostate cancer lymphangiogenesis, but lymphangiogenesis is unnecessary for lymph node metastasis.," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 21, pp. 9789–98, Nov. 2005.
- [234] T. P. Padera, A. Kadambi, E. di Tomaso, C. M. Carreira, E. B. Brown, Y. Boucher, N. C. Choi, D. Mathisen, J. Wain, E. J. Mark, L. L. Munn, and R. K. Jain, "Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics.," *Science*, vol. 296, no. 5574, pp. 1883–6, Jun. 2002.
- [235] J. M. James, A. Nalbandian, and Y. Mukoyama, "TGF $\beta$  signaling is required for sprouting lymphangiogenesis during lymphatic network development in the skin.," *Development*, vol. 140, no. 18, pp. 3903–14, Sep. 2013.
- [236] A. M. Mercurio, I. Rabinovitz, and L. M. Shaw, "The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration.," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 13, no. 5, pp. 541–5, Oct. 2001.
- [237] M. Irigoyen, E. Ansó, E. Martínez, M. Garayoa, J. J. Martínez-Irujo, and A. Rouzaut, "Hypoxia alters the adhesive properties of lymphatic endothelial cells. A transcriptional and functional study," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1773, no. 6, pp. 880–890, Jun. 2007.
- [238] S. Yang, J. J. Zhang, and X.-Y. Huang, "Mouse models for tumor metastasis.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 928, pp. 221–8, 2012.
- [239] B.-H. Lee, J.-S. Bae, R.-W. Park, J.-E. Kim, J.-Y. Park, and I.-S. Kim, " $\beta$ ig-h3 triggers signaling pathways mediating adhesion and migration of vascular smooth muscle cells through  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin," *Exp. Mol. Med.*, vol. 38, no. 2, pp. 153–161, Apr. 2006.
- [240] C. Liu, P. Xu, S. Lamouille, J. Xu, and R. Derynck, "TACE-mediated ectodomain shedding of the type I TGF-beta receptor downregulates TGF-beta signaling.," *Mol. Cell*, vol. 35, no. 1, pp. 26–36, Jul. 2009.
- [241] S. Kumar, A. Das, and S. Sen, "Extracellular matrix density promotes EMT by weakening cell-cell adhesions.," *Mol. Biosyst.*, vol. 10, no. 4, pp. 838–50, Apr. 2014.
- [242] A. W. Lund, F. V. Duraes, S. Hirose, V. R. Raghavan, C. Nembrini, S. N. Thomas, A. Issa, S. Hugues, and M. A. Swartz, "VEGF-C Promotes Immune Tolerance in B16 Melanomas and Cross-Presentation of Tumor Antigen by Lymph Node Lymphatics," *Cell Rep.*, vol. 1, no. 3, pp. 191–199, Mar. 2012.
- [243] M. I. Harrell, B. M. Iritani, and A. Ruddell, "Tumor-induced sentinel lymph node lymphangiogenesis and increased lymph flow precede melanoma metastasis.," *Am. J. Pathol.*, vol. 170, no. 2, pp. 774–86, Feb. 2007.
- [244] G. Vidarsson, G. Dekkers, and T. Rispen, "IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions.," *Front. Immunol.*, vol. 5, p. 520, 2014.
- [245] M. Tabrizi, G. G. Bornstein, and H. Suria, "Biodistribution mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies in health and disease.," *AAPS J.*, vol. 12, no. 1, pp. 33–43, Mar. 2010.
- [246] H. F. Kwok, K. A. Botkjaer, C. J. Tape, Y. Huang, J. McCafferty, and G. Murphy, "Development

- of a 'mouse and human cross-reactive' affinity-matured exosite inhibitory human antibody specific to TACE (ADAM17) for cancer immunotherapy.," *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 27, no. 6, pp. 179–90, Jun. 2014.
- [247] J. Ye, S. M. Yuen, G. Murphy, R. Xie, and H. F. Kwok, "Anti-tumor effects of a 'human & mouse cross-reactive' anti-ADAM17 antibody in a pancreatic cancer model in vivo," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 110, pp. 62–69, Dec. 2017.
- [248] Q. Zhang, C. Wang, X. Han, G. Yang, Z. Ge, and G. Zhang, "Knockdown of ADAM17 inhibits cell proliferation and increases oxaliplatin sensitivity in HCT-8 colorectal cancer through EGFR-PI3K-AKT activation," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Jul. 2018.
- [249] Jacob et al, "Xenograftic tumor models.," in *Gene Therapy Molecular Biology*, vol. 8, 2004, pp. 213–219.