

## 7. Streszczenie

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

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

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

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

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

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

## 8. Abstract

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

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

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

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

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

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