

Characteristic of proteome of small extracellular vesicles isolated from melanoma patients plasma

Słowa kluczowe: czerniak, małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, marker prognostyczny, proteomika, wysokorozdzielcza spektrometria mas

Czerniak (melanoma) jest wysoce inwazyjnym nowotworem, którego częstość występowania wzrasta na całym świecie. Obecnie, uzupełnieniem pierwotnego leczenia chirurgicznego jest indywidualnie dobrane leczenie adjuwantowe inhibitorami immunologicznych punktów kontrolnych lub inhibitorami kinaz BRAF lub MEK. Czerniak ma jednak tendencję do wymykania się spod kontroli immunologicznej i rozwija oporność na terapię, co pozostaje głównym problemem terapeutycznym. Drugim problemem klinicznym jest brak markerów predykcyjnych umożliwiających przewidywanie, którzy chorzy na czerniaka odniosą najwyższy zysk z proponowanego leczenia, a którzy nie będą na nie wrażliwi.

Komórki czerniaka komunikują się z innymi komórkami obecnymi w mikrośrodku guza, w tym ze składnikami układu odpornościowego. Najnowsze dane wskazują, że w tej komunikacji pośredniczą małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (sEV) pochodzące z komórek czerniaka (MTEX). sEV są podzbiorem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych swobodnie krążących w płynach ustrojowych, które są wytwarzane i uwalniane przez wszystkie komórki ludzkiego ciała. W porównaniu z komórkami prawidłowymi, komórki nowotworowe wytwarzają więcej sEV ponieważ funkcjonują w warunkach permanentnego stresu (w środowisku niedotlenionym, kwaśnym i pozbawionym glukozy), a także podczas leczenia przeciwnowotworowego poddawane są działaniu toksycznych czynników fizycznych (radioterapia) lub chemicznych (chemioterapia). Zawartość molekularna MTEX obecnych w osoczu pacjentów przypomina zawartość komórek czerniaka, z których zostały uwolnione. Zatem skład molekularny MTEX może służyć jako surogat komórek czerniaka w osoczu. Takie podejście, zwane „płynną biopsją guza”, pozwala na diagnozowanie i nieinwazyjne monitorowanie progresji czerniaka lub odpowiedzi na terapię.

Osocze chorych na czerniaka zawiera heterogeniczną mieszaninę sEV, w skład której wchodzi MTEX, sEV pochodzące z tkanek ciała, w tym krążących we krwi komórek niezłośliwych jak komórki odpornościowe. W wyniku tej heterogeniczności, międzykomórkowa komunikacja za pośrednictwem sEV jest trudna do zrozumienia. Zakładamy, że selektywne przypisanie zawartości molekularnej sEV w osoczu do określonych podzbiorów sEV wytwarzanych przez komórki złośliwe i niezłośliwe poszerzy wiedzę o składzie i funkcjach MTEX. W konsekwencji, poprawi się zrozumienie mechanizmów determinujących odpowiedź czerniaka na terapię, a także mogą zostać zidentyfikowane nowe markery, które potencjalnie będą służyć jako predykcja takiej odpowiedzi.

Celem pracy doktorskiej było poznanie składu molekularnego małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z komórek czerniaka o fenotypie CSPG-4(+) oraz limfocytów o fenotypie CD3(+) izolowanych z osocza pacjentów z rozpoznaniem czerniaka oraz osób zdrowych.

W pierwszym etapie projektu doktorskiego zastosowano strategię wychwytu immunologicznego w celu oddzielenia sEV pochodzących z komórek nowotworowych (TEX) od innych podgrup sEV obecnych w osoczu pacjentów. Podejście to jest skuteczne tylko wtedy, gdy znane są specyficzne powierzchniowe antygeny nowotworowe oraz dostępne są przeciwciała specyficzne dla takiego antygenu. W moich badaniach do izolacji MTEX z osocza chorych zostało zastosowane przeciwciało anti-CSPG4 [Pietrowska i in., 2021] specyficznie rozpoznające antygen komórek czerniaka, który jest obecny także w błonach produkowanych przez nie sEV. W badaniach prezentowanych w niniejszej pracy doktorskiej wykorzystałam technikę wysokorozdzielczej spektrometrii mas sprzężonej z nano-chromatografią cieczową (nano-LC-MS/MS) jako narzędzie do oceny składu białkowego sEV. Porównano proteomy sEV podzielone na pochodzące z komórek czerniaka (MTEX) i pochodzące z komórek niezłośliwych (NMTEX), a analiza statystyczna zidentyfikowała związany z MTEX profil 16 białek, które odróżniały MTEX od NMTEX. Wśród 75 białek których poziom był podwyższony w MTEX największą moc odróżniania pacjentów z postępującym czerniakiem od pacjentów bez objawów choroby miało białko PDICD6IP (ang. programmed cell death 6-interacting protein). Pacjenci z progresją mieli podwyższony poziom PDICD6IP w MTEX. Odkrycie to zmotywowało nas do poszerzenia badań nad rolą białka PDICD6IP wykrytego w składzie MTEX obecnych w osoczu w regulacji immunologicznej i promowaniu progresji czerniaka (obecnie realizowany projekt OPUS).

Kontynuując wykorzystanie strategii wychwytu immunologicznego użyliśmy przeciwciał specyficznych dla antygenu CD3 wyrażanego tylko na komórkach TCR⁺ (T-cell receptor). Strategia ta pozwoliła na wyizolowanie z osocza sEV o fenotypie CD3(+), które są produktami limfocytów T, oraz o fenotypie CD3(-), które zawierają mieszaninę sEV wytwarzanych przez komórki inne niż T, w tym MTEX produkowane przez komórki czerniaka [Żebrowska i in., 2022]. W osoczu pacjentów chorych na czerniaka frakcja CD3(-) sEV zawiera MTEX i pozostałe sEV (non-TEX) w różnych, osobniczo-zmiennych proporcjach. Stosując powyższą strategię izolacji sEV z osocza chorych na czerniaka, wykazaliśmy, że możliwe jest selektywne wyizolowanie i ocena profilu białkowego sEV CD3(+), a następnie porównanie go z profilem wzbogaconych w MTEX pęcherzyków CD3(-).

Podsumowując, wykazaliśmy, że skład molekularny sEV pochodzących z komórek czerniaka i obecnych w osoczu odróżnia pacjentów z progresją od pacjentów ze stabilną chorobą nowotworową. Zastosowana technika badawcza pozwala na identyfikację białek, które potencjalnie mogą służyć jako markery prognostyczne w czerniaku. Ponadto stwierdziliśmy, że metoda wychwytywania sEV z wykorzystaniem przeciwciał jest skuteczna w badaniu składu molekularnego subpopulacji małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych obecnych w płynach ustrojowych.