

## Załączniki:

Streszczenie pracy doktorskiej z akceptacją promotora.

Czerniak złośliwy jest agresywnym nowotworem charakteryzującym się szybkim tempem wzrostu i wczesnym pojawianiem się przerzutów. Międzykomórkowy transfer bioaktywnych cząsteczek zachodzący za pośrednictwem mikropęcherzyków błonowych (EVs) jest jednym z czynników sprzyjających progresji nowotworu. Ektosomy, będące jedną z subpopulacji EVs, mogą przenosić kwasy nukleinowe, lipidy oraz białka. Zatem badania dotyczące identyfikacji składników cargo ektosomów uwalnianych przez komórki czerniaka oraz wpływu wywieranego przez nie na komórki docelowe mogą przyczynić się do lepszego poznania molekularnych mechanizmów progresji czerniaka.

Celem niniejszej pracy było wykonanie pierwszej proteomicznej i glikomicznej analizy białkowego cargo ektosomów uwalnianych przez cztery linie komórkowe czerniaka skóry (wyprowadzone ze zmian pierwotnych: WM115 i WM793, oraz metastatycznych: WM266-4 i WM1205Lu) oraz linię komórkową czerniaka gałki ocznej (Mel202). Ektosomy wyizolowano z kondycjonowanych pożywek metodą wirowania różnicowego. Następnie, stosując chromatografię cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS), zidentyfikowano w poszczególnych próbkach od 936 do 1055 białek. Ektosomy były nośnikami wspólnego zbioru białek, głównie błonowych i cytoplazmatycznych, co wynika z mechanizmu ich biogenezy, a także białek charakterystycznych (różnicujących) dla poszczególnych linii komórkowych czerniaka. Wśród zidentyfikowanych białek obecne były te o udokumentowanej roli w inwazji i migracji komórek nowotworowych, angiogenezie oraz tworzeniu niszy premetastatycznej, jak również białka antyapoptotyczne, modulujące odpowiedź immunologiczną czy odpowiedzialne za oporność wielolekową. W testach funkcjonalnych (test żywotności Alamar Blue i test gojenia ran) obecność ektosomów stymulowała proliferację i promowała migrację docelowych komórek, a efekt ten zależny był od dawki białek ektosomalnych.

Stosując lektynoblotting wykazano wzbogacenie ektosomów w *N*-glikany posiadające przedzielające cząsteczki GlcNAc, reszty fukozy oraz  $\alpha$ 2,6-wiązane kwasy sialowe, a preferencyjna inkorporacja tych struktur wskazuje na ich rolę podczas sortowania białek do ektosomów. Na powierzchni ektosomów stwierdzono wysoką ekspresję  $\beta$ 1,6-rozgałęzionych *N*-glikanów typu kompleksowego, przedzielającej GlcNAc, a także  $\alpha$ 2,6-wiązanych kwasów sialowych. Niemniej jednak procent ektosomów wykazujących powierzchniową ekspresję wybranych epitopów cukrowych był niższy niż w przypadku uwalniających je komórek czerniaka.

Uzyskane wyniki dostarczyły wstępnych informacji na temat roli wybranych białek i struktur cukrowych w biologii ektosomów (biogenezie, sortowaniu białek oraz interakcjach z komórkami docelowymi) oraz funkcjonalnego wpływu ektosomów na komórki nowotworowe. W ektosomalnym cargo zidentyfikowano również potencjalne markery czerniaka, a możliwość ich wykorzystania w praktyce klinicznej powinna stać przedmiotem przyszłych badań.

Susanna Skrzypczak

Mieczysław Przekoś