

STRESZCZENIE

Limfangioleiomiomatoza płucna (LAM) jest rzadką chorobą śródmiąższową płuc występującą prawie wyłącznie u kobiet. Charakteryzuje się nadmierną proliferacją komórek LAM w płucach, wokół oskrzeli, naczyń krwionośnych i limfatycznych, co prowadzi do przebudowy i degeneracji tkanki płucnej, pogorszenia się funkcjonalności płuc, a z czasem do śmierci. Występowanie tej choroby spowodowane jest przez mutację w jednym z genów supresorowych Tuberous Sclerosis Complex *TSC1* lub *TSC2*. Dysfunkcja kompleksu *TSC1-TSC2* prowadzi do stałej aktywacji szlaku mTOR w komórkach LAM i ich nadmiernej proliferacji. Limfangioleiomiomatoza może występować w sporadycznej formie (S-LAM), spowodowanej przez utratę heterozygotyczności, najczęściej w genie *TSC2* i klonalną ekspansję komórek LAM lub występować w przebiegu stwardnienia guzowego (*Tuberous Sclerosis Complex, TSC*) (TSC-LAM), spowodowanego przez mutację dziedziczną w jednym z genów *TSC*. Komórki LAM są heterogenną populacją komórek, których kształt, morfologia i wzór ekspresjonowanych przez nie antygenów może różnić się w zależności od mikrośrodowiska, ekspozycji na cytokiny i czynniki wzrostu oraz interakcji z innymi komórkami. Komórki LAM wykazują zarówno fenotyp mięśni gładkich (np. ekspresja aktyny mięśni gładkich, α -SMA), jak również ekspresję antygenów charakterystycznych dla komórek melanocytarnych (np. immunoreaktywność z przeciwciałem HMB-45). Ponadto komórki LAM wykazują ekspresję receptorów dla estrogenu (ER) i progesteronu (PR), licznych chemokin i ich receptorów, jak również szeregu metaloproteinaz. Ekspresja wymienionych czynników przez komórki LAM wpływa na ich zdolność do migracji, przerzutowania oraz interakcji z komórkami podścieliska. Do tej pory otrzymano kilka zwierzęcych i ludzkich linii komórkowych, których niektóre cechy odpowiadają fenotypowi komórek LAM, jednakże nadal brak jest użytecznego, komercyjnie dostępnego modelu LAM *in vitro*. Dlatego też, niezbędne są dalsze badania nad biologią tych komórek, co mogłoby pomóc w stworzeniu odpowiedniego modelu badawczego. (*Folia Histochem Cytobiol* 2013).

Opracowanie użytecznego modelu badawczego LAM *in vitro* dostarczyłoby cennego narzędzia w dalszych badaniach nad patomechanizmem tej choroby. Ponadto aktywacja szlaku mTOR występuje również w innych typach nowotworów, a więc taki model badawczy mógłby znaleźć zastosowanie w badaniach nad nowymi rozwiązaniami terapeutycznymi nie tylko w LAM, ale także w innych chorobach nowotworowych. Celem przedstawionej pracy było otrzymanie i charakterystyka linii komórkowej wyprowadzonej z płynu opłucnowego 42-letniej pacjentki ze sporadyczną postacią LAM. Linia komórkowa S-LAM1 została

scharakteryzowana przy użyciu metody immunofluorescencyjnej, cytometrii przepływowej i *image stream system*. Ultrastruktura tych komórek została oceniona przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM). W celu zbadania potencjału komórek S-LAM1 do migracji i przerzutowania, wykonana została analiza 84 genów związanych z ruchliwością komórki, z zastosowaniem metody real-time PCR array. W kolejnym etapie zbadano wpływ rapamycyny, naturalnego inhibitora szlaku mTOR na proliferację linii komórkowej S-LAM1. Komórki S-LAM1 wykazywały cechy charakterystyczne dla fenotypu komórek mięśni gładkich (obecność pośrednich filamentów aktynowych, ekspresja α -SMA), komórek czerniaka (obecność premelanosomów, immunoreaktywność z przeciwciałem HMB-45) oraz komórek śródbłonka limfatycznego (ekspresja podoplaniny). Ponadto w komórkach S-LAM1 wykazano ekspresję markerów mezenchymalnych (CD105, CD29, CD90) co może sugerować ich pochodzenie z mezenchymalnych komórek macierzystych rezydujących w płucach. Określony wzór ekspresji genów, w szczególności wysoka ekspresja EZR, MYH10 i MYLK, a jednocześnie mocno obniżona ekspresja SVIL w porównaniu do kontroli wskazuje na wysoki potencjał komórek S-LAM1 do migracji, a tym samym do przerzutowania. Rapamycyna znacząco, aczkolwiek tylko częściowo hamowała proliferację komórek S-LAM1 *in vitro*, co sugeruje, że w przyszłości warto byłoby rozważyć jej zastosowanie w połączeniu z innymi lekami. (*Anticancer Res 2015*)

„Złotym standardem” w diagnostyce limfangioleiomiomatozy płucnej jest reakcja immunohistochemiczna przeprowadzona na materiale otrzymanym w trakcie biopsji płuca, z użyciem przeciwciała HMB-45. Jednakże nie wszystkie komórki LAM w guzie wykazują immunoreaktywność z przeciwciałem HMB-45, a niektóre, rzadkie przypadki LAM opisano jako HMB-45 negatywne. Poza HMB-45 w immunohistochemicznej diagnostyce LAM najczęściej stosowanymi markerami są: α -SMA, ER oraz PR. Celem przedstawionej pracy była immunohistochemiczna ocena ekspresji antygenów standardowo stosowanych w diagnostyce LAM (HMB-45, receptor estrogenowy ER, receptor progesteronowy PR), jak również antygenów takich jak białka adhezji komórkowej (β -katenina, E-kadheryna), podoplanina (D2-40), marker proliferacji komórkowej (MCM3) oraz receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), które mogłyby znaleźć zastosowanie jako nowe narzędzie diagnostyczne w tej chorobie. Ponadto zbadano czy w komórkach LAM dochodzi do amplifikacji genu EGFR. Badania przeprowadzono na grupie 15 przypadków płucnej limfangioleiomiomatozy. Wszystkie przypadki zostały ocenione pod kątem zaawansowania histologicznego (*LAM Histology Score* - LHS) i na tej podstawie wyodrębniono dwie grupy: wczesny i zaawansowany LAM. Wykazano statystycznie wyższą ekspresję ER i EGFR

($p < 0,05$) w grupie z zaawansowanym LAM. W związku z powyższym ocena nasilenia ekspresji ER w LAM mogłaby pomóc w ocenie zaawansowania choroby. Podwyższona ekspresja EGFR nie była związana z amplifikacją genu EGFR, której nie wykazano w żadnym z badanych przypadków. Rola tego receptora w LAM niewątpliwie powinna być tematem dalszych badań nad patomechanizmem tej choroby. Specyficzna pozytywna reakcja IHC komórek LAM z przeciwciałami skierowanymi przeciw β -kateninie i E-kadherynie, sugeruje możliwość wykorzystania tych antygenów jako nowych markerów diagnostycznych w limfangioleiomiomatozie. Wykazano silną pozytywną korelację pomiędzy ekspresją HMB-45 a PR, ER i β -kateniną. Pozytywna reakcja IHC komórek LAM z przeciwciałem anti-D2-40 świadczy o posiadaniu przez nie, obok częściowego fenotypu komórek mięśni gładkich i melanocytów, również fenotypu śródbłonna limfatycznego. (*Anticancer Res 2015*).

Podsumowując, badania przedstawione w powyższych publikacjach zaowocowały opracowaniem modelu eksperymentalnego LAM w postaci linii komórkowej S-LAM1, odpowiadającej fenotypowo limfangioleiomiomatozie płucnej. Charakterystyka fenotypowa oraz analiza ekspresji genów, pozwoliły przybliżyć potencjalny mechanizm odpowiedzialny za potencjał metastatyczny komórek LAM. Analiza immunohistochemiczna 15 przypadków płucnej limfangioleiomiomatozy, umożliwiła wytypowanie markerów, które mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce LAM lub ocenie progresji choroby.

SUMMARY

Pulmonary lymphangiomyomatosis (LAM) is a rare interstitial lung disease which occurs almost exclusively in women. It is characterized by excessive proliferation of LAM cells in the lungs and around the bronchi, blood and lymph vessels, leading to the remodeling and degeneration of the lung tissue, the deterioration of the pulmonary function, and eventually to death. This disease is caused by a mutation in one of the tumor suppressor gene Tuberous Sclerosis Complex TSC1 or TSC2. Dysfunction of the TSC1-TSC2 complex results in a constant activation of the mTOR pathway and LAM cells hyper proliferation. Lymphangiomyomatosis may show off as a sporadic form (S-LAM) caused by loss of heterozygosity, usually in the TSC2 gene and the clonal expansion of LAM cells or may occur as a disease associated with Tuberous Sclerosis Complex (TSC-LAM), caused by an inherited mutation in one of the TSC genes. LAM cells are a heterogeneous cell population. Its shape, morphology and pattern of the expressed antigens vary depending on the microenvironment, exposure to cytokines and growth factors and interactions with other cells. LAM cells show both a smooth muscle phenotype (e.g. expression of smooth muscle actin, α -SMA) as well as expression of antigens specific for melanocytic cells (e.g. immunoreactivity with the HMB-45 antibody). Moreover, these cells express estrogen (ER) and progesterone receptor (PR), a number of chemokines and their receptors as well as a number of metalloproteinases. Expression of these factors by LAM cells affects their ability to migration, metastasis and interaction with stromal cells. Up to date several animal and human cell lines with the characteristic features of LAM have been derived, however, there is still no useful and commercially available LAM model *in vitro*. Therefore, more investigation on the biology of LAM cells is necessary to create an appropriate and useful experimental model. (*Folia Histochem Cytobiol* 2013).

The development of a useful experimental model LAM *in vitro* would provide a valuable tool for further research on the pathomechanism of this disease. Furthermore, activation of the mTOR pathway is also present in other types of cancer, therefore this experimental model could be used in investigation on new therapeutic solutions, not only in LAM, but also in other types of tumor. The aim of this study was to obtain and to characterize a cell line derived from chylous effusion of 42-year-old patient with sporadic LAM. S-LAM1 cells were characterized using immunofluorescence assay, flow cytometry, and image stream system. The ultrastructure of these cells was evaluated using a transmission electron microscope (TEM). In order to explore S-LAM1 cells' migration and metastasis ability, real-time PCR array analysis of 84 genes associated with cell motility has been performed. On the

next step, the effect of rapamycin, a natural inhibitor of the mTOR pathway, on S-LAM1 proliferation has been investigated. S-LAM1 cells show phenotype characteristic for smooth muscle cell (presence of actin filaments, expression of α -SMA), melanoma cells (premelanosomes, immunoreactivity with HMB-45 antibody) and lymphatic endothelial cells (expression of podoplanin). Furthermore, S-LAM1 cells demonstrated expression of mesenchymal markers (CD105, CD29, CD90) which may suggest that origin of the LAM cells are the mesenchymal stem cells residing in the lungs. A specific pattern of gene expression, in particular high expression of EZR, MYH10 and MYLK while strongly reduced expression of SVIL compared to control indicates a high ability of S- LAM1 cell to migration and thus metastasis. Rapamycin significantly, however only partially, inhibited the proliferation of S- LAM1 *in vitro*. It suggests that in the future it would be worthwhile to consider its use in combination with other drugs. (*Anticancer Res 2015*).

The "Gold standard" in the pulmonary lymphangioliomyomatosis diagnostics is immunohistochemical reaction with HMB-45 antibody carried out on the material obtained during lung biopsy. However, not all of LAM cells in the tumor show immunoreactivity with the HMB-45 antibody and some rare cases of LAM which were HMB-45 negative have been described. Other markers commonly used in LAM diagnostics are: α -SMA, ER and PR. The aim of this study was the immunohistochemical evaluation of the expression of antigens normally used for diagnosis of LAM (HMB-45, ER estrogen receptor, progesterone receptor PR) and antigens such as cell adhesion proteins (β -catenin, E-cadherin), podoplanin (D2-40), marker of cell proliferation (MCM3) and epidermal growth factor receptor (EGFR), which could be used as a new diagnostic tool for this disease. Moreover, it was examined whether amplification of the EGFR gene occurs in LAM cells. The study was conducted on 15 cases of pulmonary lymphangioliomyomatosis. All cases were assessed for histological severity (LAM Histologic Score - LHS) and, based on that, divided into two groups: early and advanced stages of LAM. Due to the fact that significant increased expression of ER and EGFR ($p < 0.05$) has been shown in patients with advanced LAM, we assume that the evaluation of the ER expression could be helpful in the disease severity assessment. Increased EGFR expression was not associated with EGFR gene amplification, which was not seen in any of the examined cases. The role of this receptor in LAM pathomechanism should be further investigated. A specific positive immunohistochemical reaction of LAM cells with anti- β -catenin and anti-E-cadherin antibodies suggests that these antigens may be used as new diagnostic markers in lymphangioliomyomatosis. Strong positive correlation between the expression of HMB-45 and PR, ER as well as β -catenin has been shown. IHC positive

reaction of LAM cells with anti-D2-40 antibody proves that LAM cells have also lymphatic endothelial cell phenotype next to the smooth muscle cells and melanocytes differentiation. (*Anticancer Res 2015*).

In conclusion, research presented in this thesis resulted in the development of an experimental model of LAM, S-LAM1 cell line with phenotype characteristic for pulmonary lymphangioliomyomatosis. Phenotypic characterization and analysis of gene expression, showed one of possible mechanisms that can be responsible for the metastatic capability of LAM cells. Immunohistochemical analysis conducted on 15 cases of pulmonary LAM resulted in selection of new markers that can be used in LAM diagnostics or evaluation of disease progression.