

**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY**



Szymon Macioszek

**Poszukiwanie zależności pomiędzy składem metabolicznym tkanki
a farmakoterapią nowotworu podścieliskowego przewodu
pokarmowego na przykładzie modelu mysiego**

A study of the relationship between gastrointestinal stromal tumour metabolic profile
and anticancer therapy in a mouse model

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Biofarmacji i Farmakokinetyki
Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotorzy pracy:

prof. dr. Agnieszka Wozniak
Laboratory of Experimental Oncology
Department of Oncology
KU Leuven, Belgium

prof. dr hab. Michał J. Markuszewski
Zakład Biofarmacji i Farmakokinetyki
Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki
Gdański Uniwersytet Medyczny

GDAŃSK 2023

3. Streszczenie

Nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego (ang. *gastrointestinal stromal tumour*, GIST) diagnozowane są rokrocznie u ok. 10 chorych w przeliczeniu na 100 000 osób na świecie. Pomimo postępu w opracowywaniu terapii przeciwnowotworowych i rejestracji nowych leków, leczenie GIST wciąż stanowi wyzwanie i często nie przynosi zadowalających rezultatów. Wrażliwość guza na standardowe leczenie jest warunkowana przez rodzaj mutacji w genie *KIT* lub *PDGFRA*, które są bezpośrednią przyczyną rozwoju tego typu nowotworu. Głównym celem pracy doktorskiej było oznaczenie metabolitów obecnych w tkance GIST z różnymi mutacjami w genie *KIT* oraz poznanie zmian zachodzących na poziomie metabolitów pod wpływem imatynibu, będącego lekiem pierwszego wyboru dla pacjentów z GIST. Badania przeprowadzono na modelu mysim ksenograftu ludzkiego, który wiernie odzwierciedla histopatologiczną i molekularną charakterystykę nowotworu w organizmie człowieka.

Pierwszym krokiem podjętym w kierunku osiągnięcia celu był wybór odpowiedniej metody przygotowania tkanki GIST do niecelowanej analizy metabolomicznej, której założeniem jest oznaczenie jak największej liczby metabolitów w matrycy biologicznej. Zastosowaną techniką analityczną była chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas z analizatorem czasu przelotu (ang. *liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry*, LC-TOF/MS). Na podstawie literatury, zaproponowano cztery metody ekstrakcji, które zostały przetestowane na próbkach GIST. Kryterium wyboru najbardziej odpowiedniej metody była liczba wyekstrahowanych metabolitów oraz powtarzalność procedury. Wyselekcjonowana metoda obejmuje dwufazową ekstrakcję z zastosowaniem metanolu, eteru tert-butyloowo-metylowego (ang. *methyl tert-butyl ether*, MTBE) i wody. Zastosowanie chromatografii cieczowej w dwóch trybach: układzie faz odwróconych (ang. *reversed phase*, RP) oraz chromatografii oddziaływań hydrofilowych (ang. *hydrophilic interaction liquid chromatography*, HILIC) pozwoliło na oznaczenie szerokiego zakresu metabolitów – od związków silnie niepolarnych, jak lipidy (m.in. kwasy tłuszczowe, glicerolipidy, sterole), po cząsteczki bardziej polarne, takie jak aminokwasy, węglowodany, kwasy organiczne.

W kolejnym eksperymencie zweryfikowano, na przykładzie modelu z jedną z mutacji *KIT*, potencjał integracji wyników analizy metabolomicznej

i transkryptomocnej w celu dokładniejszego wyjaśnienia procesów zachodzących w komórkach nowotworowych pod wpływem działania imatynibu. Dzięki analizie próbek techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (ang. *gas chromatography coupled to mass spectrometry*, GC-MS) wykazano wpływ imatynibu na zmniejszenie poziomu związków purynowych, pirymidynowych, kwasów tłuszczowych, aminokwasów, metabolitów ze szlaku kwasu masłowego. Z kolei zmienioną ekspresję zaobserwowano dla genów związanych z aktywnością kinaz, odpowiedzią układu immunologicznego, a także biosyntezą puryn. W guzach poddanych leczeniu zaobserwowano obniżony poziom metabolitów ze szlaku puryn: hipoksantyny, ksantyny, ksantozyny, kwasu moczowego. Puryny odgrywają kluczową rolę w funkcjonowaniu komórek, gdyż są składnikami DNA oraz pełnią funkcje energetyczne. W komórkach nowotworowych, które charakteryzuje intensywny wzrost i podział, zapotrzebowanie na związki purynowe zwiększa się. W związku z tym zaobserwowane w projekcie zmniejszenie stężenia puryn po leczeniu imatynibem może być częścią mechanizmu działania imatynibu, prowadzącym do ograniczenia rozwoju nowotworu.

Następnie, korzystając z opracowanej na wcześniejszym etapie badań procedury przygotowania próbek, przeprowadzono kompleksową analizę próbek GIST z czterema różnymi mutacjami w genie *KIT*. Wykazano, że największy wpływ na skład metabolomu komórek GIST ma typ mutacji. Zastosowane metody statystyczne wyłoniły również szereg metabolitów istotnie różnicujących guzy poddane działaniu leku i guzy kontrolne, natomiast różnice te były mniejsze niż pomiędzy poszczególnymi mutacjami. Dowiedziono zasadność zastosowania RP-LC-MS oraz GC-MS w prowadzeniu dalszych badań nad GIST.

Aby wyjaśnić problem ograniczonej wrażliwości guzów na leczenie, niezwykle istotny jest rozwój badań nad GIST. W niniejszej pracy doktorskiej zaproponowano metody przygotowania i analizy próbek GIST, które mogą służyć wykryciu zmian w metabolizmie tkanki nowotworowej w zależności od istniejącej mutacji lub zastosowanej terapii. Badania potwierdziły rolę znanych wcześniej szlaków, takich jak aktywność kinaz, jak też wykazały znaczenie innych procesów, np. metabolizmu puryn, pirymidyn, kwasów tłuszczowych w odpowiedzi na leczenie. Dalsze prace badawcze, z uwzględnieniem kolejnych mutacji i większej liczby próbek biologicznych, mogą potwierdzić, które szlaki metaboliczne odpowiadają za ograniczoną wrażliwość guza na terapię, a także posłużyć zdefiniowaniu nowych celów molekularnych.

4. Abstract

Gastrointestinal stromal tumours (GIST) are diagnosed annually in about 10 patients per 100,000 population worldwide. Despite the development of novel anticancer therapies, the treatment of GIST is still challenging, leading frequently to the emergence of tumour cell resistance. The tumour responsiveness to the first-line drug, imatinib, is determined by the type of mutation in the *KIT* gene, which is the direct cause of the development of GIST. The primary purpose of the doctoral thesis was to determine the metabolite composition of GIST tissue with various mutational status and elucidate the changes occurring at the metabolite level under the influence of imatinib. The research was carried out in a patient-derived xenograft model in mice, which authentically reflects the patient's tumour histopathological and molecular characteristics.

The first step towards achieving the goal was the selection of an appropriate method of GIST tissue preparation for non-targeted metabolomic analysis, which assumes the determination of the largest number of metabolites in a biological matrix. Liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry (LC-TOF/MS) was used for sample analysis. Based on the literature, four extraction methods have been proposed and tested on GIST samples. The selection criterion was the number of extracted metabolites and the reproducibility of the procedure. The selected method involves a two-phase extraction using methanol, tert-butyl methyl ether (MTBE) and water. The use of liquid chromatography in two modes: reversed-phase (RP) and hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) enabled a wide range of metabolites to be determined – from highly non-polar compounds, such as lipids (*e.g.* fatty acids, glycerolipids, sterols), to more polar molecules such as amino acids, carbohydrates, organic acids.

The potential of integrating the results from metabolomic and transcriptomic analysis for explaining imatinib-driven alterations was tested in the following experiment. Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) showed decreased levels of purines, pyrimidines, fatty acids, amino acids, and butyric acid pathway metabolites in GIST tissue after imatinib treatment. Gene expression analysis highlighted changes in kinase activity, immune system response, and purine biosynthesis. Reduced levels of metabolites from the purine pathway: hypoxanthine, xanthine, xanthosine, and uric acid, were also observed in treated tumours in metabolomics analysis. Purines play a crucial role in cell function, as they are components of DNA, provide energy and control

cell growth. In cancer cells characterised by intensive growth and proliferation, the demand for purine compounds increases. Therefore, the decrease in purine concentrations observed after treatment with imatinib may be part of the mechanism of action of imatinib, leading to tumour growth inhibition.

In the last experiment, a comprehensive metabolomics analysis of GIST samples with four different mutations in the *KIT* gene was performed using the developed sample preparation procedure. The GIST metabolome was observed to be shaped mainly by the underlying mutation. Statistical analysis also revealed several metabolites that significantly differentiated the treated and control tumours, however, these differences were smaller than those between various mutations. We proved the validity of RP-LC-MS and GC-MS techniques for the analysis of GIST metabolism in further research.

To explain the problem of limited responsiveness of tumours to treatment, advancing GIST research is extremely important. This doctoral thesis proposes methods for preparing and analysing GIST samples that can be used to detect changes in the metabolism of tumour cells depending on the existing mutation or the applied therapy. The studies described herein confirmed the role of previously known pathways, such as kinase activity, and showed the importance of other processes, such as the metabolism of purines, pyrimidines, and fatty acids in response to imatinib treatment. Further research, taking into account a more comprehensive range of mutations and a higher number of biological samples, may confirm which metabolic pathways are responsible for the limited sensitivity of the tumour to therapy, and may also be used to propose new molecular targets.