

mgr Mariusz Hartman

Zakład Biologii Molekularnej Nowotworów

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Molekularne podstawy zmian fenotypu komórek czerniaka in vitro

Streszczenie

Przez porównanie transkryptomów komórek czerniaka w wielokomórkowych melanosferach rosnących w podłożu zawierającym czynniki wzrostu EGF i bFGF z transkryptomami komórek czerniaka w monowarstwach uzyskiwanych w podłożu z surowicą wykazano, że szlak sygnałowy WNT/ β -katenina oraz czynnik transkrypcyjny MITF uczestniczą w modulowaniu fenotypów komórek czerniaka w odpowiedzi na zmiany w mikrośrodowisku. Szlak sygnałowy WNT/ β -katenina był zahamowany w komórkach czerniaka rosnących w podłożu z surowicą, o czym świadczył m.in. wysoki poziom ekspresji i sekrecji inhibitora szlaku, białka DKK1. W melanosferach stwierdzono natomiast wysoką ekspresję MITF i 74 genów zależnych od tego czynnika transkrypcyjnego zaangażowanych w pigmentację, różnicowanie i przeżycie. Poziom ekspresji MITF i genów od niego zależnych oraz DKK1 był podobny w melanosferach i tkance guza, z którego wyprowadzono melanosfery. Melanosfery charakteryzowały się również wysoką ekspresją genów kodujących białka istotne w procesie samoodnowy oraz regulujące przejście nabłonkowo-mezenchymalne. A zatem, melanosfery lepiej odzwierciedlały heterogenność wyjściowych guzów. Komórki czerniaka rosnące w podłożu z surowicą charakteryzowały się wysoką ekspresją cykliny D1 oraz białek zaangażowanych w proces inwazyjności i migrację komórek nowotworowych, a także wysoką aktywnością kinaz ERK-1/2. Wyniki te wskazywały na wyższy odsetek komórek dzielących się oraz komórek z potencjałem inwazyjnym w monowarstwach w porównaniu z melanosferami i wyjściowym guzem. Mechanizmy chroniące komórki przed śmiercią są wykorzystywane w czasie ich adaptacji do nowego mikrośrodowiska np. podczas tworzenia przerzutów. Wyjściowy poziom ekspresji białek antyapoptotycznych był różny dla różnych populacji. Analiza mechanizmów uczestniczących w ochronie komórek czerniaka przed śmiercią w czasie zmiany warunków wzrostu (mikrośrodowiska) wykazała przejściowe zmiany poziomu mRNA i białka MCL-1 we wszystkich populacjach, oraz dodatkowo BCL-X_L w populacjach z niską ekspresją MITF. Wykazano, że wzrost poziomu MCL-1 wynika ze zwiększonej przejściowo stabilności jego transkryptu. Natychmiastowa odpowiedź komórek

czerniaka na surowicę obejmowała również zmiany poziomu MITF oraz przejściowe obniżenie aktywności kinaz ERK-1/2. Zahamowanie ekspresji MCL-1 przy użyciu siRNA, poprzedzające ekspozycję na podłoże z surowicą, skutkowało indukcją śmierci w komórkach czerniaka. MCL-1 stanowił zatem istotny element mechanizmu cytoprotekcyjnego w czasie adaptacji komórek czerniaka do podłoża zawierającego surowicę, co umożliwiało następcze zmiany fenotypu. Ocena mechanizmów adaptacyjnych oraz długoterminowej odpowiedzi na poziomie molekularnym na zmianę warunków wzrostu przyczyni się do poszerzenia wiedzy na temat mechanizmów odpowiedzialnych za progresję czerniaka oraz pozwoli wypracować lepszy model do badań farmakologicznych *in vitro*.

Abstract

Analysis of transcriptome profiles generated for the anchorage-independent multi-cellular melanospheres grown in EGF(+)bFGF(+) medium and adherent monolayers grown in the presence of serum pointed to the WNT/ β -catenin pathway and MITF-dependent programs as contributing to microenvironment-driven phenotypic alterations of patient-derived melanoma populations. Microenvironment substantially influenced the activity of the WNT/ β -catenin pathway by activating expression of different components and target genes in the melanospheres and monolayers. In the latter, DKK1, a secreted inhibitor of this pathway was highly expressed indicating that the WNT/ β -catenin pathway activity is strongly reduced in the monolayers. High expression of MITF and 74 MITF-dependent genes, including those involved in pigmentation, differentiation and survival was observed in the melanospheres. Notably, similar expression of MITF, MITF-dependent genes and DKK1 was obtained for the parent tumors. The melanospheres also showed high expression of genes encoding proteins involved in self-renewal and epithelial-to-mesenchymal transition. Thus, the melanospheres better reflect the heterogeneity of the original tumors. The monolayers grown in the presence of serum were characterized by high expression of cyclin D1 and several invasiveness/migration-related genes as well as enhanced activity of ERK-1/2, constituting populations of melanoma cells endowed with proliferative and invasive potential. Evading apoptosis by melanoma cells is a part of their adaptation to microenvironment, also during metastatic cascade. Baseline anti-apoptotic machinery differs between patient-derived melanoma populations grown in EGF(+)bFGF(+) medium. Pro-survival mechanisms assessed during immediate adaptive response to serum-containing medium indicated that melanoma cells involved a transient increase in MCL-1 at mRNA and protein levels, and changes in transcript and protein levels of BCL-X_L could additionally support MCL-1 in MITF^{low} populations. An increase in MCL-1 level results from a temporarily enhanced stability of its transcript. Immediate response to serum also involves a transient increase in MITF expression and inhibition of ERK-1/2 activity. Silencing MCL-1 before transfer to serum-containing medium caused the induction of cell death in a subset of melanoma cells. Thus, MCL-1 contributes to the survival advantage at the early stages of adaptation to serum-containing medium which supports long-term transcriptional reprogramming of melanoma cells. Studying immediate and long-term molecular response of melanoma cells to different growth conditions can extend our knowledge on melanoma progression, as well as can contribute to the development of more appropriate *in vitro* model for drug testing.