

Beata Talar

**Molekularne mechanizmy działania
pentoksyfiliny w komórkach czerniaka**

Promotor: prof. dr hab. Małgorzata Czyż

Rozprawa doktorska przygotowana
w Zakładzie Biologii Molekularnej Nowotworów
Katedry Chemii i Biochemii Medycznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Łódź, 2016

STRESZCZENIE

Czerniak charakteryzuje się dużą heterogennością fenotypową oraz genotypową. Co więcej, w obrębie pojedynczej zmiany nowotworowej znajdują się komórki o różnej zdolności do inicjowania i promowania rozwoju guza oraz wykazujące zróżnicowaną odpowiedź na leczenie. Pomimo postępów, jakie dokonały się w leczeniu czerniaka w ostatnich latach, skuteczność terapii u pacjentów w zaawansowanym stadium tego nowotworu ciągle nie jest satysfakcjonująca. Uzasadnione jest więc poszukiwanie nowych strategii leczniczych, w tym związków adjuwantowych, które wspomagałyby obecnie stosowaną terapię.

Pentoksyfilina jest związkiem pochodzenia naturalnego, który wykorzystywany jest w terapii paliatywnej chorych w zaawansowanym stadium nowotworów oraz jako związek uwrażliwiający komórki nowotworowe na radio- i chemioterapię. Ponadto, prowadzone są badania nad jej bezpośrednimi właściwościami przeciwnowotworowymi. W prezentowanej pracy doktorskiej badano molekularny mechanizm działania pentoksyfiliny w komórkach czerniaka wyizolowanych od pacjentów i rosnących w podłożu dla komórek macierzystych. Komórki czerniaka hodowane w takim podłożu charakteryzowały się wysoką klonogennością, podwyższoną aktywnością kanonicznego szlaku WNT oraz niższym tempem proliferacji w porównaniu do ich odpowiedników rosnących w podłożu z surowicą. Liczne badania donoszą, że zdolność do samoodnowy oraz ekspresja pompy ABCB5 charakteryzuje komórki czerniaka o cechach nowotworowych komórek macierzystych (CSCs, ang. cancer stem cells) opornych na stosowaną chemioterapię. Prezentowana praca doktorska oparta jest na hipotezie, że aktywność pentoksyfiliny w komórkach czerniaka rosnących w podłożu dla komórek

macierzystych, związana jest ze zdolnością tego związku do regulacji kanonicznego szlaku WNT.

W podjętych badaniach wykazano, że badane populacje czerniaka różnią się podstawową aktywnością kanonicznego szlaku WNT. Populacje wolnoprołiferujące charakteryzował wysoki podstawowy poziom aktywnej β -kateniny w jądrze komórkowym oraz aktywność czynników transkrypcyjnych TCF/LEF. Z kolei populacje szybko proliferujące wykazywały wysoką ekspresję DKK1, inhibitora szlaku WNT, co przekładało się na względnie niską aktywność tego szlaku. Pentoksyfilina działała cytostatycznie oraz indukowała apoptozę we wszystkich badanych populacjach, natomiast obniżenie aktywności kanonicznego szlaku WNT przez pentoksyfilinę zaobserwowano tylko w komórkach czerniaka charakteryzujących się wysoką podstawową aktywnością tego szlaku sygnałowego. Wniosek ten został poparty: doświadczeniami z wykorzystaniem wektora reporterowego GFP dla czynników transkrypcyjnych TCF/LEF, mikroskopową oceną komórkowej lokalizacji aktywnej β -kateniny, a także poprzez analizę ekspresji genów regulowanych przez kanoniczny szlak WNT i/lub będących jego elementami. Należy zaznaczyć, że pomimo szeroko prowadzonych badań nad przeciwnowotworowymi właściwościami pentoksyfiliny, jej zdolność do hamowania kanonicznego szlaku WNT, nie została do tej pory opublikowana w literaturze naukowej. Z kolei hamowanie kanonicznego szlaku WNT może mieć szczególne znaczenie w terapii przeciwko nowotworowym komórkom macierzystym oraz w immunoterapii. Prezentowane badania wskazują, że pentoksyfilina może stać się przedmiotem badań klinicznych jako potencjalny element terapii adjuwantowej czerniaka.

SUMMARY

Melanoma is one of the most aggressive and highly heterogeneous cancer. A single tumor nodule can be characterized by morphological compartments with different capacities to initiate and drive tumorigenesis. What is more, during cancer development, melanoma cells can switch between proliferative and invasive phenotypes in response to extracellular stimuli resulting in immune surveillance evasion and therapy resistance. Despite the fact that melanoma treatment options have evolved rapidly in the last decade, there is still a subset of melanoma patients with intrinsic and acquired resistance to newly developed immune-based and targeted therapies. Recently, it has been reported that the canonical WNT signaling pathway impaired anti-melanoma immune responses and induced selection of BEAFi resistant melanoma cells.

Pentoxifylline is a natural compound, that is clinically used in patients with the chronic peripheral arterial disease to increase blood flow and enhance tissue oxygenation. Currently, pentoxifylline is considered as an anticancer drug. It has been reported that pentoxifylline efficiently reduced the clonogenic capacity of patient-derived melanoma cell lines and markedly reduced the frequency of ABCB5 - positive cells. Following the concept linking the stemness with the canonical WNT pathway, we asked whether pentoxifylline could modulate the activity of this pathway in melanoma cells cultured in stem cell medium (SCM).

Five patient-derived melanoma populations with a different basal expression of β -catenin, a crucial effector of the canonical WNT signaling pathway have been selected for this study. The slow-dividing melanoma populations presented a high basal level of nuclear β -catenin and an increased activity of the TCF/LEF transcription factors, whereas increased expression and secretion of DKK1 was

observed in fast-dividing melanoma populations, that results in the relatively lower activity of canonical WNT pathway. Pentoxifylline induced G₀/G₁ cells cycle arrest in all tested melanoma populations, whereas decreased viability more efficiently in slow- than in fast-dividing melanoma populations.

A key finding of this study is that pentoxifylline inhibits the activity of the canonical WNT pathway in melanoma populations with the high basal activity of this signalling. This finding was supported by lowered overall activity of the TCF/LEF transcription factors, reduced nuclear localization of β -catenin and increased expression of DKK1. Pentoxifylline-induced overexpression of DKK1 might be one of the mechanisms of the WNT/ β -catenin pathway downregulation. Moreover, treatment of melanoma cell populations with pentoxifylline induced downregulation of genes that are targets of the WNT/ β -catenin pathway including connective tissue growth factor (CTGF) and microphthalmia-associated transcription factor (MITF-M), a melanocyte- and melanoma cell-specific regulator.

Presented studies indicate that pentoxifylline might be tested in a subset of melanoma patients with elevated activity of the WNT/ β -catenin signalling pathway as an adjuvant drug in combination therapies to overcome acquired and intrinsic resistance to immunotherapy or as an anti-melanoma stem cells drug.