



**Izabela Zaleśna**

**Zależność fenotypu komórek czerniaka  
w hodowlach *in vitro* od czynników wzrostu**

**Promotor: prof. dr hab. n. med. Małgorzata Czyż**

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

Łódź 2018

## **STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ W JĘZYKU POLSKIM**

---

**Założenia:** Czerniak jest nowotworem o agresywnym przebiegu, charakteryzujący się niskim odsetkiem przeżyć pięcioletnich w zaawansowanych stadiach choroby. Zidentyfikowanie mutacji prowadzącej do powstania kinazy BRAF<sup>V600E</sup>, występującej u 50% przypadków pacjentów z czerniakiem otworzyło drogę do opracowania terapii celowanych z użyciem jej inhibitorów. Po zadowalających wynikach badań klinicznych do praktyki klinicznej wprowadzono wemurafenib, dabrafenib i trametinib będące inhibitorami białek szlaku RAS/RAF/MEK/ERK. Niestety obserwuje się znaczący odsetek pacjentów z opornością na leki ukierunkowane molekularnie, nawet pomimo zastosowania ich w skojarzeniu. Rozpoznano wiele mechanizmów oporności, ale szczególne zainteresowanie budzi oddziaływanie komórek czerniaka z komórkami mikrośrodowiska nowotworu za pośrednictwem różnych czynników wzrostu m.in.: EGF, bFGF, HGF, wydzielanych zarówno przez komórki nowotworowe jak i komórki zrębu. Udowodniono, że HGF wydzielany przez fibroblasty przyczynia się do oporności komórek czerniaka na wemurafenib.

**Cel:** Ocena wpływu czynników wzrostu HGF, bFGF i EGF, stosowanych samodzielnie i w skojarzeniu w hodowlach komórek czerniaka pozyskanych od pacjentów, na morfologię i aktywność szlaków sygnałowych w komórkach nowotworowych oraz odpowiedź komórek na leki celowane, wemurafenib, inhibitor BRAF<sup>V600E</sup> i trametinib, inhibitor MEK1/2.

**Materiały i metody:** W pracy wykorzystane zostały komórki czerniaka pobrane od pacjentów. Hodowla była prowadzona w obecności czynników wzrostu, stosowanych samodzielnie i w skojarzeniu. Efekty zostały ocenione na poziomie komórkowym i molekularnym w komórkach kontrolnych oraz po zastosowaniu wemurafenibu i trametinibu. Na poziomie komórkowym oceniono morfologię komórek oraz proliferację przy użyciu obrazowania w czasie rzeczywistym. Na poziomie molekularnym zbadano techniką Western blot poziom aktywności białek szlaku sygnałowego RAS/RAF/MEK/ERK i kanonicznego szlaku WNT oraz aktywność czynnika transkrypcyjnego NFκB.

**Wyniki:** Nie stwierdzono różnic w morfologii komórek czerniaka i aktywności białek efektorowych szlaków RAS/RAF/MEK/ERK i kanonicznego szlaku WNT, a także czynnika

transkrypcyjnego NFκB, przy porównaniu komórek hodowanych w podłożach zawierających czynniki wzrostu bFGF, EGF i HGF, stosowane samodzielnie i w skojarzeniu. Co ciekawsze, komórki hodowane przez 4 miesiące w podłożu bez egzogennych czynników wzrostu, zachowywały wyjściową morfologię i aktywność badanych szlaków sygnałowych oraz bardzo podobnie odpowiadały na leki, wemurafenib i trametinib.

## **STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ W JĘZYKU ANGIELSKIM**

**Background:** Melanoma is an aggressive tumor and is characterized by a low percentage of five-year survival in advanced stage of disease. The discovery of the mutation BRAF<sup>V600E</sup> in melanoma cells has improved the development of targeted therapies. Vemurafenib, dabrafenib and trametinib, being inhibitors of the RAS/RAF/MEK/ERK signaling pathway, were introduced into clinical practice after successful results of preclinical and clinical trials. Unfortunately, most of patients have developed the resistance to treatment with kinase inhibitors, also used in combination. Many resistance mechanisms have been identified. The influence of microenvironment on tumor cells through various stimuli e.g., growth factors, including EGF, bFGF, HGF, secreted by stromal cells are in focus of cancer research. It has been proved, for example, that HGF secreted by fibroblasts contributes to the resistance of melanoma cells to vemurafenib.

**Goal:** Three growth factors EGF, bFGF, HGF were used either alone or in combination to reveal whether growth factors or their particular combination can influence the patient-derived melanoma cell morphology and activity of signaling pathways, crucial for melanoma development and maintenance, including the RAS/RAF/MEK/ERK pathway, WNT/ $\beta$ -catenin pathway and NF $\kappa$ B signaling.

**Material and methods:** Melanoma cell populations derived from patient tumors were used in the study. Melanoma cells were maintained in the medium containing growth factors EGF, bFGF, HGF, either alone or in combination. The analysis was performed on control cells cultured in medium with different combination of growth factors and after treatment of vemurafenib or trametinib. For cell proliferation a time-lapse-fluorescence microscope system was used. On molecular level, the activity of main effector protein like ERK1/2,  $\beta$ -catenin and NF $\kappa$ B was assessed by Western blot.

**Results:** Patient-derived melanoma cells maintained in the medium containing different composition of growth factors do not differ in morphology and activity of signaling pathways such as RAS/RAF/MEK/ERK, WNT/ $\beta$ -catenin and NF $\kappa$ B signaling. No substantial differences were observed in the response to vemurafenib and trametinib between cells grown

in different conditions. Moreover, it was shown that the melanoma cells can be maintained for more than four months in the medium without exogenous growth factors. In these conditions melanoma cells preserved initial morphology and activity of investigated signaling pathway as well as similar response to vemurafenib and trametinib.