

Marta Ośrodek

**Rola tlenu i insuliny w odpowiedzi komórek czerniaka  
na leki celowane *in vitro***

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

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

Łódź, 2021

## STRESZCZENIE

Warunki hodowli komórek ludzkich *in vitro* nie odzwierciedlają naturalnych warunków panujących w tkankach. W niniejszej rozprawie doktorskiej oceniano rolę tlenu i insuliny, dwóch istotnych składników mikrośrodowiska nowotworu, w hodowli komórek czerniaka pozyskanych z guzów pacjentów w czasie interwencji chirurgicznej. Głównym celem badań było ustalenie, czy i w jaki sposób insulina i stężenie tlenu wpływają na odpowiedź komórek czerniaka na leki celowane: wemurafenib, będący inhibitorem kinazy BRAF<sup>V600E</sup> i trametynib, hamujący aktywność kinaz MEK1/2.

Tlen jest kluczowym składnikiem mikrośrodowiska komórek, jednak jego stężenie (21%) w standardowych hodowlach komórkowych *in vitro* znacząco przekracza stężenie tlenu w tkankach. Zaprezentowane w niniejszej pracy wyniki dokumentują szeroki zakres zależnych od tlenu zmian w fenotypie komórek czerniaka i odpowiedzi tych komórek na leki celowane. Obniżenie stężenia tlenu do poziomu występującego w tkankach obwodowych (6% O<sub>2</sub>) spowodowało znaczący wzrost ekspresji genów kodujących transporter glukozy 1 (*GLUT1*, ang. *Glucose Transporter 1*), kinazę dehydrogenazy pirogronianowej 1 (*PDK1*, ang. *Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1*), a także czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (*VEGF*, ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*) we wszystkich liniach komórkowych czerniaka, oraz spowodowało zmiany w odsetku komórek o wysokiej ekspresji czynnika transkrypcyjnego MITF (ang. *Microphthalmia-Associated Transcription Factor*) lub receptora czynnika wzrostu nerwów (NGFR, ang. *Nerve Growth Factor Receptor*), w sposób zależny od linii komórkowej. Mimo że wemurafenib i trametynib skutecznie hamowały aktywność szlaku RAS/RAF/MEK w obu stężeniach tlenu, wpływ leków na poziom transkryptu *VEGF*, *SLC7A11* (ang. *Solute Carrier Family 7 Member 11*), *PDK1* oraz białek MITF i Ki-67 zależał od stężenia tlenu. Wyniki dotyczące fenotypu komórek czerniaka oraz odpowiedzi komórkowej na leki, uzyskiwane w warunkach będących standardem w hodowlach komórkowych (21% O<sub>2</sub>), różnią się zatem znacząco od tych uzyskiwanych w warunkach normoksji (6% O<sub>2</sub>). Może to częściowo tłumaczyć rozbieżności obserwowane między wynikami badań *in vitro* i w warunkach klinicznych.

Podczas gdy liczne badania epidemiologiczne wskazują na związek chronicznie podwyższonego poziomu insuliny z zachorowalnością na raka i zwiększoną śmiertelnością, rola insuliny w odpowiedzi komórek czerniaka na leki nie została dotąd

wystarczająco zbadana. Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej wykazały, że insulina znacząco ogranicza skuteczność leków celowanych, wemurafenibu i trametynibu, mimo braku wpływu na aktywność szlaku RAS/RAF/MEK. Co ważne, pomimo znacznych różnic w fenotypie wykorzystanych linii komórkowych czerniaka, w aktywności szlaku PI3K/AKT w obecności insuliny i zależnych od linii komórkowych mechanizmów odpowiedzi na leki, insulina ograniczała apoptozę indukowaną lekami celowanymi we wszystkich badanych liniach komórkowych. W obecności insuliny wemurafenib i trametinib były mniej skuteczne w hamowaniu proliferacji komórek czerniaka, zmniejszaniu odsetka komórek o wysokiej ekspresji Ki-67, obniżaniu ekspresji genów związanych z naprawą DNA: *BRIP1* (ang. *BRCA1-Interacting Protein*), *BRCA1* (ang. *Breast Cancer Susceptibility Gene 1*) i *BRCA2* (ang. *Breast Cancer Susceptibility Gene 2*), oraz fosforylacji histonu H2AX (ang. *H2A histone family member X*), jak również zmniejszaniu ekspresji *SLC7A11* i *SLC1A5* (ang. *Solute Carrier Family 1 Member 5*), genów kodujących antyporter glutaminianu/cystyny i transporter glutaminy. Obecność insuliny ograniczała indukowane przez leki zmiany w pojemności antyoksydacyjnej (stosunek GSH:GSSG) i całkowitym poziomie glutationu. Ponadto insulina redukowała efekt cytotoksyczny leków celowanych stosowanych w skojarzeniu z doksorubicyną. Wreszcie, zaobserwowano zależny od insuliny wzrost częstości komórek o wysokiej ekspresji NGFR, receptora uważanego za marker tzw. komórek macierzystych czerniaka, co również może tłumaczyć obniżoną efektywność stosowanych leków. Uzyskane wyniki dokumentują znaczącą rolę insuliny w odpowiedzi komórek czerniaka na leki celowane, która wymaga dalszych badań, w tym oceny klinicznej.

Podsumowując, wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej poszerzają zakres wiedzy na temat roli tlenu i insuliny w biologii czerniaka wskazując, że oba składniki mikrośrodowiska nowotworu znacząco wpływają na odpowiedź komórek czerniaka na wemurafenib i trametynib.

## SUMMARY

Despite growing understanding of the role of cellular microenvironment in both health and disease, *in vitro* cell culture conditions poorly resemble the natural microenvironment of human tissues. The present study evaluated the role of oxygen and insulin, both highly relevant bioelements of the tumor microenvironment, in patient-derived melanoma cell lines *in vitro*. The prime goal was to determine whether either of these factors regulates melanoma cell response to drugs targeting the BRAF<sup>V600E</sup> kinase (vemurafenib) or MEK1/2 kinases (trametinib).

Oxygen is a crucial component of cell microenvironment, yet its concentration in *in vitro* cell culture (21%) exceeds oxygen concentration in every human tissue. The present study revealed a wide range of oxygen-dependent differences in the melanoma cell phenotype and response of these cells to targeted therapeutics. Lowering oxygen levels to the level found in peripheral tissues (6% O<sub>2</sub>) significantly enhanced the expression of glucose transporter 1 (*GLUT1*), pyruvate dehydrogenase kinase 1 (*PDK1*) and vascular endothelial growth factor (*VEGF*) in all melanoma cell lines, but altered the percentage of Microphthalmia-Associated Transcription Factor (MITF)-positive and Nerve Growth Factor Receptor (NGFR)-positive cells in a cell line-dependent manner. Furthermore, although vemurafenib and trametinib treatment of melanoma cells resulted in comparative inhibition of the RAS/RAF/MEK pathway in all experimental conditions, drug-induced reduction of the expression of *VEGF*, Solute Carrier Family 7 Member 11 (*SLC7A11*), *PDK1*, MITF and Ki-67 was less pronounced in normoxic conditions (6% O<sub>2</sub>) than in standard cell culture conditions (21% O<sub>2</sub>). The results obtained herein indicate that studies performed *in vitro* in atmospheric oxygen concentration (21%) provide different information on melanoma cell phenotype and cell response to drugs than performed in normoxia (6% O<sub>2</sub>). This might provide a partial explanation for the discrepancies observed between results obtained *in vitro* and in clinical settings.

While multiple epidemiological studies have linked chronically elevated insulin levels to cancer incidence and increased cancer-related mortality, insulin's role in the response of melanoma cells to anticancer treatment had not been extensively studied. The present study confirmed that insulin significantly reduces the efficacy of vemurafenib and trametinib despite having no effect on the RAS/RAF/MEK pathway activity. Importantly, despite substantial phenotypic differences between melanoma cell lines, variable durability of insulin-induced PI3K/AKT pathway activity and cell-line dependent

responses to treatment, insulin substantially protected melanoma cells from drug-induced apoptosis and phosphorylation of histone H2AX in all tested cell lines. In the presence of insulin, vemurafenib and trametinib were less efficient in inhibiting proliferation and lowering the percentages of Ki-67-positive cells. Insulin attenuated drug-mediated changes in the expression of DNA repair related genes (*BRIP1*, *BRCAl*, *BRCA2*), the expression of transmembrane transporters relevant to glutathione synthesis (*SLC7A11*, *SLC1A5*), antioxidative capacity (GSH:GSSG ratio) and total glutathione levels. In addition, insulin attenuated melanoma cell death caused by combined treatment of melanoma cells with targeted drugs and doxorubicin. Finally, insulin increased the frequency of cells expressing NGFR, a marker of neural crest stem-like cells, that may contribute to the reduced drug efficacy. Overall, the study documented an important role of insulin in reducing the efficacy of vemurafenib and trametinib in melanoma cells, which deserves clinical evaluation.

In summary, results presented herein contribute to a better understanding of the role of oxygen and insulin in melanoma biology showing that both components of the cell microenvironment substantially influence the effects of vemurafenib and trametinib in melanoma cells.