

„Inhibitory EGFR i c-Met jako czynniki ograniczające powstawanie inwadopodiów w komórkach ludzkiego czerniaka”

Czerniak jest nowotworem o stosunkowo niskiej częstotliwości występowania, aczkolwiek wysokiej śmiertelności, na poziomie ok. 80% wśród wszystkich nowotworów skóry. Z każdym rokiem rośnie liczba nowo diagnozowanych przypadków tej choroby, jednak nadal nie opracowano skutecznego leku dla pacjentów, u których doszło już do przerzutu do węzłów chłonnych lub do innych organów. Za tak dużą inwazyjność czerniaka odpowiadają mechanizmy molekularne związane m.in. ze szlakami sygnałnymi aktywowanymi przez czynniki wzrostu, a także z białkami regulującymi organizację cytoszkieletu, w tym struktur inwazyjnych bogatych w aktynę – inwadopodiów. Pośród receptorów czynników wzrostu, których mutacje genów oraz ich nadekspresję wykryto u pacjentów cierpiących na czerniaka, jest EGFR (receptor naskórkowego czynnika wzrostu, ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*) oraz c-Met (receptor czynnika wzrostu hepatocytów, ang. *Hepatocyte Growth Factor Receptor*). W komórkach prawidłowych regulują one podstawowe procesy m.in. wzrost i migrację, jednak w komórkach nowotworowych mogą przyczynić się do rozrostu guza i powstawania przerzutów, co czyni je potencjalnymi celami terapeutycznymi dla inhibitorów drobnocząsteczkowych lub przeciwciał monoklonalnych.

Celem tej pracy było ustalenie wpływu inhibitorów EGFR i c-Met na przeżywalność oraz zdolności inwazyjne komórek ludzkiego czerniaka tworzących inwadopodia, wypustki adhezyjne o zdolnościach proteolitycznych. Zadaniem projektu była zatem weryfikacja tezy zakładającej, iż receptory czynników wzrostu mogą stanowić potencjalny cel terapii ukierunkowanej na zahamowanie tworzenia przerzutów przez komórki czerniaka poprzez zablokowanie aktywności tworzonych przez nie struktur inwazyjnych.

W pierwszym etapie pracy określono poziom badanych receptorów w liniach komórkowych ludzkiego czerniaka wywodzących się z nowotworu pierwotnego (A375, WM1341D) oraz przerzutów (Hs294T, WM9, WM239), a także zweryfikowano wrażliwość komórek na inhibitory EGFR (erlotinib, gefitinib, lapatinib) i c-Met (crizotinib, foretinib). Na podstawie otrzymanych wyników do dalszych badań wybrano linie A375, Hs294T i WM9, oraz zestaw inhibitorów, które stosowane w duetach wykazywały synergistyczny efekt cytotoksyczny (foretinib z lapatinibem lub gefitinibem) względem komórek czerniaka. Następnie, zbadano wpływ wybranych mieszanin leków na zdolności inwazyjne badanych komórek. Testy migracji spontanicznej, zarastania rysy oraz eksperymenty z wykorzystaniem komory Boydena wykazały przewagę duetów inhibitorów nad monoterapią. Także parametry związane z inwazją

komórek przez macierz pozakomórkową - liczba inwadopodiów oraz poziom aktywności proteolitycznej komórek, uległy znacznej redukcji w wyniku stosowania mieszanin leków.

Dodatkowo, przetestowano bezpośredni wpływ EGFR i c-Met na inwazyjność komórek czerniaka. W tym celu wygenerowano linie komórkowe o podwyższonej lub obniżonej ekspresji genów kodujących te receptory i stwierdzono, że wyższy poziom EGFR sprzyja inwazyjności, natomiast obniżony poziom EGFR lub c-Met koreluje ze zmniejszoną ruchliwością i aktywnością proteolityczną komórek czerniaka.

W ostatnim etapie pracy wygenerowano linie komórkowe odporne na vemurafenib, inhibitor zmutowanej kinazy BRAF, szeroko stosowany w terapii metastatycznego czerniaka. Uzyskane komórki wykazywały znaczny wzrost inwazyjności w stosunku do komórek wyjściowych, a także obecność niektórych cech macierzystości. Ustalono, że terapia łączona (foretinib z lapatinibem) jest skuteczna głównie w hamowaniu wzrostu uzyskanych komórek opornych, w mniejszym stopniu wpływając na ich ruchliwość.

Podsumowując, uzyskane wyniki potwierdzają zasadność postawionej tezy i wskazują, że zastosowanie inhibitorów EGFR i c-Met, szczególnie w postaci duetu leków, skutecznie zmniejsza nie tylko przeżywalność komórek czerniaka, ale także obniża ich zdolności migracyjne i inwazyjne między innymi poprzez zahamowanie tworzenia przez nie aktywnych inwadopodiów.