

STRESZCZENIE

Czerniaki skóry są złośliwymi nowotworami wywodzącymi się z neuroektodermalnych komórek melanocytarnych. W Polsce czerniak występuje względnie rzadko, mimo to cechuje się wysoką śmiertelnością, która drastycznie wzrasta wraz ze stopniem zaawansowania choroby, stanowiąc przyczynę 73% zgonów spowodowanych nowotworami skóry.

Szacuje się, że niemal 90% czerniaków wykazuje nieprawidłowości w przekazie sygnału szlakiem kinaz MAPK, co w wielu przypadkach jest konsekwencją wystąpienia mutacji w genach *BRAF* lub *NRAS*. Ponadto w wielu przypadkach obserwuje się hiperaktywację czynnika transkrypcyjnego NFκB (p50/p65), która prowadzi do inicjacji, progresji, jak i przerzutowania czerniaka. Stąd też wiele uwagi poświęca się badaniom nad rozwojem terapii opartych na specyficznym modulowaniu aktywności określonych białek, których prawidłowe funkcjonowanie zostało zaburzone. Mimo ogromnych postępów, jakie dokonano w diagnostyce oraz w leczeniu czerniaka skóry w ostatnich latach, to wciąż skuteczność tych terapii zależy przede wszystkim od stopnia zaawansowania ogniska pierwotnego w momencie rozpoczęcia leczenia. Co więcej, w przypadku czerniaków przerzutowych często dochodzi do pojawienia się oporności na powszechnie stosowane leczenie, co w dużej mierze spowodowane jest wysoką heterogennością oraz plastycznością komórek czerniaka.

Kinaza białkowa oddziałująca z receptorem 4 (RIPK4) odgrywa istotną rolę w rozwoju oraz w prawidłowym funkcjonowaniu naskórka. Odpowiedzialna jest m.in. za utrzymanie równowagi między procesem różnicowania się a proliferacją keratynocytów, poprzez udział w przekazie sygnału szlakiem PKC/NFκB. Co więcej, RIPK4 również uczestniczy w kaskadzie sygnałnej głównych szlaków komórkowych, w tym w szlaku WNT oraz MAPK, które w wielu typach nowotworów ulegają zaburzeniu. Wykazano, że w zależności od typu nowotworu, RIPK4 może odgrywać zarówno onkogenną, jak i supresorową rolę, wskazując na silną zależność funkcji tej kinazy od kontekstu komórkowego.

Jak dotąd nie podjęto badań mających na celu poznania funkcjonalnej roli, jaką pełni kinaza RIPK4 w czerniaku. Stąd też niniejsza praca skupia się na zbadaniu udziału RIPK4 w przekazie sygnału szlakiem NFκB oraz BRAF/MEK/ERK, a także ocenie, jakie ma to przełożenie na potencjał inwazyjny komórek czerniaka. W pierwszej kolejności wykazano, że w liniach komórkowych czerniaka wzrasta poziom ekspresji kinazy RIPK4 w porównaniu do komórek prawidłowych – melanocytów. Analiza danych z próbek klinicznych nie wskazała

korelacji poziomu RIPK4 ze stadium zaawansowania choroby, co wynika z wysokiego zróżnicowania ekspresji tej kinazy.

Inkubacja komórek z estrem forbolu wykazała, że migracja komórek czerniaka, która jest regulowana przez przekaz sygnału szlakiem NFκB, może zachodzić zarówno w sposób zależny (WM266.4), jak i niezależny (A375) od aktywności kinazy RIPK4. Może to wynikać z odmiennego fenotypu analizowanych komórek, które m.in. różnią się poziomem ekspresji kinazy PKC, która uczestniczy w aktywacji kinazy RIPK4. Jednakże niezależnie od linii komórkowej zaobserwowano, że obniżenie poziomu ekspresji RIPK4 za pomocą specyficznego siRNA hamuje przekaz sygnału szlakiem NFκB, co przekłada się na spowolnienie migracji komórek. Badania wykazały, że komórki czerniaka z wyciszoną ekspresją RIPK4 mają obniżony poziom ekspresji MMP-2, MMP-9 oraz fibronektyny, a także wykazują formowanie się słabych włókien aktynowych zakotwiczonych w małych ogniskach adhezji komórkowej zbudowanych z winkuliny. Ponadto obserwowano zmniejszenie tempa proliferacji komórek czerniaka zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, w których do szczepienia myszy wykorzystano komórki ze stabilnym wyciszeniem ekspresji RIPK4, które uzyskano z wykorzystaniem techniki CRISPR-Cas9.

Przeprowadzone badania pozwoliły również wykazać, że w czerniaku kinaza RIPK4 nie uczestniczy w przekazie sygnału szlakiem BRAF/MEK/ERK. Natomiast stosowane klinicznie inhibitory białka BRAF^{V600}: wemurafenib i dabrafenib, obniżają jej poziom. Przy pomocy metody dokowania molekularnego potwierdzono, że inhibitory te bezpośrednio oddziałują z kinazą RIPK4.

Podsumowując, w niniejszej pracy dowiedziono, że w komórkach czerniaka, kinaza RIPK4 jest zaangażowana w przekaz sygnału szlakiem NFκB, przez co może pełnić funkcję onkogenną, a także stanowić dodatkowy czynnik prognostyczny w leczeniu czerniaka.

Streszczenie rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Madej pt. „Zaangażowanie kinazy RIPK4 w regulację szlaków NFκB oraz RAF/MEK/ERK” zostało zaakceptowane przez Promotora dr hab. Agnieszkę Wolnicką-Głubisz

Ewelina Madej

Agnieszka Wolnicka-Głubisz

Podpis Promotora

SUMMARY

Skin melanomas are malignant neoplasms derived from neuroectodermal melanocytic cells. In Poland, melanoma is relatively rare, however, is characterized by high mortality, which increases dramatically with the stage of the disease and is responsible for 73% of deaths caused by skin cancer.

It is estimated that in almost 90% of melanomas, signal transduction in the MAPK kinase pathway is disturbed, which in many cases is a consequence of mutations in the *BRAF* or *NRAS* genes. In addition, hyperactivation of the transcription factor NF κ B (p50/p65) is observed in many cases, leading to the initiation, progression, and metastasis of melanoma. Therefore, much more attention is being paid to the development of therapies based on the specific modulation of the activity of certain proteins whose proper function is impaired. Although great advances have been made in recent years in the diagnosis and treatment of melanoma, the effectiveness of these therapies still depends primarily on the stage of the primary tumor at the time of starting treatment. Furthermore, metastatic melanomas often develop resistance to commonly used treatments, which is mainly due to the heterogeneity and plasticity of melanoma cells.

Receptor-interacting protein kinase 4 (RIPK4) plays an important role in the development and smooth functioning of the epidermis. It is responsible for maintaining the balance between the differentiation and proliferation of keratinocytes by participating in signal transduction via PKC/NF κ B pathway. Furthermore, RIPK4 is involved in the signal transduction of important cellular signaling pathways, including the WNT and MAPK pathways, which are disrupted in many types of cancer. RIPK4 has an oncogenic and tumor-suppressive function depending on the type of cancer, indicating that the role of this kinase is context-dependent.

To date, the functional role of RIPK4 in melanoma has not been explored. Therefore, this study focuses on investigating the role of RIPK4 in signal transduction through the NF κ B and BRAF/MEK/ERK pathways and how this affects the invasive potential of melanoma cells. First, RIPK4 expression was higher in melanoma cells than in normal melanocytes. Analysis of the clinical material showed no correlation between RIPK4 levels and the advanced stage of the disease, which is due to the heterogeneous expression of this kinase.

Incubation of cells with a phorbol ester showed that melanoma cell migration regulated by the NF κ B pathway can be dependent (WM266.4) and independent (A375) of RIPK4 activity. This could be due to the different phenotypes of the analysis cells, which differ in terms of the

expression of PKC, a kinase involved in the activation of RIPK4. Regardless of the cell line, it was observed that the decrease in RIPK4 levels by specific siRNA can inhibit signal transduction through the NFκB pathway, resulting in slower cell migration. Studies have shown that melanoma cells with silencing of RIPK4 resulted in decreased transcript levels of fibronectin, MMP-9, and MMP-2 and thin microfilament bundles that were weakly anchored to focal adhesions. Furthermore, a reduction in the proliferation rate of melanoma cells was observed in vitro and in vivo, where cells with RIPK4 knockout obtained by the CRISPR-Cas9 technique were used for inoculation in mice.

The studies conducted also showed that RIPK4 is not involved in signal transduction through the BRAF/MEK/ERK signaling pathway in melanoma. On the other hand, the clinically used BRAF^{V600} inhibitors vemurafenib and dabrafenib reduce the level of RIPK4. Using the molecular docking method, it was confirmed that these inhibitors interact directly with RIPK4.

In conclusion, this study demonstrated that RIPK4 is involved in the NFκB signalling pathway in melanoma cells, which may play an oncogenic function and be an additional prognostic factor in the treatment of melanoma.

Streszczenie rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Madej pt. „Zaangażowanie kinazy RIPK4 w regulację szlaków NFκB oraz RAF/MEK/ERK” zostało zaakceptowane przez Promotora dr hab. Agnieszkę Wolnicką-Głubisz

Agnieszka Wolnicka-Głubisz
.....

Ewelina Madej