

Czerniak to wyjątkowo złośliwy nowotwór skóry. Zastosowanie selektywnych inhibitorów kinazy BRAF^{V600}, której obecność jest charakterystyczna dla 50-70% przypadków czerniaka, oraz MEK1/2 znacząco poprawiło odpowiedź kliniczną pacjentów z czerniakiem. Odpowiedź pacjentów jest zwykle ograniczona w wyniku oporności rozwijającej się podczas leczenia. Z kolei immunoterapia z wykorzystaniem tzw. inhibitorów punktów kontrolnych może prowadzić do długoterminowych efektów, ale jest związana z późną odpowiedzią u stosunkowo niewielkiej części pacjentów. W przypadku pacjentów z czerniakiem posiadającym dziką formę *BRAF*, w tym czerniaków z mutacją *NRAS*, sytuacja jest krytyczna ze względu na ograniczone możliwości terapeutyczne, jeśli nie można zastosować immunoterapii. Z tego powodu uzasadnione jest poszukiwanie nowych lub uzupełniających terapii w celu zwiększenia skuteczności leczenia pacjentów z czerniakiem. W 2022 roku opisano nowy rodzaj śmierci komórkowej zależnej od jonów miedzi – kuproptozę. Wrażliwość komórek nowotworowych na kuproptozę jest uzależniona od ich fenotypu metabolicznego, a dokładnie fosforylacji oksydacyjnej. Poniższy projekt skupia się na ocenie wrażliwości komórek czerniaka o różnym podtypie genetycznym (z mutacją *BRAF* lub *RAS*) na związki indukujące kuproptozę.

Celem projektu jest poszukiwanie związku między fenotypem metabolicznym komórek czerniaka, natywnym i modyfikowanym przez terapię w perspektywie krótkoterminowej oraz po uzyskaniu oporności, a wrażliwością komórek na związki indukujące kuproptozę. Jako model badawczy czerniaka wykorzystamy linie komórkowe z wariantem BRAF^{V600E} lub RAS^{Q61R}, wyprowadzone z guzów pobranych od pacjentów, które będą eksponowane na dabrafenib (inhibitor BRAF^{V600}) w skojarzeniu z trametynibem (inhibitor MEK1/2) lub trametynib zastosowany samodzielnie. Uzyskanie linii komórkowych czerniaka opornych na leki ukierunkowane molekularnie zastosowane w skojarzeniu zaplanowano w poniższym projekcie. Linie te zostaną również poddane ekspozycji na interferon- γ w celu odtworzenia układu badawczego naśladującego mikrośrodowisko guza związane z aktywnością układu immunologicznego. Ten układ doświadczalny stanowi zatem w pewnym zakresie odwzorowanie różnych scenariuszy klinicznych, dla których określona zostanie wrażliwość na związki indukujące kuproptozę. W celu lepszego odwzorowania warunków towarzyszących wzrostowi guza, zastosowany zostanie model *in vitro* z obniżonym stężeniem tlenu (6%, normoksja *in situ*). Uzyskane wyniki zostaną dodatkowo zweryfikowane w mysim modelu czerniaka (badania *in vivo*). Zostaną wykorzystane nowoczesne metody biologii molekularnej i komórkowej, w tym mikroskopia obrazująca żywe komórki, mikroskopia konfokalna, cytometria przepływowa, testy metaboliczne, qRT-PCR, Western blotting, edycja genu techniką CRISPR/Cas9 oraz nadekspresja genu. Zbadany zostanie wpływ białka ATOX1, które uczestniczy w wewnątrzkomórkowym transporcie jonów miedzi, na regulację wrażliwości komórek czerniaka na indukcję kuproptozy oraz powiązanie autofagii z kuproptozą.

Oczekiwany efekt realizacji projektu jest poznanie mechanizmów regulujących wrażliwość komórek czerniaka na nowy rodzaj śmierci komórkowej (kuproptozę) w układzie doświadczalnym, który odwzoruje określone scenariusze kliniczne. W szerszej perspektywie, uzyskana wiedza może przyczynić się do zastosowania związków selektywnie indukujących ten rodzaj śmierci komórki samodzielnie lub w skojarzeniu z dostępnymi lekami ukierunkowanymi molekularnie w celu poprawy odpowiedzi klinicznej pacjentów z czerniakiem.