

Streszczenie pracy doktorskiej w języku polskim

Tytuł pracy doktorskiej: **Epigenetyczne mechanizmy regulujące proliferację i oporność komórek nowotworowych na leczenie cytostatykami w badaniach *in vitro* oraz *in silico***

Mimo wielu lat badań nad biologią komórki nowotworowej, choroby nowotworowe wciąż pozostają nagłym problemem dla współczesnej medycyny. Światowa Organizacja Zdrowia podaje, że w 2020 roku na nowotwory zmarło około 10 milionów pacjentów, co podkreśla jak ważne jest opracowanie skutecznej terapii przeciwnowotworowej. Inwazyjność komórek nowotworowych determinowana jest zmianami na poziomie transkrypcji, które z kolei zależą od aktywności epigenetycznych enzymów regulujących dostępność chromatyny dla maszynarii transkrypcyjnej. Do takich enzymów zalicza się między innymi BRG1 i EP300. Pierwszy z nich jako podjednostka kompleksu SWI/SNF, odpowiedzialny jest za rozpoznawanie modyfikacji reszt histonowych takich jak acetylacje. Modyfikacje te z kolei wprowadzane są przez enzymy z grupy acetylotransferaz, których przedstawicielem jest acetylotransferaza EP300. BRG1 reguluje proliferację komórek poprzez determinowanie ekspresji genów zależnych od czynników E2F m.in. cykliny A oraz cykliny E. Ponadto wraz z białkami z rodziny retinoblastoma i deacetylazą histonową warunkuje aktywność cykliny A i cykliny E przez co determinuje przejście z fazy cyklu komórkowego G1 do fazy S. Ważnym aspektem jest także wpływ BRG1 na proces naprawy DNA. Wchodzi on w interakcję miejscami pęknięć DNA, gdzie rozluźnia chromatynę co umożliwia przyłączenie się białek związanych z naprawą uszkodzeń DNA. Ponadto pod wpływem niektórych cytostatyków odnotowano wzmożone oddziaływanie BRG1 z sekwencjami promotorowymi niektórych genów kodujących transportery z rodziny ABC, a jego inhibicja prowadziła do uwrażliwienia komórek nowotworowych na chemioterapię.

Proces nabywania oporności wielolekowej jest procesem złożonym. W procesie tym może dochodzić do hamowania transportu dokomórkowego leku, jego detoksykacji, stymulowania procesów naprawy uszkodzeń DNA, które indukowane są przez chemioterapeutyki, a także promowanie usuwania cytostatyków z komórki. Ostatni mechanizm jest w znacznym stopniu powiązany z aktywnością transporterów z rodziny ABC, które ulegają nadekspresji w komórkach lekoopornych. Jednym z powszechnie stosowanych w trakcie chemioterapii cytostatyków jest cisplatyna, która indukuje uszkodzenia DNA

prowadzące do aktywacji białka p53 i tym samym wprowadza komórki nowotworowe na ścieżkę apoptozy. Jednakże w literaturze można odnaleźć informacje, że p53 może być zaangażowane w regulowanie ekspresji niektórych transporterów ABC.

Celem niniejszej pracy było wyłonienie enzymu lub grupy enzymów epigenetycznych regulujących ekspresję kluczowych dla promowania inwazyjnego charakteru i ochrony przed uszkodzeniami DNA indukowanymi chemioterapią procesów komórkowych takich jak proliferacja, naprawa uszkodzeń, a także określenie ich roli w nabywaniu przez nowotwór oporności wielolekowej.

W pierwszym etapie badań porównywano transkryptom komórek nowotworowych linii przedinwazyjnego nowotworu piersi, MCF7 i MDA-MB-231 z transkryptomem prawidłowych komórek piersi. Analiza danych RNA-seq pozwoliła wyłonić szereg genów związanych z procesami proliferacji i naprawy uszkodzeń DNA, które ulegają nadekspresji w komórkach nowotworowych w odniesieniu do komórki prawidłowej. Następnie analizowano dane CHIP-seq, pod kątem modyfikacji reszt histonowych występujących w pobliżu regionów promotorowych genów wyłonionych w analizie danych RNA-seq. Analizy wykazały, że w pobliżu promotora badanych genów obecna jest acetylacja histonowych reszt lizyny, a same promotory zawierają wyspy CpG, jak i sekwencje rozpoznawane przez czynniki transkrypcyjne E2F. Ponieważ acetylotransferaza EP300 i członek kompleksu SWI/SNF – BRG1 zostały opisane w literaturze jako enzymy oddziałujące z promotorami genów związanych z naprawą DNA, które charakteryzowały się obecnością acetylacji, wysp CpG i miejscami wiązania czynników E2F w makrofagach ludzkich, postanowiono sprawdzić czy tożsama zależność ma miejsce także w komórkach nowotworu piersi. W serii eksperymentów wykazano, że BRG1 i EP300 wchodzi w fizyczną interakcję oraz regulują ekspresję genów związanych z proliferacją i naprawą uszkodzeń DNA w komórkach nowotworu piersi. Ponadto wykazano, że enzymy nasilają transkrypcję genów E2F-zależnych za pośrednictwem CDK4, a brak ich aktywności był związany z zatrzymaniem komórki w fazie G1 cyklu komórkowego i formacją kompleksu represora na promotorach trzech zależnych od BRG1-EP300 genów związanych funkcjonalnie z naprawą DNA.

W drugiej części pracy weryfikowano hipotezę o udziale białka PARP1 w regulacji aktywności BRG1-EP300 w komórkach nowotworu piersi. Analizy wykazały, że PARP1 występuje w części promotorów charakteryzujących się obecnością BRG1, wchodzi w fizyczną interakcję z BRG1-EP300, a inhibicja enzymatycznej aktywności PARP1 prowadzi do zahamowania ekspresji genów BRG1-EP300-zależnych. Ponadto wykazano, że ADP-

rybozylacja katalizowana przez białko PARP1 determinuje aktywność enzymatyczną EP300 i transkrypcję części genów, dla których EP300 działa jako aktywator.

Biorąc pod uwagę obecność BRG1 i acetylacji w regionach genów takich jak *ABCC5* i *ABCC10*, ostatnia część pracy poświęcona została określeniu transkrypcyjnej kontroli genów z rodziny ABC, które predysponują komórkę nowotworową do przeżycia w obecności chemioterapeutyków. Jako model do badań wybrano linię niedrobnokomórkowego raka płuca oporną na cisplatynę, która jest często stosowanym lekiem w przypadku tego rodzaju nowotworu. Wedle prezentowanego mechanizmu, pod wpływem uszkodzeń DNA indukowanych cisplatyną wzmacnia się interakcja p53 z DNA, która pośredniczy w rekrutacji EP300 do regionów promotorowych genu kodującego między innymi transporter *ABCC10*, co powoduje wzrost jego ekspresji. Promotory transporterów *ABCC3* i *ABCC4*, których nadekspresji nie obserwowano w linii odpornej na cisplatynę, charakteryzują się obecnością kompleksu CoREST co zapobiega wzrostowi transkrypcji genów *ABCC3* i *ABCC4* w odpowiedzi na cisplatynę a jego represyjny wpływ może być zahamowany przy pomocy inhibitorów LSD1 i HDAC.

W pracy opisano dwa nowe mechanizmy epigenetyczne, które regulują procesy proliferacji, naprawy uszkodzeń DNA i rozwoju oporności wielolekowej na cisplatynę w komórkach nowotworowych. Pierwszy mechanizm zakłada kluczowość kompleksu składającego się z BRG1, EP300 oraz białka PARP1 dla kontrolowania transkrypcji genów zaangażowanych w proliferację i naprawę uszkodzeń DNA w komórkach nowotworu piersi. Wykazano funkcjonalną zależność pomiędzy wymienionymi trzema enzymami, gdzie zahamowanie aktywności któregośkolwiek z nich prowadziło do znacznego spadku ekspresji kontrolowanych przez ten kompleks genów. Z kolei drugi mechanizm zakłada, że p53 oraz CoREST są bezpośrednio zaangażowane w regulację transkrypcji genów związanych z procesem usuwania z komórek nowotworowych chemioterapeutyków. Na powyższych przykładach zaprezentowano, że opisywane mechanizmy stanowią nie tylko cenne odkrycie naukowe, ale także mogą znaleźć zastosowanie w projektowaniu przyszłych terapii przeciwnowotworowych.

Marek Gubacki

Streszczenie pracy doktorskiej w języku angielskim

Title of the thesis: Epigenetic mechanisms regulating the proliferation and resistance of cancer cells to treatment with cytostatic drugs in in vitro and in silico studies

Despite the many years of research on the topic of cancer cell biology, the cancer remains an issue for modern medicine. The World Health Organization claims that in 2020 approximately 10 millions of patients died due to cancer what highlights that successful anti-cancer therapy is urgently needed. Invasive character of cancer cells is determined by alterations on the transcription level, which in turn, depend on the activity of particular epigenetic enzymes that are involved in chromatin availability regulation. Such enzymes include BRG1 and EP300. The first one, as a member of the SWI/SNF complex, is responsible for recognition of histone lysine residues modifications such as acetylations. These in turn, are introduced by enzymes belonging to the acetyltransferases family, that includes EP300. BRG1 determines proliferation of cells by regulating expression of E2F-dependent genes such as cyclin A or cyclin E. Moreover, in cooperation with RB-family proteins and histone deacetylase affects the G1/S cell cycle transition, through the impact on cyclin A and cyclin E activity. Of note, BRG1 is involved in DNA damage repair process. It interacts with DNA damage sites, where it unwinds the chromatin and allows for DNA damage repair machinery to bind. Notably, BRG1 was found to accumulate on the promoters of genes encoding ABC-family transporters, and its inhibition led to chemosensitization of cancer cells.

The phenomenon of cisplatin-resistance acquisition is a complex matter. During the process cancer cells adapt to either restrict cellular influx of a drug, its detoxication, chemotherapy-induced DNA damage repair mechanisms stimulation, as well as drug efflux enhancement. The latter mechanism is mainly connected to the activity of ABC-family transporters, expression of which is preferentially enhanced in chemo-resistant cancer cells. One of the most commonly prescribed cytostatic drugs is cisplatin, which acts as a DNA-damage inducer. The damage leads to activation of the p53 protein, that in turn predisposes cancer cells to the apoptotic pathway. Although literature states that p53 may be involved in regulation of expression of particular ABC transporters.

The aim of this thesis was to identify an enzyme or group of epigenetic enzymes determining expression of genes involved in crucial for invasive phenotype of cancer cell as well as protection from chemotherapy-induced DNA damage processes such as cancer cell proliferation, DNA damage repair and multidrug-resistance acquisition.

In the first stage of studies, the transcriptomes of ductal carcinoma in situ, MCF7, MDA-MB-231 were compared to the transcriptome of non-cancerogenic breast cells. RNA-seq data analysis resulted in identification of subset of genes overexpressed in cancer cells that are related to proliferation and DNA damage repair pathways. Next, the analysis of promoter sequences of genes discovered in the RNA-seq data analysis, based on ChIP-seq data shown presence of acetylated histones as well as prevalence of CpG islands and E2F transcription binding sites. Considering that the EP300 and a member SWI/SNF complex – BRG1 were previously described as enzymes interacting with promoters of genes involved in DNA damage repair that were characterized by histone acetylation, presence of E2F binding motives and CpG islands in human macrophages, we decided to check whether similar dependence occurs in breast cancer cells. In the series of experiments the physical interaction between BRG1 and EP300, as well as their involvement in regulation of genes related to cell proliferation and DNA damage repair pathways in breast cancer had been confirmed. Moreover, it was proposed that both enzymes enhance transcription of E2F-related genes through CDK4. On the other hand lack of their activity resulted in G1 arrest and repressor complex formation at promoters of involved in DNA damage repair BRG1-EP300-dependent genes.

In the second stage of analyses the hypothesis of PARP1 involvement in BRG1-EP300 regulation in breast cancer was challenged. Analyses showed that PARP1 interacts with portion of promoters recognized by BRG1. Importantly, as it engages in physical interaction with BRG1-EP300, inhibition of PARP1 enzymatic activity led repression of BRG1-EP300-dependent gene expression. Moreover, PARP1-dependent ADP-rybosylation determined enzymatic activity of EP300 as well as transcription activated by EP300.

Considering presence of BRG1 and histone acetylation at *ABCC5* and *ABCC10* gene promoters, the last part of the thesis have been dedicated to evaluate the matter of transcriptional control of genes encoding transporters ABC, that predispose cancer cell for survival while challenged to chemotherapy. As a cellular model the cisplatin-resistant variant of non-small cell lung cancer cell line was chosen, as cisplatin is commonly prescribed in case of aforementioned cancer type. According to proposed mechanism, under influence of cisplatin-induced DNA damage the p53 accumulates on the DNA. P53 mediates EP300

recruitment to the promoter site of *ABCC10* gene, which upregulates its expression. Promoters of *ABCC3* and *ABCC4* transporters are characterized by presence of CoREST complex, which restricts expression of *ABCC3* and *ABCC4* genes in response to cisplatin. The transcriptional repression may be reversed by HDAC and LSD1 inhibitors.

In the thesis, two new epigenetic mechanisms, which oversee cellular processes such as proliferation, DNA damage repair, and cisplatin resistance acquisition in cancer cells have been described. The first mechanism describes importance of a complex composed of BRG1, EP300 and PARP1 for transcriptional control of genes involved in cell proliferation and DNA damage response in breast cancer cells. The functional interdependence between all-three abovementioned enzymes was shown, while inhibition of either of them considerably repressed expression of genes remaining under BRG1-EP300-PARP1 control. The latter mechanism presents involvement of p53 and CoREST in transcriptional control of expression of genes functionally related to chemotherapeutic cellular efflux. The examples above demonstrate that the mechanisms described not only represent a valuable scientific discovery, but may also find application in the design of future anti-cancer therapies.

Macey Guback