

STRESZCZENIE

Spośród wszystkich nowotworów ginekologicznych, rak jajnika charakteryzuje się najwyższą śmiertelnością, około 40%. Związane jest to z trudnościami w prawidłowym rozpoznaniu, gdyż w początkowych stadiach daje on niespecyficzne objawy. Standardowa procedura leczenia obejmuje usunięcie masy guza i tkanek mogących zawierać przerzuty. Jednak gdy, nowotwór jest wysoce zaawansowany, interwencja chirurgiczna nie zawsze jest możliwa. W takiej sytuacji leczenie jest głównie oparte na chemioterapii – karboplatynie i taksanach. Leki zwiększają przeżywalność pacjentek w IV, najwyższym stadium, jednakże 5-letni wskaźnik przeżycia ciągle pozostaje na bardzo niskim poziomie. Tak wysoka śmiertelność wymusza potrzebę poszukiwania nowych strategii leczenia.

Olaparib, PARPi, stanowi długo oczekiwany krok naprzód w leczeniu raka jajnika z mutacją BRCA1/2. Inhibitor polimerazy poli (ADP-rybozy) (PARPi) prowadzi do akumulacji pęknięć jednoniciowych. Sprzyja to powstawaniu pęknięć dwuniciowych, a w przypadku nowotworów z mutacją BRCA1/2 niemożnością ich efektywnej naprawy, skutkując śmiercią komórki na drodze tzw. syntetycznej letalności. Jest to zjawisko, w którym wyłączenie dwóch lub więcej szlaków naprawy DNA silnie indukuje śmierć komórkową niż wyłączenie każdego ze szlaków pojedynczo. Aktywacja szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA prowadzi także do uruchomienia punktów kontroli cyklu komórkowego i zatrzymania podziałów, co uniemożliwia przekazanie uszkodzonego DNA do komórek potomnych. Pomimo to oporność na inhibitory PARP jest zjawiskiem często występującym. Z tego powodu m.in. bada się efektywność połączenia olaparibu z lekami przeciwnowotworowymi, które zakłócają szlak naprawy DNA poprzez rekombinację homologiczną (HR), wykorzystując inhibitory blokujące kinazę ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) lub CHK1 (checkpoint kinase 1). Oczekuje się, że takie podejście może prowadzić do zwiększenia skuteczności terapii opartej o inhibicję PARP.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena cytotoksycznego działania inhibitorów kinazy ATR (AZD6738, ATRi, ceralasertib) i CHK1 (MK8776, CHK1i) w skojarzeniu z inhibitorem PARPi (AZD2281, PARPi, olaparib) w trzech liniach komórkowych raka jajnika o zróżnicowanym profilu genetycznym – SKOV-3 – model *BRCA*^{WT} oporny na cisplatynę – konwencjonalną terapię stosowaną w leczeniu raka jajnika, OV-90 – model raka jajnika niskozróżnicowanego *BRCA*^{WT}, z mutacją *TP53* oraz PEO-1 – model raka jajnika niskozróżnicowanego z mutacją w genie *BRCA2*, predysponowany do leczenia PARPi.

Wykazano, że po dłuższym czasie inkubacji (5 dni) obie testowane kombinacje – PARPi+ATRi, jak i PARPi+CHK1i, działają synergistycznie w komórkach raka jajnika, a najbardziej optymalnym stężeniem związków jest to, w którym stosunek obu stosowanych inhibitorów wynosi 1:1 (0,5 μ M: 0,5 μ M). Zastosowanie kombinacji PARPi+ATRi oraz PARPi+CHK1i, po 5 dniowej inkubacji, prowadziło do nasilonej śmierci komórek raka jajnika, na drodze syntetycznej letalności. Wyniki te uzyskano stosując subletalne dawki związków, co sugeruje, że koncepcja stosowania terapii skojarzonej PARPi+ATRi oraz PARPi+CHK1i może przynosić potencjalne korzyści terapeutyczne w zastosowaniu klinicznym. Stwierdzono, że PARPi zwiększył zależność komórek raka jajnika od szlaku ATR/CHK1, w celu utrzymania stabilności genomu w linii *BRCA^{MUT}*. Test kometowy potwierdził genotoksyczne działanie monoterapii, jak i skojarzonego podania związków. Wykazano, że ilość uszkodzeń DNA indukowana przez PARPi, ATRi czy CHK1i oraz ich kombinacje jest zależna od czasu inkubacji. Proapoptotyczne właściwości badanych inhibitorów oszacowano na podstawie analizy aktywności kaspaz wykonawczych – 3 oraz 7. Kombinacje leków po 48 godzinach inkubacji spowodowały ich wzrost, sugerując, że jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za śmierć komórek raka jajnika poddanych działaniu badanych związków może być apoptoza.

Celem drugiej części badań było poznanie mechanizmu śmierci komórkowej indukowanej przez badane związki, w początkowej fazie odpowiedzi komórek na olaparib oraz inhibitory szlaku ATR/CHK (24 i 48 godzin). Stężenie związków zostało zwiększone do 4 μ M, przy jednoczesnym zachowaniu stosunku stężeń 1:1 w skojarzeniu. Kombinacje PARPi z ATRi/CHK1i nie były bardziej cytotoksyczne w porównaniu do odpowiednich monoterapii w badaniach prowadzonych do 48 godzin. Olaparib w krótkich czasach wykazywał działanie cytostatyczne w komórkach raka jajnika. Zdolność badanych inhibitorów do indukowania uszkodzeń DNA została potwierdzona, określając ekspresję markera uszkodzeń DNA, γ H2AX. W czasie 48 godzin i przy stężeniu 4 μ M olaparib okazał się niewystarczający do zwiększenia ekspresji tego białka, kombinacje leków natomiast prowadziły do większych zmian niż monoterapia PARPi. Ocenę właściwości proapoptotycznych przeprowadzono z wykorzystaniem następujących metod: szacując odsetek komórek apoptotycznych i nekrotycznych metodą podwójnego barwienia (Hoechst 33258/jodek propidyny), badając eksternalizację fosfatydyloseryny (wczesnego markera związanego z procesem apoptozy), mierząc kondensację chromatyny oraz ekspresję aktywnej formy efektorowej kaspazy-3. Wykazano, że po krótkim czasie działania, olaparib nie indukuje apoptozy w komórkach badanych linii. Nie wykazano zmian istotnych statystycznie pomiędzy kombinacjami leków PARPi+ATRi/PARPi+CHK1i a monoterapią ATRi/CHK1i. Na podstawie różnic w inkorporacji BrdU w linii PEO-1 stwierdzono zwiększenie liczby komórek we wczesnej fazie S, co może być oznaką stresu replikacyjnego. Terapia skojarzona nie wykazywała silniejszego wpływu na proliferację komórek niż monoterapia ATRi czy CHK1i. Uzyskane wyniki

sugerują, że uszkodzenia DNA, w tym DSB, nie prowadzą do natychmiastowej śmierci komórek raka jajnika traktowanych olaparibem, ATRi czy CHK1i. Komórki te, pomimo obecnych uszkodzeń DNA, mogą wejść przedwcześnie w mitozę, w wyniku czego dochodzi do powstania aberracji chromosomowych, co zostało potwierdzone podczas analizy mikrojader czy płytki metafazowej. Niestabilność chromosomów może wywołać katastrofę mitotyczną, będącą jednym z etapów pośrednich, prowadzących do śmierci komórek raka jajnika.

Dodatkowym etapem badań była ocena wpływu PARPi, ATRi, CHK1i oraz ich skojarzonego działania na potencjalny wzrost ekspresji glikoproteiny P, białka związanego z występowaniem zjawiska oporności wielolekowej. Badane inhibitory, zarówno w monoterapii, jak i w kombinacjach nie zwiększyły ekspresji białka MDR1 po 24 i 48 godzinach inkubacji. Dokonano również oceny ekspresji cytochromu c w celu rozszerzenia badań nad programowaną śmiercią komórki, indukowaną przez badane związki. Kombinacje PARPi+ATRi/CHK1i prowadziły do istotnego statystycznie wzrostu ekspresji cytochromu c jedynie w linii SKOV-3 po 48 godzinach inkubacji.

Przeprowadzone eksperymenty, stanowiące podstawę tej rozprawy doktorskiej potwierdziły, że skojarzone działanie PARPi+ATRi lub PARPi+CHK1i prowadzi do nasilonej śmierci komórek raka jajnika na drodze syntetycznej letalności, a także, że badane kombinacje hamują, zależnie od czasu, proliferację komórek raka jajnika i działają niezależnie od obecności mutacji *BRCA*. Wyniki te sugerują, że koncepcja stosowania terapii skojarzonej PARPi+ATRi oraz PARPi+CHK1i może przynosić potencjalne korzyści terapeutyczne w leczeniu raka jajnika.

ABSTRACT

Ovarian cancer has the highest mortality rate among gynaecological malignancies, which is approximately 40%. This fact is partly attributed to the difficulties in diagnosis, because of the non-specific symptoms it may give in the initial stages. The standard treatment procedure involves the removal of the tumour and tissues that may have metastasized, but when the cancer is highly advanced, the surgical procedure is not always possible. In such a situation, the treatment is mainly based on chemotherapy, which involves carboplatin and taxanes. These drugs increase the survival rate of patients suffering from the stage IV of ovarian cancer, but the 5-year survival rate still remains very low. Such high mortality rates necessitate the search for new treatment strategies.

Olaparib, PARPi, represents a long-awaited step forward in the treatment of BRCA1/2 mutated ovarian cancer. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor (PARPi) leads to the accumulation of single-strand breaks. This may cause double-strand breaks, which in BRCA1/2-mutated tumours cannot be repaired effectively, leading to tumour cell death by synthetic lethality. It is a concept in which a concurrent defects in two or more DNA repair pathways induce the cell death more strongly than each of the pathways separately. The activation of the DNA damage response pathway also triggers the activation of the cell cycle checkpoints and stops division and thus prevents the transmission of damaged DNA into daughter cells. Despite this fact the resistance to PARP inhibitors is a common phenomenon and because of that, the combination of olaparib with anticancer drugs that interfere with the homologous recombination (HR) DNA repair pathway through inhibitors that block ATR kinase (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) or CHK1 (checkpoint kinase 1) is being studied. It is expected that such an approach may lead to an increase in the effectiveness of the therapy based on the PARP inhibition.

This doctoral dissertation aimed to evaluate the cytotoxic effect of ATR kinase (AZD6738, ATRi, ceralasertib) and CHK1 (MK8776, CHK1i) inhibitors in combination with a PARPi inhibitor (AZD2281, PARPi, olaparib) in three ovarian cancer cell lines with a diverse genetic profile - SKOV-3 – *BRCA*^{WT} cisplatin-resistant – the conventional therapy used in the treatment of ovarian cancer, OV-90 – high-grade serous ovarian carcinoma *BRCA*^{WT} with *TP53* mutation and PEO-1 – high-grade serous ovarian carcinoma with a *BRCA2* mutation, predisposed to PARPi treatment.

It has been demonstrated that after a longer incubation time (5 days), both tested combinations - PARPi+ATRi and PARPi+CHK1i act synergistically in ovarian cancer cells, and the most effective concentration of compounds is the one in which the ratio of both inhibitors used is 1:1

(0.5µM: 0.5µM). PARPi+ATRi and PARPi+CHK1i combinations, after 5 days of incubation, led to the increased ovarian cancer cell death on the path of synthetic lethality. These results were obtained using sublethal doses of the compounds, which suggests that the concept of PARPi+ATRi and PARPi+CHK1i combined therapy may provide potential therapeutic benefits in a clinical use. PARPi was found to increase the reliance of ovarian cancer cells on the ATR/CHK1 pathway to maintain genome stability in the *BRCA^{MUT}* cell line. What is more, the comet assay confirmed the genotoxic effect of the monotherapy as well as the combined therapy of the compounds. It has been shown that the amount of DNA damage induced by PARPi, ATRi or CHK1i and their combinations is time-dependent. The proapoptotic properties of the tested inhibitors were estimated by the analysis of the activity of executive caspases - 3 and 7. The drug combinations after 48 hours of incubation caused an increase in caspase 3/7 ratio, suggesting that apoptosis may be one of the mechanisms responsible for the ovarian cancer cell death exposed to the tested compounds.

The second part of the study aimed to understand the mechanism of cell death induced by the tested compounds in the initial phase of the cell response to olaparib and ATR/CHK pathway inhibitors (24 and 48 hours). The concentration of compounds was increased to 4 µM, while maintaining a 1:1 ratio of compound concentrations in the combination. The combinations of PARPi with ATRi/CHK1i were not more cytotoxic compared to the respective monotherapies, up to 48 hours. Olaparib showed a cytostatic activity in the ovarian cancer cells after a shorter incubation time. The ability of the tested inhibitors to induce DNA damage was confirmed by determining the expression of the DNA damage marker, γH2AX. Within 48 hours and at a concentration of 4 µM, olaparib was insufficient to increase the expression of this protein, while drug combinations led to greater changes than PARPi monotherapy. The assessment of the proapoptotic properties was carried out using the following methods: by estimating the percentage of the apoptotic and necrotic cells by double staining (Hoechst 33258/propidium iodide), by examining the externalization of phosphatidylserine (an early marker associated with the process of apoptosis), by measuring chromatin condensation and the expression of the active effector form of caspase-3. It has been shown that after a short incubation time, olaparib does not induce apoptosis in the tested cell lines. There were no statistically significant differences between PARPi+ATRi/PARPi+CHK1i drug combinations and ATRi/CHK1i monotherapy. An increase in the number of cells in the early S phase was found based on differences in BrdU incorporation in the PEO-1 line, which may be a sign of replication stress. The combination therapy showed no greater effect on cell proliferation than ATRi or CHK1i monotherapy. The obtained results suggest that DNA damage, including DSB, does not immediately lead to the death of ovarian cancer cells treated with olaparib, ATRi or CHK1i. These cells may progress into mitosis, despite the presence of DNA damage, resulting in chromosomal aberrations, which has

been confirmed by the analysis of the micronuclei or metaphase spread. Chromosomal instability may lead to mitotic catastrophe, which is one of the intermediate steps, leading to the death of ovarian cancer cells.

An additional stage of the research was to assess the effect of PARPi, ATRi, CHK1i and their combination on the potential increase in the expression of the P-glycoprotein, a protein associated with the occurrence of multidrug resistance. The tested inhibitors, both in monotherapy and in combination, did not increase MDR1 protein expression after 24 and 48 hours of incubation both in monotherapy and in combination. The cytochrome c expression was also assessed to extend the research into programmed cell death induced by the tested compounds. It has been observed that the PARPi+ATRi/CHK1i combinations led to a statistically significant increase in the cytochrome c expression only in the SKOV-3 cell line after 48 hours of incubation.

The experiments conducted in this doctoral dissertation have confirmed that the combined action of PARPi+ATRi or PARPi+CHK1i leads to the increased death of the ovarian cancer cells by synthetic lethality. The tested combinations inhibit the proliferation of ovarian cancer cells in a time-dependent manner and act independently of the presence of a *BRCA* mutation. These results suggest that the concept of PARPi+ATRi and PARPi+CHK1i combination therapy may have potential therapeutic benefits in the treatment of ovarian cancer.