



**SZKOŁA DOKTORSKA
BioMedChem**

Uniwersytetu Łódzkiego
i Instytutów Polskiej
Akademii Nauk w Łodzi



Karolina Gronkowska

Praca doktorska:

**Rola kompleksu SWI/SNF-EP300 w
powstawaniu oporności komórek
nowotworowych na chemioterapię**

Doctoral thesis:

**The role of SWI/SNF-EP300 complex in
the development of cancer cell
resistance to chemotherapy**

- Promotor/Supervisor
dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz, prof. UŁ
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

*Składam serdeczne podziękowania dla **Pani dr hab. Agnieszki Robaszkiewicz, prof. UŁ**, za życzliwe i cierpliwe wsparcie, nieocenioną pomoc merytoryczną oraz inspirujące wskazówki, które towarzyszyły mi na każdym etapie przygotowywania niniejszej rozprawy doktorskiej.*

*Dziękuję również **pracownikom i doktorantom Katedry Biofizyki Ogólnej** za wsparcie oraz pozytywną atmosferę w pracy.*

*Z całego serca dziękuję również **mojemu partnerowi oraz przyjaciołom**, za ogrom wiary we mnie, okazane wsparcie oraz cierpliwość do mnie.*

Spis treści

1. Źródła finansowania pracy doktorskiej.....	7
2. Dorobek naukowy.....	7
3. Wstęp.....	15
3.1 Epidemiologia nowotworów.....	15
3.2 Terapie onkologiczne.....	15
3.3 Epigenetyka i terapie epigenetyczne nowotworów.....	19
3.4 Rola p300 w nowotworach.....	24
3.5 Rola koregulatora p300 – kompleksu SWI/SNF w nowotworach.....	27
3.6 Związek między ekspresją <i>EP300</i> a innymi regulatorami epigenetycznymi w nowotworach.....	30
4. Cel pracy i hipotezy badawcze.....	32
5. Rola kompleksu SWI/SNF-EP300 w nadekspresji frakcji lizosomalnej transporterów ABC i zwiększoną akumulacją leków w lizosomach.....	33
5.1 Materiały i metody	35
5.2 Omówienie najważniejszych wyników.....	37
5.3 Podsumowanie i wnioski.....	73
6. Rola kompleksu SWI/SNF-p300 w zdolności komórek nowotworowych do regulowania odpowiedzi transkrypcyjnej w wyniku aktywacji ścieżki ATM/ATR-Chk1/Chk2-p53 przez cisplatynę	74
6.1 Materiały i metody.....	77
6.2 Omówienie najważniejszych wyników.....	78
6.3 Podsumowanie i wnioski.....	92
7. Dyskusja.....	94
8. Literatura.....	102
9. Streszczenie pracy doktorskiej w języku polskim.....	120
10. Streszczenie pracy doktorskiej w języku angielskim.....	123

Załączniki:

1. Kopie manuskryptów włączonych do rozprawy doktorskiej
2. Oświadczenia współautorów manuskryptów włączonych do rozprawy doktorskiej

1. Źródła finansowania pracy doktorskiej

Badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej zostały sfinansowane z następujących źródeł:

- 1) Grant Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach konkursu LIDER X (LIDER/22/0122/L 10/18/NCBR/2019) pt. „Przełamywanie oporności wielolekowej nowotworów na poziomie genomu: opracowanie metody zapobiegającej nadekspresji transporterów ABC w komórkach nowotworowych opartej na inhibitorach enzymów remodelujących chromatynę”, kierownik: dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz, prof. UŁ
- 2) Grant UŁ Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza (IDUB) (IDUB60/2021) pt. „Potranslacyjne modyfikacje E2F wywołane aktywacją ścieżki ATM/ATR jako mechanizm warunkujący nadekspresję genów odpowiedzialnych za naprawę DNA w terapiach przeciwnowotworowych”, kierownik: dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz, prof. UŁ
- 3) Dofinansowania w ramach działalności naukowej doktorantów Szkoły Doktorskiej BioMedChem

2. Dorobek Naukowy

Niniejsza rozprawa doktorska oparta jest na artykule przeglądowym i artykule oryginalnym opublikowanych w recenzowanych czasopismach, artykule oryginalnym zaakceptowanym do publikacji oraz dwóch manuskryptach oryginalnych wysłanych do czasopism.

- 1) **Gronkowska, K.;** Robaszkiewicz, A. p300 dysregulation in cancers and its cross-talk with other epigenetic factors – a comprehensive review, *Mol Ther Oncol.* 2024 Sep 2;32(4):200871; doi: 10.1016/j.omton.2024.200871; IF:5,3, MNiSW:100
- 2) **Gronkowska, K.;** Michlewska, S.; Robaszkiewicz, A. Activity of lysosomal ABCC3, ABCC5 and ABCC10 is responsible for lysosomal sequestration of doxorubicin and paclitaxel-OregonGreen488 in paclitaxel-resistant cancer cell lines, *Cell Physiol Biochem* 2023; 57(5):360-378; doi: 10.33594/000000663.; IF:2,5, MNiSW:140
- 3) **Gronkowska, K.;** Michlewska, S.; Płoszaj, T.; Strachowska, M.; Stępień, A.; Borowiec, M.; Bednarek, A.; Robaszkiewicz, A. BRG1 targeting overcomes ABCC-

based multidrug resistance induced by paclitaxel, bioRxiv 2025.05.01.651609; doi: 10.1101/2025.05.01.651609 – w recenzji w The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics

- 4) **Gronkowska, K.**; Kołacz-Milewska, K.; Michlewska, S.; Płoszaj, T.; Borowiec, M.; Robaszkiewicz, A. HIF1A, BRG1, and p300 interaction confers paclitaxel-induced drug resistance by enabling the overexpression of ABCC genes, Mol Ther Oncol. doi:1016/j.omton.2025.201049; IF:5,3, MNiSW:100

- 5) **Gronkowska, K.**; Kołacz-Milewska, K.; Michlewska, S.; Robaszkiewicz, A. P53 supresses transcription of the p300-E2F1-dependent gene subset by maintaining KDM5B associated with gene promoters, bioRxiv 2025.08.25.672089; doi: 10.1101/2025.08.25.672089 – w recenzji w Nucleic Acids Research

Suma: IF = 13,1; 340 pkt MNiSW

Pozostały dorobek naukowy:

- 1) Strachowska, M.; **Gronkowska, K.**; Michlewska, S.; Robaszkiewicz, A. (2021). CBP/p300 Bromodomain Inhibitor-I-CBP112 Declines Transcription of the Key ABC Transporters and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapy Drugs. Cancers, 13(18), 4614 IF:6,575/ MNiSW:140

- 2) Sobczak, M., Strachowska, M., **Gronkowska, K.**, Karwaciak, I., Pułaski, Ł., Robaszkiewicz, A. (2021). LSD1 Facilitates Pro-Inflammatory Polarization of Macrophages by Repressing Catalase. Cells, 10(9), 2465. IF:7.666, MNiSW:140

- 3) **Gronkowska, K.**; Robaszkiewicz, A. Bioinformatyczna analiza miejsc wiązania enzymu LSD1 w różnych typach nowotworu piersi pozwala wyłonić jego możliwe transkrypcyjne kofaktory, rozdz.4 w: „Badania i Rozwój Młodych Naukowców w

Polsce Nauki medyczne i nauki o zdrowiu – Część I”, Redakcja naukowa dr Jędrzej Nyćkowiak, dr hab. Jacek Leśny, prof. UPWR, 2022, s. 28-34; MNiSW:5

- 4) **Gronkowska, K.**; Robaszkiewicz, A. Role of E2F family transcription factors and RB protein family in malignant transformation and cancer progression rozdz.5 w : „Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce Nauki medyczne i nauki o zdrowiu – Część I”, Redakcja naukowa dr Jędrzej Nyćkowiak, dr hab. Jacek Leśny, prof. UPWR, 2022, s. 35-40; MNiSW:5
- 5) Sobczak, M., Strachowska, M., **Gronkowska, K.**, Robaszkiewicz, A. (2022). Activation of ABCC Genes by Cisplatin Depends on the CoREST Occurrence at Their Promoters in A549 and MDA-MB 231 Cell Lines. *Cancers*, 14(4), 894. IF: 5.2, MNiSW:140
- 6) Strachowska, M.; **Gronkowska, K.**; Sobczak, M.; Grodzicka, M.; Michlewska, S.; Kołacz, K.; Sarkar, T.; Korszun, J.; Ionov, M.; Robaszkiewicz, A. (2023). I-CBP112 declines overexpression of ATP binding cassette transporters and sensitized drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines to chemotherapy drugs. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 168, 115798. IF:7.419, MNiSW: 140 pkt
- 7) Kołacz, K.; **Gronkowska, K.**; Robaszkiewicz, A. Post-translational protein modifications under cellular stress: Implications for DNA repair, *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce Przegląd badań Część I / Nyćkowiak Jędrzej, Leśny Jacek, Kłosiński Karol (red.)*, 2024, Poznań, Młodzi Naukowcy, s.86-91, MNiSW:5
- 8) Kołacz, K.; **Gronkowska, K.**; Robaszkiewicz, A. Post-translational modifications of the PARP1 protein in enzyme activation and function, *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce Przegląd badań Część I / Nyćkowiak Jędrzej, Leśny Jacek, Kłosiński Karol (red.)*, 2024, Poznań, Młodzi Naukowcy, s.79-85; MNiSW:5
- 9) Kołacz, K.; **Gronkowska, K.**; Strachowska, M.; Robaszkiewicz, A. (2024) Poliploidia jako rezultat terapii przeciwnowotworowych i przyczyna braku ich skuteczności. *Postępy biochemii*, 325 – 335. MNiSW:70 pkt

10) **Gronkowska, K.**; Kołacz-Milewska, K.; Skoczylas, S.; Nagy, E.; Jacenik, D.; Székvölgyi, L.; Robaszkiewicz, A.; Strachowska M. SMARCA1 Regulates PARP1-Dependent ABC Transporters Expression and Mediates Doxorubicin Resistance in Triple-Negative Breast Cancer. – w recenzji w *Biomedicine & Pharmacotherapy*

Suma: IF = 26,86; 650 pkt MNiSW

Komunikaty zjazdowe:

Międzynarodowe:

- 1) **Gronkowska, K.**; Robaszkiewicz, A. BRG1-dependent chromatin remodeling at the promoters of lysosome-localized ABC transporters confers multidrug insensitivity in paclitaxel-resistant non-small cell lung cancer cells, 11-14.06.2022 European Human Genetics Conference, Wiedeń, Austria
- 2) **Gronkowska, K.**; Płoszaj, T.; Robaszkiewicz, A. ATM/ATR-CHK1/CHK2-p53 signaling axis primes breast cancer cell for survival upon genotoxic stress caused by alkylating agent – cisplatin, 9-14.07.2022 The Biochemistry Global Summit, 25th IUBMB Congress, 46th FEBS Congress, 15th PABMB Congress, Lizbona, Portugalia
- 3) **Gronkowska, K.**; Robaszkiewicz, A. p53-EP300 interaction obviates the impact of drug-induced ATM/ATR-CHK1/CHK2-p53-p21 activation on the E2F-driven promoters of DNA repair genes 16-24.08.2022 FEBS/EMBO Lecture Course: Molecular Mechanisms of Signal Transduction and Cancer, Spetses, Grecja
- 4) **Gronkowska, K.**; Robaszkiewicz, A. Paclitaxel treatment induces BRG1-dependent chromatin remodelling at the promoters of lysosome-localized ABC transporters and confers multidrug resistance, 18-21.10.2022 FEBS Advanced Lecture Course: Danube Conference on Epigenetics, Budapeszt, Węgry
- 5) **Gronkowska, K.**; Michlewska, S.; Płoszaj, T.; Borowiec, M.; Robaszkiewicz, A. The influence of BRG1-dependent chromatin remodelling on the expression of lysosome localised ABC transporters in paclitaxel-resistant cancer cells, 27.08-01.09.2023 FEBS Advanced Lecture Course: Epigenomics, Nuclear Receptors and Disease, Spetses, Grecja
- 6) **Gronkowska, K.**; Płoszaj, T.; Michlewska, S.; Borowiec, M.; Robaszkiewicz, A. Enhanced lysosomal function in paclitaxel-resistant cancer cells is associated with BRM-

dependent chromatin remodelling at the promoters of lysosomal genes, 05-08.09.2023
Warsaw Conference on Perspectives of Molecular Oncology, Warszawa, Polska

7) **Gronkowska, K.**; Michlewska, S.; Płoszaj, T.; Kołacz, K.; Robaszkiewicz, A. BRG1 and HIF1A functional crosstalk defines transcription of ABC transporters in paclitaxel resistant cancer cells, 01-04.06.2024, European Human Genetics Conference, Berlin, Niemcy

8) **Gronkowska, K.**; Michlewska, S.; Płoszaj, T.; Kołacz, K.; Strachowska, S.; Borowiec, M.; Robaszkiewicz, A. HIF1A-EP300-BRG1 functional crosstalk on the chromatin defines transcription of ABC transporters in paclitaxel resistant breast and lung cancers, 26-29.06.2024 FEBS Young Scientist Forum, Pawia, Włochy

9) **Gronkowska, K.**; Michlewska, S.; Płoszaj, T.; Kołacz, K.; Strachowska, M.; Borowiec, M.; Robaszkiewicz, A. HIF1A-EP300-BRG1 functional crosstalk on the chromatin defines transcription of ABC transporters in paclitaxel resistant breast and lung cancers, 29.06-03.07.2024, 48th FEBS Congress, Mediolan, Włochy

10) **Gronkowska, K.**; Michlewska, S.; Płoszaj, T.; Strachowska, M.; Borowiec, M.; Robaszkiewicz, A. SWI/SNF inhibitor PFI3 and SMARCA2/4 PROTAC degrader ACBI1 as potential chemosensitizers in paclitaxel-resistant breast and lung cancers, 19-21.09.2024, VI Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Biologii Medycznej BIOLOGIA-MEDYCYNA-TERAPIA, Warszawa, Polska

11) **Gronkowska, K.**; Kołacz-Milewska, K.; Robaszkiewicz, A. Cisplatin-induced redistribution of p53 and p300 in the genome leads to activation of the subset of E2F1-dependent genes. 15-16.05.2025 10th International Doctoral Students' Conference in Life Sciences BioOpen, Łódź, Polska

Krajowe:

1) **Gronkowska, K.**; Stępień, A.; Aladdin, A.; Robaszkiewicz, A. Rola enzymów remodelujących chromatynę BRG1 i BRM w powstawaniu zjawiska oporności wielolekowej w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc. 26.11.2021 XIV Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa MŁODZI NAUKOWCY W POLSCE – BADANIA I ROZWÓJ, online

2) **Gronkowska, K.**; Michlewska, S.; Robaszkiewicz, A. Nadekspresja transporterów z podrodziny ABCC jest związana z lizosomalną sekwestracją leków w komórkach

nowotworowych wykazujących oporność na działanie paklitakselu. 13-14.04.2023, VIII Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen, Łódź, Polska

3) **Gronkowska, K.**; Michlewska, S.; Płoszaj, T.; Kołacz, K.; Borowiec, M.; Robaszkiewicz, A. Funkcjonalny kompleks BRG1-HIF1A reguluje transkrypcję transporterów ABC w komórkach nowotworowych opornych na paklitaksel, 14-15.03.2024, IX OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA BIOLOGII MOLEKULARNEJ, Łódź, Polska

Patenty:

1) Robaszkiewicz A, Sobczak M, Strachowska M, **Gronkowska K.** Inhibitor acetylotransferazy do zastosowania do leczenia niedrobnokomórkowego raka płuc. Numer prawa wyłącznego: Pat.245595.

Staże zagraniczne:

- 1) Węgry, Zakład Chemii Medycznej, Uniwersytet w Debreczynie, 26-30.06.2023, Nauka wykorzystania Opera Phenix® Plus High Content Screening System do ilościowych analiz z mikroskopii konfokalnej
- 2) Hiszpania, Katedra Chemii Organicznej i Chemii Nieorganicznej, Uniwersytet w Alcalá de Henares, 1-7.12.2024, Pogłębienie wiedzy z zakresu procesu syntezy związków do zastosowań biomedycznych i ich charakteryzacji

Kursy i szkolenia:

- 1) Czechy, Instytut Genetyki Molekularnej Czeskiej Akademii Nauk w Pradze, 18-23.06.2023, EMBO Practical Course: Super-resolution in light microscopy
- 2) Polska, Uniwersytet Rzeszowski, 13.05.2025, Warsztaty dla naukowców: ocena wniosków – posiedzenie zespołu ekspertów w NCN

Stypendia:

- 1) Grant wyjazdowy na European Human Genetics Conference 2022
- 2) Grant wyjazdowy na FEBS Advanced Lecture Course: Danube Conference on Epigenetics
- 3) Grant wyjazdowy na EMBO Practical Course: Super-resolution in light microscopy
- 4) Grant wyjazdowy na FEBS Advanced Lecture Course: Epigenomics, Nuclear Receptors and Disease

- 5) Grant wyjazdowy na European Human Genetics Conference 2024
- 6) Young Scientist Forum Fellowship 2024

Wyróżnienia i nagrody:

- 1) Nagroda za zajęcie II miejsca w Sesji Posterowej Młodych Naukowców podczas VI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biologii Medycznej BIOLOGIA-MEDYCYNA-TERAPIA
- 2) I Nagroda Naukowa Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za osiągnięcia w zakresie działań związanych z aktywnością publikacyjną i umiędzynarodowieniem kształcenia oraz pracy naukowej i badawczej

Wydarzenia popularyzujące naukę:

- 1) Robaszkiewicz, A.; **Gronkowska, K.**; Strachowska, M. 13.01.2023. Obieg wody i pokarmu w ekosystemie (warsztaty z ramienia Katedry Biofizyki Ogólnej, Noc Biologów)
- 2) Robaszkiewicz, A.; **Gronkowska, K.**; Kołacz, K.; Strachowska, M. 21.04.2023. Biologiczne gry strategiczne (warsztaty w ramach Festiwalu Nauki, Techniki i Sztuki)
- 3) Marcinkowska, M.; Dąbrzalska, M.; Okła, E.; **Gronkowska, K.**; Grodzicka, M.; Białecki, P.; Kołacz, K.; Piórecka, K.; Rycharska, P. 12.01.2024. Poznaj tajemnice życia z Panem Kleksem! (warsztaty z ramienia Katedry Biofizyki Ogólnej, Noc Biologów)
- 4) **Gronkowska, K.**; Kołacz, K.; Strachowska, M.; Robaszkiewicz, A. 05.04.2024. Czy chemioterapia leczy raka? (warsztaty w ramach DZIEŃ OTWARTY – WYDZIAŁ CHEMII ORAZ WYDZIAŁ BIOLOGII I OCHRONY ŚRODOWISKA)
- 5) Białecki, P.; **Gronkowska, K.**; Kołacz-Milewska, K.; Robaszkiewicz, A. 28.03.2025. Czy chemioterapia leczy raka? (warsztaty w ramach DZIEŃ OTWARTY – WYDZIAŁ CHEMII ORAZ WYDZIAŁ BIOLOGII I OCHRONY ŚRODOWISKA)

Inne formy prezentacji wyników:

- 1) Robaszkiewicz, A.; **Gronkowska, K.** 16.12.2022. Walka z lekoopornością, wystąpienie w materiałach promujących projekt Lider -TVP3, teleekspres
- 2) Robaszkiewicz, A.; **Gronkowska, K.**; Kołacz, K.; Strachowska, M. 20.05.2024. Wystąpienie w programie Łódzka Nauka -TVP3

Działania organizacyjne:

1) Prezentowanie Katedry Biofizyki Ogólnej podczas Drzwi Otwartych Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ (25.03.2023)

2) Działania podczas organizacji konferencji: 10th International Doctoral Students' Conference in Life Sciences BioOpen (15-16.05.2025). Członek komitetu naukowego: Inżynieria biomedyczna i medycyna molekularna

3. Wstęp

3.1 Epidemiologia nowotworów

Zgodnie z najnowszymi danymi Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (projekt GLOBOSCAN), zachorowalność na raka wyniosła około 20 milionów w 2022r., a śmiertelność z powodu raka 9,7 miliona [1]. Nowotwory zostały zakwalifikowane jako druga najczęstsza przyczyna zgonów na świecie [2]. Rak płuc był najczęściej diagnozowanym nowotworem w 2022 r. Odpowiadał on za prawie 2,5 miliona nowych przypadków (12,4% wszystkich nowotworów na świecie). Następnymi w kolejności były nowotwory piersi u kobiet (11,6%), jelita grubego (9,6%) i prostaty (7,3%). Rak płuc charakteryzował się również najwyższą śmiertelnością, z szacowaną liczbą 1,8 miliona zgonów (18,7%), a za nim wyróżnić można raka jelita grubego (9,3%), wątroby (7,8%) i piersi u kobiet (6,9%). Ponadto, statystyki przewidują wzrost zachorowalności na raka w nadchodzących dziesięcioleciach. Szacuje się, że w 2045 r. zdiagnozowanych zostanie 32,6 miliona nowych przypadków [1].

Znaczna część nowotworów charakteryzuje się wysoką śmiertelnością pomimo dostępności różnorodnych metod leczenia. Wysoka śmiertelność związana jest z ograniczeniami diagnostycznymi i zbyt późnym rozpoznawaniem chorób nowotworowych, brakiem dostępności do zaawansowanych metod leczenia dla osób o niskim statusie ekonomicznym oraz niską efektywnością terapii, która związana jest z powstawaniem oporności na leczenie [2,3].

3.2 Terapie onkologiczne

Chirurgia jest podstawą metodą leczenia pacjentów z guzami litymi. Pomimo resekcji chirurgicznej, wznowy oraz przerzuty pozostają powszechne i wiążą się z wysokim ryzykiem śmiertelności. Czynniki neuroendokrynne, immunologiczne i metaboliczne aktywowane w odpowiedzi na operację i/lub znieczulenie mogą promować przeżycie i proliferację komórek nowotworowych utrzymujących się po operacji, zarówno miejscowo, jak i w niezdiagnozowanych odległych lokalizacjach [4]. U pacjentów z pierwotnym nowotworem rutynowo występują krążące komórki nowotworowe, jednakże większość z nich docierając do układu krążenia jest szybko degradowana przez układ odpornościowy. Chirurgia indukuje zwiększone wydalanie komórek nowotworowych do krążenia, tłumi odporność przeciwnowotworową, umożliwiając przeżycie krążącym komórkom, i rekrutuje komórki odpornościowe zdolne do pułapkowania komórek

nowotworowych (pozakomórkowe pułapki neutrofilowe), indukuje zmiany w tkance docelowej, zwiększając ekspresję cząsteczek adhezyjnych, i w samych komórkach nowotworowych zwiększając ich migrację i inwazję. Wiele badań potwierdza hipotezę, że ostra odpowiedź zapalna na zabieg chirurgiczny sprzyja wychwytywaniu komórek nowotworowych w nowych lokalizacjach. Na przykład cytokiny prozapalne, takie jak IL-1 i TNF- α , mogą stymulować adhezję krążących komórek nowotworowych. Ponadto uwalniane katecholaminy, glikokortykosteroidy i prostaglandyny powstałe w odpowiedzi na uraz chirurgiczny mogą promować potencjał przerzutowy krążących komórek nowotworowych poprzez obniżenie odpowiedzi immunologicznej [5,6]. Katecholaminy i prostaglandyny dodatkowo zwiększają uwalnianie VEGF, MMP2, MMP9, IL-6 i IL-8, czynników, które nasilają neoangiogenezę, niezbędną do wzrostu guza [7]. Mitogeny, takie jak naskórkowy czynnik wzrostu wiążący heparynę, płytkowy czynnik wzrostu, TGF- β , podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów obecne w płynie z rany wspomagają proliferację przetrwałych komórek nowotworowych [8].

Dane eksperymentalne wykazały również, że środki znieczulające mogą bezpośrednio wpływać na mikrośrodowisko guza i jego wzrost. Wziewne środki znieczulające, w szczególności propofol, hamują funkcje komórek NK, rekrutację i polaryzację makrofagów oraz aktywację komórek dendrytycznych. Dodatkowo, niektóre związki znieczulające takie jak izofluran podnoszą poziom czynnika indukowanego hipoksją – HIF w komórkach nowotworowych, przyczyniając się do ich cytoprotekcji oraz promując angiogenezę poprzez sygnalizację VEGF [9,10]. Podobnie, wykazano, że stosowanie opioidów w celu kontrolowania bólu aktywuje reakcje na stres, tłumi odporność komórkową i humoralną, promuje angiogenezę przyczyniając się do powstania choroby przerzutowej [5,9]. Ponadto, często towarzysząca operacji transfuzja produktów krwiopochodnych może powodować immunosupresję poprzez wzrost produkcji prostaglandyn i tłumienie aktywności komórek NK [5].

Radioterapia jest metodą, w której wysokie dawki promieniowania elektromagnetycznego są stosowane w celu zniszczenia komórek nowotworowych [11]. Uszkodzenia komórek mogą powstać w wyniku bezpośredniej jonizacji DNA, powodującej pęknięcia pojedynczych lub podwójnych nici. Pęknięcia te mogą powodować mutacje, niestabilność genomową lub śmierć komórek, jeśli nie zostaną odpowiednio naprawione. Chociaż DNA jest głównym celem, inne biomolekuły, w tym białka i lipidy, są również bezpośrednio jonizowane, co prowadzi do szeregu uszkodzeń

molekularnych i komórkowych. Z kolei skutki pośrednie powstają, gdy promieniowanie wchodzi w interakcję z cząsteczkami wody w komórkach, wytwarzając reaktywne formy tlenu (ROS). ROS mogą uszkadzać składniki komórkowe, w tym lipidy, białka i kwasy nukleinowe, dodatkowo nasilając szkodliwe skutki ekspozycji na promieniowanie [12]. Ograniczeniem zastosowania radioterapii jest toksyczność wobec pobliskich zdrowych tkanek, która znacząco utrudnia możliwość zastosowania dawek terapeutycznych. Ponadto obserwuje się problem oporności na radioterapię, której kluczowym elementem jest obecność nowotworowych komórek macierzystych, charakteryzujących się wysoką zdolnością do naprawy uszkodzeń DNA, niskim poziomem reaktywnych form tlenu i wolnym tempem proliferacji [13]. Dodatkowo zmiany metaboliczne w komórkach nowotworowych prowadzą do oporności. Zmiany metaboliczne w kierunku glikolizy tlenowej przyczyniają się do produkcji antyoksydantu NADPH oraz aktywują szlaki naprawy DNA, chroniąc w ten sposób komórki nowotworowe przed uszkodzeniami wywołanymi promieniowaniem jonizującym [11,14].

Chemioterapia, metoda leczenia nowotworów za pomocą określonych związków chemicznych wykazujących działanie toksyczne w stosunku do komórek nowotworowych, jest jedną z najczęściej stosowanych metod leczenia nowotworów. Wśród powszechnie wykorzystywanych leków przeciwnowotworowych wyróżnić można: inhibitory mitotyczne (zatrzymujące podziały komórek poprzez wpływ na wrzeciono kariokinetyczne), związki alkilujące (uszkadzające DNA), antymetabolity (zastępujące lub hamujące określone metabolity wewnątrz komórek, a tym samym zakłócające metabolizm komórkowy np. antagoniści pirymidyny zastępujący typowe struktury obecne w RNA i DNA blokując syntezę kwasów nukleinowych) oraz inhibitory topoizomerazy I i II (blokujące aktywność topoizomeraz, zaburzając replikację DNA) [15,16]. Substancje chemiczne wykorzystywane w chemioterapii wykazują tendencję do działania na komórki nowotworowe charakteryzujące się szybkim tempem podziałów, ale wpływają również na prawidłowe szybko proliferujące komórki, takie jak komórki krwi, przewodu pokarmowego i mieszki włosowe [17]. Wybór leków stosowanych w terapii opiera się na wielu aspektach, takich jak typ i stadium nowotworu, ogólny stan zdrowia i wiek pacjenta oraz historia wcześniej stosowanych terapii. Opracowanie odpowiedniego schematu leczenia ma na uzyskanie maksymalnej skuteczności leczenia oraz minimalizacji działań niepożądanych [15]. Jednakże, występujące znaczące skutki

uboczne związane z chemioterapią oraz rozwój oporności stanowią główne wyzwania w leczeniu nowotworów.

Oporność komórek na chemioterapię dzieli się na wewnętrzną, występującą przed rozpoczęciem leczenia, oraz nabytą, rozwijającą się w trakcie terapii [18]. Wśród kluczowych mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój oporności można wyróżnić: zwiększoną zdolność do naprawy uszkodzeń DNA wywoływanych przez leki, obniżoną biodostępność leku (np. inaktywacja leku lub jego aktywne usuwanie z komórki) oraz aktywację szlaków przeciwdziałających apoptozie [18,19]. Dane pochodzące z badań *in vitro*, *in vivo* oraz badań klinicznych wskazują, że nabyta oporność na chemioterapię ma charakter progresywny, wieloczynnikowy i wiąże się z zaburzeniami genetycznymi i epigenetycznymi [20].

Rewolucyjne badania w dziedzinie biotechnologii umożliwiły identyfikację charakterystycznych cech komórek nowotworowych i przejście od badań klinicznych skoncentrowanych na dany typ nowotworu do badań ukierunkowanych na poszczególne cele molekularne [21]. Wśród głównych nurtów terapii celowanych wyróżnić można inhibitory lub przeciwciała, które specyficznie hamują szlaki przekazywania sygnałów zaangażowane we wzrost, proliferację i przeżycie komórek nowotworowych. Terapie hormonalne, takie jak antagoniści receptora estrogenowego (ER) i inhibitory aromatazy są stosowane w leczeniu hormonozależnych nowotworów. Inhibitory punktów kontrolnych układu odpornościowego (np. przeciwciała przeciwko białku programowanej śmierci komórkowej 1 (PD-1), ligandowi programowanej śmierci 1 (PD-L1) lub białku 4 związanemu z cytotoksycznymi limfocytami T (CTLA-4) aktywują odporność przeciwnowotworową gospodarza w sposób bezpośredni lub pośredni. Popularne stają się również terapie genowe (np. zastępowanie genów, wyciszanie genów, wirusy onkolityczne) i komórkowe (CAR-T, TCR-T, TIL, CAR-NK, TCR-T i CAR-M) [22–25]. Jednakże terapie celowane mają istotne ograniczenia. Pacjenci z ograniczonymi zasobami finansowymi mają utrudniony dostęp nie tylko do zaawansowanej diagnostyki, ale także do nowoczesnego leczenia. Dodatkowo, z powodu znacznej różnorodności między guzem pierwotnym a miejscami przerzutów, molekularne profilowanie tkanki nowotworowej pobranej z jednej zmiany nie zawsze odzwierciedla chorobę systemową [21]. Ponadto, podobnie jak w przypadku klasycznej chemioterapii, powstawanie oporności poprzez zmiany genetyczne (jak mutacje w cząsteczkach docelowych) oraz czynniki epigenetyczne (np. aktywacja kompensacyjnych szlaków sygnałowych czy

przeprogramowanie metaboliczne poprzez zmianę ekspresji genów) stanowią wyzwanie na drodze do skutecznego wyleczenia nowotworów [23].

Terapie kombinowane (lub multimodalne) stanowią standard obecnych terapii przeciwnowotworowych i dotyczą wszystkich schematów leczenia, w tym terapii celowanej, chemioterapii, radioterapii oraz chirurgii. Połączenie terapii przeciwnowotworowych jest atrakcyjne z klinicznego punktu widzenia z kilku powodów: terapia skojarzona poprawia wyniki leczenia i zapewnia lepsze efekty terapeutyczne, zwłaszcza gdy osiąga się synergiczne działanie przeciwnowotworowe; podejście skojarzone pozwala przewyciężyć heterogenność klonalną, co dodatkowo wiąże się z poprawą wskaźników odpowiedzi; skojarzone schematy leczenia zmniejszają toksyczność terapii, ponieważ umożliwiają stosowanie poszczególnych leków w zmniejszonych dawkach przy zachowaniu skuteczności terapeutycznej; terapie skojarzone ograniczają występowanie oporności na leki poprzez eliminację mechanizmów komórkowych związanych z opornością adaptacyjną [26]. Kombinacje synergiczne mogą opierać się na kilku zasadach, w tym na wielokrotnym celowaniu w szlak sygnałowy, hamowaniu kompensacyjnej regulacji sprzężenia zwrotnego, syntetycznej letalności, blokowaniu procesów komplementarnych oraz blokowaniu mechanizmów oporności [27].

Ponieważ oporności na terapie towarzyszą genetyczne i epigenetyczne zmiany w komórkach rakowych, zastosowanie klasycznych podejść czy nowoczesnych terapii celowanych w połączeniu z terapiami epigenetycznymi wydaje się obiecującym rozwiązaniem. Modyfikacje epigenetyczne są elastyczne i dynamiczne, co czyni je atrakcyjnymi celami terapeutycznymi, które mogą pomóc uzyskać preferowany profil transkryptomu w komórkach rakowych.

3.3 Epigenetyka nowotworów i terapie epigenetyczne

Nowotwory uważane są za złożoną grupę chorób, będących procesem wieloetapowym związanym z akumulacją zmian genetycznych. Powszechnie przyjęto, że mechanizmy epigenetyczne, które zmieniają wzorce ekspresji genów, nie zmieniając sekwencji DNA, również przyczyniają się do rozwoju i postępu nowotworów [28]. Podstawową jednostkę chromatyny tworzą nukleosomy, zbudowane z oktameru białek histonowych otoczonego 146 parami zasad DNA, które następnie ulegają dalszemu zwinięciu, tworząc struktury chromatyny wyższego rzędu. Dynamiczna organizacja

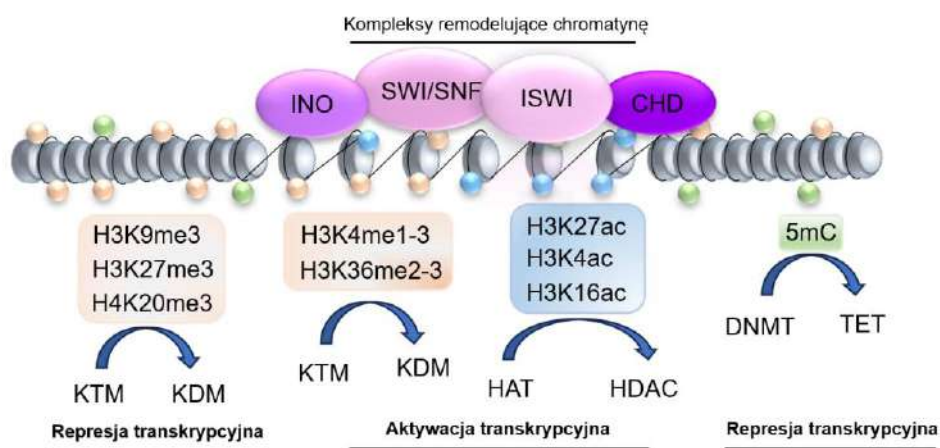
przestrzenna chromatyny ma kluczowe znaczenie dla regulacji ekspresji genów. Zwarty układ przestrzenny nukleosomów wywiera uniwersalny efekt hamujący na transkrypcję, podczas gdy otwarta struktura umożliwia kofaktorom i polimerazie RNA II dostęp do DNA i aktywację lub wzmocnienie transkrypcji genów [29].

Zmiany epigenetyczne można podzielić na trzy główne kategorie: modyfikacje kwasów nukleinowych (takich jak metylacja DNA), modyfikacje potranslacyjne (PTMs) ogonów histonów oraz modyfikacje ekspresji genów przez niekodujące RNA (np. miRNA i lncRNA). Pierwsze dwie grupy reprezentują kowalencyjne modyfikacje odpowiednio nukleotydów i reszt aminokwasowych, które zwykle współpracują, aby zintegrować regulacyjne sygnały i prowadzić do skoordynowanej zmiany struktury i funkcji chromatyny [30].

Modyfikacje ogonów histonowych obejmują acetylację, metylację, fosforylację, ADP-rybozylację, ubikwitynację, cytrulinację i sumoylację, które regulują strukturę i dynamikę nukleosomu poprzez bezpośrednią zmianę oddziaływań histon-histon lub DNA-histon oraz poprzez rekrutację enzymów remodelujących chromatynę [31–33]. Acetylacja jest najczęściej związana z aktywną transkrypcją, ponieważ neutralizuje dodatni ładunek reszt lizyny histonów, rozluźniając strukturę chromatyny i zwiększając jej dostępność dla polimerazy RNA i czynników transkrypcyjnych, inicjując lub wzmacniając trwającą transkrypcję [32,34]. Poziom acetylacji ogonów histonowych jest regulowany przez działanie dwóch rodzin enzymów: acetylotransferaz histonowych (HAT) i deacetylaz histonowych (HDAC). HAT katalizują przeniesienie grupy acetylowej z cząsteczek acetylo-CoA do grup ϵ -aminowych lizyny w N-końcowych ogonach histonów. HDAC usuwają grupy acetylowe, działając w większości przypadków jako represory ekspresji genów [35]. Metylacja ogonów histonowych, która polega na dodaniu jednej, dwóch lub trzech grup metylowych przez histonowe metylotransferazy lizyny (KMT) lub metylotransferazy argininy (PRMT), może zarówno promować, jak i hamować transkrypcję. KMT wykorzystują S-5'-adenozyl-L-metioninę (SAM) jako donor reszty metylowej do przeniesienia grup metylowych na reszty lizyny na ogonach histonów H3 i H4, podczas gdy demetylazy lizyny histonów (KDM) usuwają znaki metylacji [36,37]. H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K36me2 i H3K36me3 są związane z aktywacją transkrypcyjną, podczas gdy H3K9me3, H3K27me3 i H4K20me3 są uważane za markery represyjne [38]. Metylacja DNA zapobiega aktywacji transkrypcyjnej regionów genowych, które mają zostać wyciszone w sposób specyficzny

dla danego typu komórki. Reakcja ta jest katalizowana przez rodzinę metylotransferaz DNA (DNMT), które wykorzystują SAM jako donor metylu do tworzenia 5-metylocytozyny (5mC). Z kolei enzymy z rodziny translokacji 10-11 (TET) uczestniczą w demetylacji DNA w sposób pośredni, poprzez utlenianie 5-metylocytozyny [39].

Oprócz bezpośredniego wpływu na strukturę nukleosomów, acetylacja działa jako marker epigenetyczny, specyficznie rozpoznawany przez białka zawierające bromodomeny (m. in. BET). Identyfikują one acetylowane reszty histonów H3 i H4 i wykazują silniejsze do nich powinowactwo, gdy w peptydzie występują liczne acetylowane fragmenty o długości 1–5 aminokwasów. Spośród białek BET najlepiej zbadanym białkiem jest BRD4, które specyficznie wiążąc się z acetylowanymi ogonami histonów rekrutuje kompleksy SWI/SNF i CHD zaangażowane w zależny od ATP remodeling chromatyny [40]. Kompleksy remodelujące chromatynę, w tym rodziny SWI/SNF, CHD, ISWI i INO80, regulują dostępność DNA poprzez przesuwanie, wstawianie i usuwanie nukleosomów oraz zmianę wariantów histonów. Kompleks SWI/SNF reguluje usuwanie nukleosomów w celu aktywacji transkrypcyjnej, kompleks ISWI utrzymuje upakowanie chromosomów i reguluje wierność replikacji DNA, rodzina CHD kontroluje dostępność chromatyny w sekwencjach promotorowych oraz wzmacniaczy, z kolei kompleks INO80 reguluje naprawę DNA i zapewnia stabilność genomu [41]. Mechanizmy regulujące strukturę chromatyny zostały podsumowane na Rycinie 1 (Ryc.1).



Ryc.1 Skoordynowane wprowadzanie i usuwanie modyfikacji potranslacyjnych kształtuje strukturę chromatyny, umożliwiając regulację ekspresji genów. Na podstawie pracy przeglądowej: Gronkowska K. Robaszkiewicz A. Genetic dysregulation of EP300 in cancers in light of cancer epigenome control – targeting of p300-proficient and -deficient cancers. *Molecular Therapy Oncology*, Volume 32, Issue 4, 200871 [42].

Badania transkryptomyczne i genetyczne jednoznacznie wskazują na zmiany poziomu ekspresji epigenetycznych regulatorów oraz mutacje występujące w genach tych enzymów w wielu typach nowotworów. Co ciekawe, aktywność niektórych modyfikatorów chromatyny była podwyższona w niektórych typach nowotworów, a obniżona w innych, co sugeruje ich dwojaką rolę w nowotworach [43]. Zaburzenie równowagi pomiędzy enzymami wprowadzającymi modyfikację DNA i białek histonowych oraz enzymami usuwającymi te zmiany może przyczyniać się do aktywacji onkogenów, wyciszenia genów supresorowych nowotworów, promowania nieograniczonej proliferacji komórek, oporności na apoptozę, zmiany metabolizmu komórkowego oraz unikania rozpoznawania komórek nowotworowych przez komórki układu odpornościowego [44,45]. Ponadto, może aktywować czynniki oporności na chemioterapię, takie jak nadekspresję genów odpowiedzi na uszkodzenia DNA lub kodujących białka oporności wielolekowej [45].

Kilka inhibitorów enzymów epigenetycznych zostało zatwierdzonych przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) do leczenia raków. Wśród nich wyróżnić można inhibitory DNMT: azacytydynę i decytabinę; inhibitory HDAC: worinostat, romidepsynę, belinostat i panobinostat i inhibitor EZH2 – tazemetostat [29,46]. Dodatkowo, na etapie badań klinicznych znajdują się liczne inhibitory białek regulujących metylację reszt histonowych: EZH2, DOT1L, PRMT5 i LSD1; regulujących poziom acetylacji: p300/CBP, KAT6A, HDAC; oraz białek uczestniczących w regulowaniu dostępności chromatyny: BET, BRG1, BRM[46,47].

Jednakże, regulacja epigenetyczna nie dotyczy wyłącznie komórek rakowych. Jest ona niezbędna do utrzymania prawidłowego funkcjonowania komórek niezmiennych. Terapia ukierunkowana na regulatory ekspresji rodzi zatem istotne pytania dotyczące selektywności i skutków ubocznych niezamierzonego wyciszenia genów oraz toksyczności ogólnoustrojowej w zdrowych tkankach. Chociaż te same mechanizmy epigenetyczne występują zarówno w komórkach prawidłowych jak i nowotworowych, niektóre typy raka są uzależnione od określonych zmian epigenetycznych i są wrażliwe na ich regulację. W tych komórkach niewielkie odchylenia w równowadze epigenetycznej prowadzą do katastrofy komórkowej, która nie występuje w komórkach prawidłowych wyposażonych w alternatywne szlaki kompensacyjne. Dlatego też identyfikacja najbardziej krytycznych zmian epigenetycznych w różnych nowotworach jest ważnym aspektem przy wyborze terapii [46]. Chociaż monoterapia

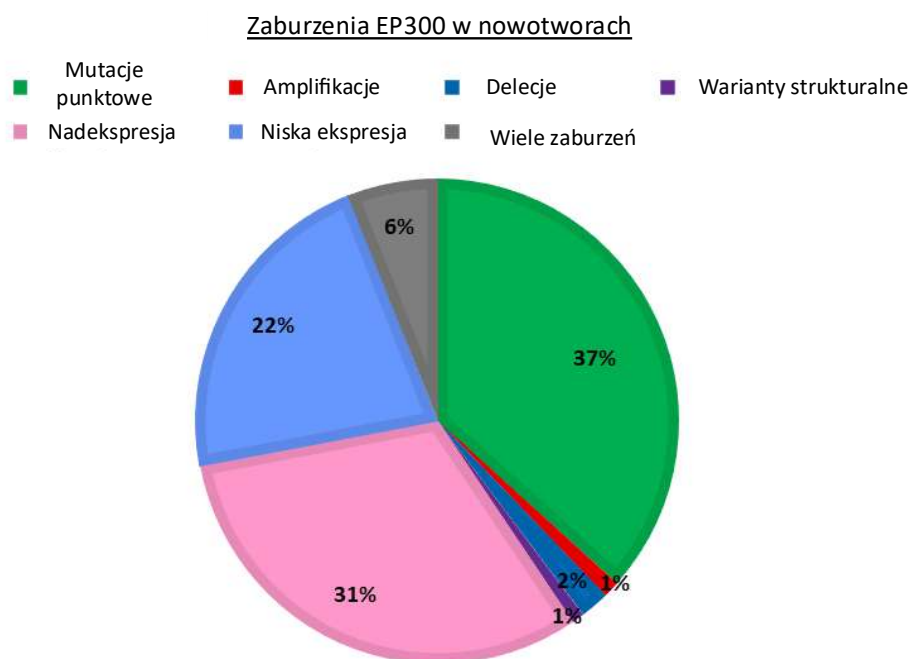
lekami epigenetycznymi wykazała wysoką skuteczność w leczeniu różnych rodzajów raka, związana była też z występowaniem skutków ubocznych. Coraz więcej badań wskazuje na potencjalne korzyści płynące z terapii skojarzonych, które obejmować miałyby leki epigenetyczne z innymi metodami terapeutycznymi, w tym z chemioterapią, radioterapią, terapią celowaną i immunoterapią [46]. Wykazano, że terapia skojarzona obejmująca inhibitory DNMT i HDAC jednocześnie indukuje ekspresję głównych genów supresorowych nowotworów i hamuje ekspresję kluczowych onkogenów, takich jak MYC i IRF4, wykazując większą skuteczność przeciwnowotworową niż zastosowanie monoterapii [29]. Niskie dawki inhibitorów DNMT oraz HDAC przeprogramowują komórki nowotworowe, aby reagowały na środki cytotoksyczne i przezwyciężyły oporność na chemioterapię [46,48]. Badania przedkliniczne wykazały, że celowanie w DNMT, HDAC, EZH2 lub BET może zwiększyć skuteczność radioterapii w hamowaniu wzrostu guza poprzez zakłócanie odpowiedzi na uszkodzenia DNA i cyklu komórkowego, a także poprzez zwiększenie stresu oksydacyjnego [46]. Inhibitory HDAC zwiększają skuteczność terapii inhibitorami kinaz w terapiach anti-EGFR i anti-mTOR [48]. Z kolei, inhibitory EZH2 oraz KAT6A są obiecującymi czynnikami uwrażliwiającymi w terapiach hormonozależnych raków [47]. Ponadto, hamowanie regulatorów epigenetycznych, takich jak DNMT, HDAC, LSD1, EZH2, SETDB1 i BET, może wywoływać różne efekty immunomodulacyjne, w tym zwiększoną ekspresję cząsteczek MHC klasy I, antygenów nowotworowych i ligandów PD-1 w komórkach nowotworowych oraz aktywację komórek odpornościowych, w tym komórek dendrytycznych i NK, poprawiając skuteczność immunoterapii [46,47].

Zmiany epigenetyczne zmieniają w wielu przypadkach wrażliwość komórek rakowych na terapie celowane, chemioterapię i radioterapię. Podkreśla to znaczenie terapii ukierunkowanej na epigenetykę jako skutecznej terapii uzupełniającej. Terapia skojarzona wykorzystująca różne mechanizmy epigenetyczne uwrażliwiające komórki rakowe jest bardziej atrakcyjna w porównaniu ze standardową monoterapią, ponieważ może zwiększyć skuteczność leczenia, zmniejszyć dawki czynników uszkadzających stosowanych w standardowych terapiach, co przełożyć się może na ograniczenie skutków ubocznych i minimalizować ryzyko nabywania oporności przez komórki rakowe [46].

3.4 Rola p300 w nowotworach

Białko wiążące acetylotransferazę E1A P300 (znane również jako p300 lub KAT2B) jest jednym z najczęściej zaburzonych HAT w nowotworach, a kodowane jest przez gen *EP300*. Aktywność tego białka jest ściśle związana z acetylacją H3K27 w miejscach wzmacniaczy. Mimo że p300 należy do rodziny acetylotransferaz histonowych, jego aktywność enzymatyczna nie ogranicza się wyłącznie do histonów. Reguluje również transkrypcję poprzez interakcję i acetylację innych białek związanych z chromatyną oraz elementów szlaków przekazywania sygnałów, odgrywając tym samym ważną rolę w proliferacji i różnicowaniu komórek. p300 oddziałuje z szerokim zakresem czynników transkrypcyjnych, w tym protoonkogenami (np. MYC [49], MYB [50] i GATA-3 [51]), supresorami nowotworów (takimi jak p53 [52,53], HIPK2 [54], i FOXO3 [55,56]) i innymi czynnikami transkrypcyjnymi, które mogą wpływać na kancerogenezę i progresję raka (między innymi E2F1 [57,58], PARP1 [59] oraz HIF1A [60]). Ponadto, p300 działa jako koaktywator receptorów jądrowych, takich jak receptor androgenowy i receptor estrogenowy, promując wzrost nowotworów zależnych od hormonów [61,62]

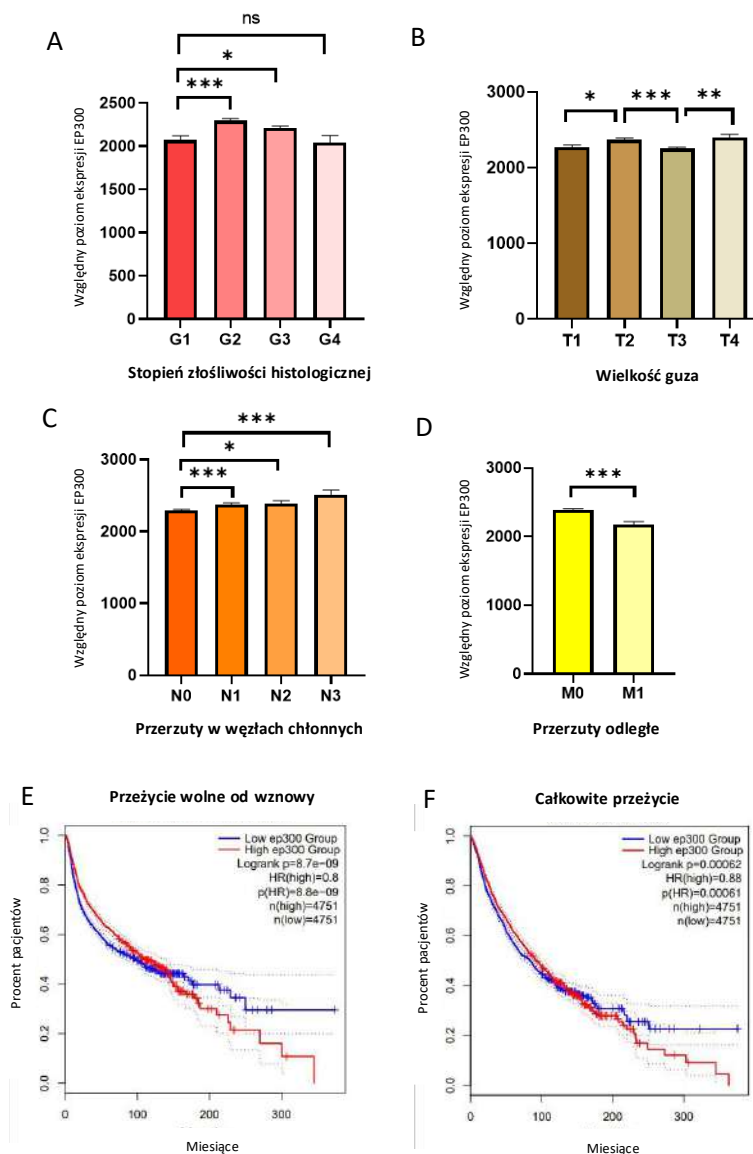
Wykonana przeze mnie analiza 32 zbiorów danych TGCA Pan-Cancer Atlas (10 967 próbek) z wykorzystaniem platformy cBioPortal for Cancer Genomics ujawniła mutacje *EP300* występujące z częstością około 10% w przebadanych próbkach rakowych (1083 próbki). Mutacje punktowe (37% próbek) oraz zmiany w ekspresji genów bez zmian genetycznych (wysoka ekspresja 31% i niska ekspresja 22%) stanowiły najczęściej występujące przypadki (Ryc. 2).



Ryc.2 Podsumowanie ilościowe zaburzeń EP300 na podstawie zbioru danych TCGA Pan-Cancer dostępnego na platformie cBioPortal. Na podstawie pracy przeglądowej: Gronkowska K. Robaszekiewicz A. Genetic dysregulation of EP300 in cancers in light of cancer epigenome control – targeting of p300-proficient and -deficient cancers. *Molecular Therapy Oncology*, Volume 32, Issue 4, 200871 [42].

Analiza potencjalnej zależności pomiędzy ekspresją *EP300* a stopniem złośliwości histologicznej pokazuje, że poziom mRNA genu jest wyższy w komórkach guza, które nie są w pełni zróżnicowane, ale maleje w guzach niezróżnicowanych (Ryc. 3A). Ponieważ p300 reguluje różne kluczowe funkcje fizjologiczne, w tym proliferację komórek, różnicowanie i przeprogramowanie komórek somatycznych, wyższa transkrypcja *EP300* i ogólna aktywność wewnątrzkomórkowa mogą ułatwiać inicjację i progresję guza na wczesnym etapie. P300 acetyluje czynniki transkrypcyjne związane z pluripotencją i zwiększa ich aktywność transkrypcyjną, promując w ten sposób nabywanie cech macierzystych. Poziom mRNA *EP300* nie koreluje z wielkością guza (Ryc. 3B), ale dodatnio koreluje z liczbą przerzutów do węzłów chłonnych (Ryc. 3C). Chociaż wysoka ekspresja *EP300* wydaje się sprzyjać zmianie fenotypu guza i zwiększać inwazyjność guza w węzłach chłonnych, odwrotną zależność zaobserwowano w

przypadku tworzenia przerzutów odległych, ponieważ guzy przerzutowe charakteryzowały się niższą ekspresją tego genu (Ryc. 3D).



Ryc. 3 Związek między ekspresją *EP300* a wybranymi parametrami klinicznymi. Na podstawie pracy przeglądowej: Gronkowska K. Robaszkiewicz A. Genetic dysregulation of EP300 in cancers in light of cancer epigenome control – targeting of p300-proficient and -deficient cancers. *Molecular Therapy Oncology*, Volume 32, Issue 4, 200871 [42].

Ekspresję EP300 porównano w guzach pacjentów różniących się stopniem złośliwości histologicznej (A), wielkością guza (B), występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych (C), przerzutami odległymi (D) na podstawie zestawów danych TCGA-Pan Cancer dostępnych w cBioPortal. Przeżycie wolne od wznowy (E) i całkowite przeżycie (F) pacjentów w zależności od ekspresji *EP300* wygenerowano za pomocą oprogramowania GEPIA 2.

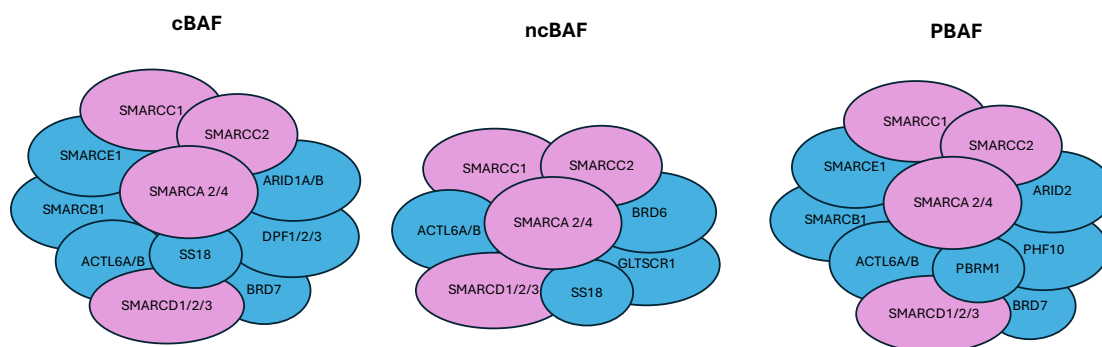
Jednakże przerzuty do węzłów chłonnych i przerzuty odległe mogą powstawać z niezależnych subklonów guza pierwotnego i wykazywać odmienne profile genetyczne w porównaniu z pierwotnym rakiem. Sugeruje to, że subklony guza charakteryzujące się niskim poziomem p300, są bardziej podatne na tworzenie przerzutów odległych, podczas

gdy komórki nowotworowe o wysokim statusie p300 atakują lokalne węzły chłonne. Zgadza się to również z obserwowaną współzależnością między ekspresją *EP300* a stopniem zaawansowania nowotworu, ponieważ komórki o wysokim stopniu zaawansowania, niezróżnicowane i o niższym poziomie p300, prawdopodobnie będą rozprzestrzeniać się dalej do odległych części ciała. Pomimo faktu, że niska ekspresja acetylotransferazy wydaje się sprzyjać powstawaniu przerzutów odległych, to wyższa ekspresja tego białka prowadziła do powstawania wznów (Ryc. 3E) i pogorszenia ogólnego wskaźnika przeżycia u pacjentów z chorobą nowotworową (Ryc. 3F).

Pogorszenia ogólnego wskaźnika przeżycia u pacjentów z wysoką ekspresją *EP300* może mieć związek z obniżeniem skuteczności terapii u tych pacjentów. Coraz więcej dowodów eksperymentalnych wskazuje, że lekooporność nowotworów może być warunkowana aktywnością p300. Sekwencje promotorowe transporterów ABC, które ulegają nadekspresji w liniach komórkowych raka piersi i płuc opornych na cisplatynę i odpowiadają za usuwanie leków z tych komórek, charakteryzują się wyższym poziomem acetylacji nukleosomów, co katalizowane jest przez p300. Uszkodzenie DNA wywołane przez cisplatynę aktywuje rekrutację p300 za pośrednictwem p53 do promotorów genu ABC, które nie są wyciszane przez kompleks CoREST [63]. p300 odgrywa też ważną rolę w naprawie DNA, ponieważ jest rekrutowane do miejsc pęknięć DNA, gdzie ułatwia naprawę uszkodzeń. Chociaż p300 nie przyczynia się bezpośrednio do naprawy uszkodzeń DNA, to działa jako kofaktor i moduł wiążący dla wielu białek biorących udział w szlakach naprawy DNA, takich jak PCNA, KU70 i KU80 [64].

3.5 Rola kompleksu SWI/SNF jako koregulatora p300 w nowotworach

Acetylacja ogonów histonu H3 regulowana między innymi przez p300 zwiększa powinowactwo kompleksu SWI/SNF do nukleosomów, zmieniając jednocześnie podjednostki SWI/SNF, które oddziałują z ogonem H3 [65]. Kompleks SWI/SNF wykorzystuje energię generowaną przez hydrolizę ATP do mobilizacji nukleosomów uczestnicząc w modyfikacji struktury chromatyny, przez co promuje lub hamuje ekspresję określonych genów. Bierze on między innymi udział w replikacji, utrzymaniu pluripotencji komórek macierzystych, odgrywa również kluczową rolę w szlakach naprawy DNA poprzez nasilenie rozluźnienie chromatyny w miejscach uszkodzeń [66].



Ryc. 4 Schematyczne przedstawienie różnych kompleksów SWI/SNF. Kolorem różowym zaznaczone elementy wspólne kompleksów.

Rodzina SWI/SNF dzieli się u ssaków na trzy podrodziny: kanoniczną BAF (cBAF), niekanoniczną BAF (ncBAF) i polibromo-związaną BAF (PBAF) (Ryc.4). Mimo, że SMARCC1, SMARCC2, SMARCD1/2/3 oraz ATPazy BRG1 (kodowana przez *SMARCA4*) lub BRM (kodowana przez *SMARCA2*) są wspólnymi podjednostkami rdzeniowymi, każdy kompleks posiada dodatkowe podjednostki, które nadają mu specyficzną tożsamość funkcjonalną [67]. cBAF obejmuje ARID1A lub ARID1B oraz DPF1, DPF2 lub DPF3, które są kluczowe dla sekwencji wzmacniaczy i superwzmacniaczy. ncBAF nie obejmuje białek SMARCB1 ani ARID, zamiast tego BRD9 służy jako jego specyficzny czynnik tego kompleksu. PBAF jest zlokalizowany w aktywnych promotorach i charakteryzuje się obecnością: PHF10, PBRM1, ARID2 i BRD7 [66].

Jako główne składniki kompleksu można wyróżnić ATPazy, BRG1 i BRM. Domeny ATPazy BRG1 i BRM pośredniczą w wiązaniu nukleosomów i umożliwiają ich przesuwanie, usuwanie i wstawianie poprzez hydrolizę ATP. Strukturalnie BRG1 i BRM są bardzo podobne, ale mogą wykazywać funkcje tkankowo-specyficzne. Białko kodowane przez *SMARCA4* ma kluczowe znaczenie dla rozwoju organizmu i jest powszechnie spotykane w większości wariantów kompleksów SWI/SNF, szczególnie w kompleksach BAF i PBAF. Białko kodowane przez *SMARCA2* ulega ekspresji głównie w sposób tkankowo-specyficzny, na przykład w mózgu i wątrobie, gdzie występuje w kompleksach odmiennych od tych zawierających BRG1 [66].

Sekwencjonowanie rakowych genomów wykazało niezwykle wysoką częstość występowania mutacji w genach kodujących podjednostki kompleksów remodelujących chromatynę SWI/SNF, przy czym prawie 25% wszystkich nowotworów wykazuje aberracje w jednym lub większej liczbie tych genów [67]. Liczne badania pokazują, że mutacje powodujące utratę funkcji SWI/SNF są czynnikami wywołującymi wiele

nowotworów u ludzi. Dodatkowo, utrata podjednostek SWI/SNF często koreluje z bardziej agresywnymi nowotworami [68]. Wykazano, że inaktywujące mutacje w genach *ARID1A*, *ARID1B*, *PBRM1* promują postęp nowotworu głównie poprzez deregulację kontroli cyklu komórkowego. Mutacje w *ARID2*, *SMARCB1* i *SMARCA4* nasilają proliferację komórek nowotworowych i sprzyjają ich inwazyjności [66,69]. Co ciekawe, białka powstające z *ARID1A* i *ARID1B* tworzą parę syntetycznie letalną, w której utrata *ARID1A* sprawia, że komórki nowotworowe są zależne od *ARID1B*. Celowanie w *ARID1B* w rakach z mutacją w *ARID1A* indukuje śmierć komórek i hamuje wzrost guza. Podobnie, zablokowanie BRM w komórkach nowotworowych z niedoborem BRG1 powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego i śmierć komórek nowotworowych [66]. Ponadto, wykazano, że p300 może tworzyć pary syntetycznie letalne z *ARID1A*, *ARID1B*, *ARID2*, *PB1*, *BRG1* i *SNF5* [70].

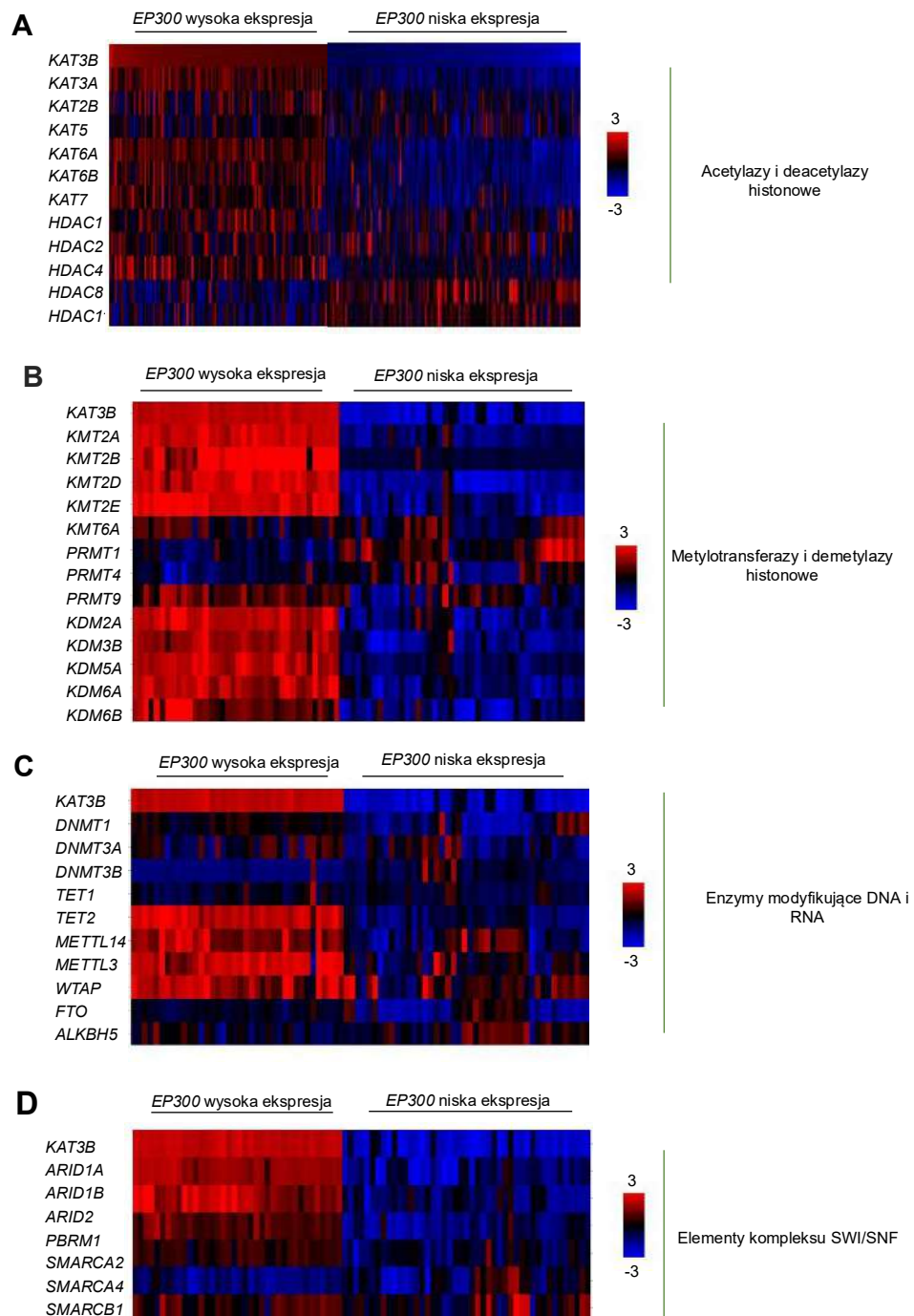
Nie tylko mutacje, ale także zmiany w ekspresji określonych podjednostek SWI/SNF mogą być uznawane za markery prognostyczne przeżycia. Na przykład u pacjentów z rakiem wątrobowokomórkowym lub rakiem szyjki macicy obniżenie ekspresji *SMARCA2* i *ARID1A* wiąże się z niekorzystnym całkowitym przeżyciem [71]. Obniżenie ekspresji *SMARCA2* hamuje jego funkcję supresora nowotworu, upośledza naprawę DNA i wpływa na różnicowanie i adhezję komórek [69]. Utrata funkcji *ARID1A* przyczynia się do charakterystycznych cech raka, takich jak niestabilność genomowa, przejście epitelialno-mezenchymalne, unikanie odpowiedzi immunologicznej i unikanie mechanizmów śmierci komórkowej [72]. Jednak związek między obniżoną ekspresją oraz inaktywacją poprzez mutacje a złym rokowaniem nie jest uniwersalny. Ostatnie doniesienia wskazują, że nadmierna ekspresja podjednostek kompleksu SWI/SNF, może sprzyjać rozwojowi guza, tj. mogą one również działać jako onkogeny [68]. Zwiększony poziom *SMARCC1* [69], *SNF5* [73], *ARID1A* [74] *BRM* [75] i *BRG1*[76] promują progresję niektórych typów nowotworów.

Ponadto, kompleks SWI/SNF uczestniczy w warunkowaniu oporności raków na terapię. Aktywność ATPaz *BRM* i *BRG1* odgrywa kluczową rolę w oporności na inhibitor EGFR osimertynib [77]. *SMARCC2* i *BRG1* są zaangażowane w regulowanie genów związanych z opornością na lek przeciwandrogenowy enzalutamid [78]. *BRG1* i *BRM* regulują odpowiedź na powszechnie wykorzystywane chemioterapeutyki. Aktywność *BRM* została powiązana z opornością na cisplatynę [79] i gemcytabinę [75]. Natomiast *BRG1* – z opornością na doksorubicynę [80].

3.6 Związek między ekspresją *EP300* a innymi regulatorami epigenetycznymi w nowotworach

W celu porównania ekspresji *EP300* oraz innych regulatorów epigenetycznych przygotowałam mapy cieplne wykorzystując dane TGCA Pan-Cancer Atlas (ICGC/TCGA, Nature 2020), zdeponowane w cBioPortal. Dane wskazują, że wysokiemu poziomowi mRNA *EP300* towarzyszy wysoki poziom ekspresji innych acetylotransferaz histonowych, metylotransferaz lizyny histonowej, demetylaz histonowych, metylotransferaz RNA i podjednostek SWI/SNF, a także represja HDAC-ów, metylotransferaz argininowych histonów i metylotransferaz DNA (Ryc.5). Wysokiemu poziomowi mRNA *EP300* towarzyszy wysoka ekspresja innych acetylotransferaz histonowych, takich jak *KAT2B*, *KAT5*, *KAT6A*, *KAT6B* i *KAT7*, a także represja antagonistycznych HDAC-ów: *HDAC2*, *HDAC4*, *HDAC8* i *HDAC11* (Ryc. 5A). Sugeruje to, że komórki nowotworowe z dużą ilością p300 mogą być podatne na podwyższony poziom acetylacji histonów, jednocześnie wykazując osłabione mechanizmy zapobiegania nadmiernej ekspresji genów wywołanej acetylacją. Co ciekawe, zarówno metylazy histonowe, takie jak *KMT2A*, *KMT2D* i *KMT2E*, jak i demetylazy, takie jak *KDM2A*, *KDM3B*, *KDM5A* i *KDM6A*, wykazują dodatnią korelację z wysoką ekspresją *EP300* w badaniu TGCA Pan-Cancer Atlas (Ryc. 5B). Enzymy te, odpowiednio wprowadzają znaczniki promujące transkrypcję i usuwają modyfikacje represyjne. Choć to enzymy o przeciwstawnych funkcjach, tworzą pętlę regulacyjną, która kontroluje ekspresję genów. Acetylacja histonów H3 i H4 często współwystępuje z aktywującymi znacznikami metylacji. Odmienną zależność zaobserwowano w przypadku metylotransferaz arginiowych *PRMT1* i *PRMT4*, które są uważane za enzymy promujące transkrypcję, ale ich aktywność wobec substratów niehistonowych musi być również brana pod uwagę przy przewidywaniu ich funkcjonalnej interakcji z p300. Nowotwory z wysoką ekspresją *EP300* charakteryzują się profilem promującym ekspresję genów, który zaczyna się od obniżonego poziomu *DNMT3B* i zwiększonego poziomu *TET2*, co może powodować hipometylację podzbioru promotorów genów, promując w ten sposób środowisko sprzyjające transkrypcji. Ponadto, receptory m6A, takie jak *METTL3*, *METTL14* i *WTAP*, wpływają na wydajność składania mRNA i dojrzewania RNA (Ryc.5C). Ekspresja *EP300* dodatkowo koreluje z podjednostkami kompleksu remodelującego chromatynę SWI/SNF, takimi jak *ARID1A*, *ARID2*, *PBRM1* i *SMARCB1* i potencjalnie ułatwia transkrypcję genów zależną od p300. Remodelowanie chromatyny

przeprowadzane przez SWI/SNF najprawdopodobniej wiąże się z BRM w nowotworach z nadmierną ekspresją *EP300*, ponieważ ekspresja innej ATPazy tego kompleksu — BRG1 jest stosunkowo niska (Ryc. 5D).



Ryc. 5 Ekspresja *EP300* koreluje z innymi regulatorami epigenetycznymi. Na podstawie pracy przeglądowej Gronkowska K. Robaszkiewicz A. Genetic dysregulation of *EP300* in cancers in light of cancer epigenome control – targeting of p300-proficient and -deficient cancers. *Molecular Therapy Oncology*, Volume 32, Issue 4, 200871 [42].

Mapa cieplna przedstawiająca współekspresję *KAT3B* (*EP300*) z (A) innymi acetylotransferazami (KAT) i deacetylazami (HDAC), (B) metylotransferazami histonowymi (KMT, PRMT) i demetylazami (KDM), (C) metylotransferazami i demetylazami DNA i RNA oraz (D) niektórymi podjednostkami SWI/SNF w różnych nowotworach zdeponowanych w zbiorze TGCA Pan-Cancer Atlas (Pan-cancer analysis of whole-genome (ICGC/TCGA, Nature 2020) w cBioPortal.

4. Cel pracy i hipotezy badawcze

Celem badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej jest poznanie roli kompleksu SWI/SNF- p300 w powstawaniu zjawiska oporności nowotworów związanego:

- 1) z nadekspresją frakcji transporterów ABC, która wzrasta w lizosomach, powodując zwiększoną akumulację leków w tych organellach (część 1 pracy)
- 2) ze wzrostem ekspresji genów funkcjonalnie powiązanych z odpowiedzią na uszkodzenia DNA, wywołanym aktywacją ścieżki ATM/ATR-Chk1/Chk2-p53 (część 2 pracy)

Pracy przyświecały następujące hipotezy badawcze:

- 1) Oporność komórek nowotworowych na paklitaksel jest warunkowana aktywnością kompleksu SWI/SNF-p300, który odpowiada za nadekspresję transporterów ABC, w szczególności ich frakcji ulegającej wzrostowi w lizosomach
- 2) Kompleks SWI/SNF-EP300 uczestniczy w transkrypcyjnej aktywacji niektórych genów związanych z naprawą DNA w odpowiedzi na indukowaną cisplatiną aktywację szlaku ATM/ATR-CHK1/2-p53
- 3) Aktywacja ATM/ATR-CHK1/2-p53 przez cisplatinę powoduje zmiany w profilu modyfikacji potranslacyjnych E2F1

Niniejsza praca ma na celu odpowiedź na niektóre otwarte pytania, jakie występowały we współczesnych badaniach nad epigenetycznymi mechanizmami oporności komórek nowotworowych na terapię, w szczególności pod kątem możliwego, późniejszego wykorzystania wyników w nowych strategiach terapeutycznych.

5. Rola kompleksu SWI/SNF-EP300 w nadekspresji frakcji lizosomalnej transporterów ABC i zwiększonej akumulacji leków w lizosomach (część 1)

Paklitaksel (PTX) jest ważnym lekiem pierwszego rzutu w leczeniu zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC) i niektórych postaci raka piersi takich jak przerzutującego raka piersi i potrójnie ujemnego raka piersi (TNBC) ze względu na brak specyficznych markerów dla terapii celowanej. W przypadku TNBC predysponujący do terapii paklitakselem jest brak receptorów estrogenowych, progesteronowych i HER2. U ponad 85% pacjentów z rakiem płuca rozpoznaje się niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC), a u 60% z nich stosuje się standardowy schemat chemioterapii oparty często na wykorzystaniu paklitakselu ze względu na zaawansowane stadium choroby [81–84].

PTX należy do grupy inhibitorów mitotycznych. Związek ten, wiążąc tubulinę, promuje akumulację dimerów tubuliny i stabilizuje włókna mikrotubul, co zapobiega prawidłowemu tworzeniu wrzeciona kariokinetycznego, zatrzymując cykl komórkowy w mitozie i indukując apoptozę [85]. Jednakże oporność indukowana paklitakselem prowadzi do niepowodzenia leczenia i nawrotu nowotworów. Do najczęściej wymienianych mechanizmów oporności na paklitaksel należą: zmienione szlaki apoptozy, zwiększony metabolizm leków, mutacje i zmiany w składzie tubuliny, zmniejszone wchłanianie leku oraz nadmierna ekspresja transporterów ABC, mogących usuwać lek poza komórkę [85,86]. Nowe badania wykazały także, że wzmożona aktywność lizosomów ma kluczowe znaczenie dla oporności komórek nowotworowych na paklitaksel [87]. Mechanizmy prowadzące do zwiększonej aktywności lizosomalnej względem leków przeciwnowotworowych nie zostały w pełni poznane. W przypadku leków słabo zasadowych przyjęto, że za ich akumulację w lizosomach odpowiada pH ich wnętrza, które jest znacząco niższe w komórkach charakteryzujących się opornością, co skutkuje zwiększoną różnicą pH między lizosomem a cytoplazmą. Do lekko zasadowych leków przeciwnowotworowych mogących akumulować się wewnątrz lizosomów należą między innymi doksorubicyna, daunorubicyna lub mitoksantron [88]. Wykazano, że w odpowiedzi na powtarzającą się ekspozycję komórek na paklitaksel, komórki nowotworu płuca gromadziły więcej paklitakselu Oregon Green® 488 w lizosomach i cytoplazmie w porównaniu z komórkami wrażliwymi [89]. Jednakże ładunek i struktura tego związku wskazuje, że nie może on wnikać do lizosomów w wyniku biernej dyfuzji. Wcześniejsze doniesienia literaturowe wskazywały na obecność ABCB1 w lizosomach, co

odpowiadało za oporność komórek na Brentuksymab vedotin. Ponadto, inne transportery takie jak ABCC2, ABCC3 i ABCC4, zaobserwowano w lizosomach niektórych linii komórkowych, jednakże ich rola w oporności wynikającej z akumulowania leków w lizosomach nie została poparta dowodami eksperymentalnymi [90].

Wiele z mechanizmów oporności na leki zachodzi na poziomie epigenetycznym i wiąże się z modyfikacją szlaków sygnałowych, które następnie modulują aktywność czynników transkrypcyjnych i enzymów remodelujących chromatynę. Nabyta oporność na paklitaxel poprzez modyfikację transkryptomu komórkowego może obejmować nadmierną ekspresję transporterów kasety wiążącej ATP (ABC), które wykorzystują energię z hydrolizy ATP do translokacji substancji przez błony komórkowe. Transportery ABC mogą być zlokalizowane w błonie plazmatycznej i eksportować leki z cytoplazmy, jak również występować w wyspecjalizowanych podstrukturach, w tym peroksysomach, lizosomach czy mitochondriach [91]. Nabycie oporności na paklitaxel powiązано z nadmierną ekspresją genu *ABCB1* w komórkach raka płuc [92–94], komórkach raka piersi [95,96] i komórkach raka jajnika [97], *ABCC1* w komórkach czerniaka [98], *ABCC3* w komórkach nowotworu piersi [96], *ABCC5* w komórkach raka nosogardła [99] i genu *ABCC10* w komórkach raka płuc [93]. Wcześniejsze badania nad regulacją transkrypcji genów ABC opisują rolę czynników transkrypcyjnych FOXM1, HOXB4 oraz SOX2 [98–103]) i acetylotransferazy GCN5 [104] w adaptacji komórek do paklitaxelu.

Nasze wcześniejsze badania na komórkach potrójnie negatywnego nowotworu piersi (MDA-MB-231), niedrobnokomórkowego raka płuc (A549) i raka wątroby (HepG2), nie wykazujących nabytej oporności na chemioterapeutyki wykazały, że acetylotransferaza p300 reguluje ekspresję części transporterów ABC w tych komórkach [105]. Aktywacja transkrypcyjna p300 jest wspierana przez kompleks BRG1-SWI/SNF na promotorach genów zależnych od E2F w komórkach proliferujących [106,107]. Wykazano, że ekspresja kilku transporterów ABC, takich jak *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCC11*, *ABCG1* i *ABCG2* w komórkach raka piersi MDA-MB-231 zależy od aktywności BRG1 [108].

Mając na uwadze nasze wcześniejsze wyniki wskazujące na udział p300 w ekspresji transporterów ABC oraz doniesienia literowe wskazujące na udział BRG1, celem tej części badań było określenie związku kompleksu SWI/SNF-p300 z

nadekspresją lizosomalnej frakcji transporterów ABC i zwiększoną akumulacją leków w lizosomach w komórkach opornych na paklitaksel.

5.1 Materiały i metody

Materiał badawczy:

Materiał badawczy stanowiły linie komórkowe reprezentujące dwa odmienne typy nowotworów, w terapii których wykorzystywany jest paklitaksel:

- Linia niedrobnokomórkowego raka płuc (A549) (ATCC) oraz wyindukowane komórki odporne na paklitaksel (A549-PTX)
- Linia potrójnie ujemnego raka piersi (MDA-MB-231) (Sigma-Aldrich) oraz wyindukowane komórki odporne na paklitaksel (MDA-MB-231-PTX)

Komórki A549 hodowano w podłożu DMEM uzupełnionym 10% FBS i penicyliną/streptomycyną (odpowiednio 50 U/ml i 50 µg/ml) w 5% CO₂. Początkowo komórki MDA-MB-231 hodowano w podłożu F15 uzupełnionym 15% FBS i penicyliną/streptomycyną (odpowiednio 50 U/mK i 50 µg/ml) bez równoważenia CO₂. Po 5 pasażach komórki zaadaptowano do wzrostu w podłożu DMEM uzupełnionym 10% FBS i penicyliną/streptomycyną (odpowiednio 50 U/ml i 50 µg/ml) w 5% CO₂.

Paklitaksel w stężeniu 0,05 µM dodawano do komórek na 48 godzin co 3 tygodnie, łącznie przez 6 cykli. Schemat leczenia dobrano tak, aby odpowiadał aktualnym schematom terapeutycznym, a stężenie leku odpowiadało minimalnemu stężeniu paklitakselu we krwi pacjentów [109]. Po 6 cyklach leczenia komórki zamrożono i przechowywano w ciekłym azocie. Po rozmrożeniu do komórek dodano jedną dawkę paklitakselu i przeprowadzono wszystkie eksperymenty w okresie do sześciu kolejnych pasażów komórek. Linie komórkowe odporne i nieoporne na leki hodowano w tych samych warunkach.

Metody:

- 1) Western Blot – analiza poziomu białek w lizatach komórkowych lub wyizolowanych lizosomach
- 2) Real-time PCR – analiza poziomu mRNA określonych genów
- 3) Mikroskopia konfokalna:

- w preparatach 2D – analiza poziomu białek, akumulacji leków, kolokalizacja białek, kolokalizacja leków i białek z lizosomami

- w strukturach 3D – poziom akumulacji leków wewnątrz sferoidów, analiza mechanizmów śmierci komórkowej za pomocą pomiaru intensywności fluorescencji aneksyny V i jodku propidyny

4) Cytometria przepływowa – analiza akumulacji leków

5) Sekwencjonowanie RNA – analiza transkryptomu komórki

6) Sekwencjonowanie Sangera – detekcja mutacji

7) Immunoprecypitacja chromatyny – analiza oddziaływania białek z sekwencjami regulatorowymi DNA określonych genów (ChIP-qPCR) lub genomowo (ChIP-seq)

8) Analiza bioinformatyczna danych ChIP-seq i RNA-seq

9) Koimmunoprecypitacja białek – analiza bezpośredniego oddziaływania pomiędzy białkami

10) Testy cytotoksyczności - analiza aktywności metabolicznej komórek z wykorzystaniem resazuryny oraz analiza aktywacji kaspaz z wykorzystaniem Caspase Glo, celem porównania cytotoksyczności badanych związków

11) Analiza danych klinicznych – porównanie wyników badań *in vitro* z danymi klinicznymi pacjentów onkologicznych zdeponowanymi w bazach danych

Lista odczynników, dokładna metodyka oraz opis analizy statystycznej zostały opisane w załączonych manuskryptach:

1) **Karolina Gronkowska**, Sylwia Michlewska, Agnieszka Robaszkiewicz: „Activity of lysosomal ABCC3, ABCC5 and ABCC10 is responsible for lysosomal sequestration of doxorubicin and paclitaxel-OregonGreen488 in paclitaxel-resistant cancer cell lines”

2) **Karolina Gronkowska**, Sylwia Michlewska, Tomasz Płoszaj, Magdalena Strachowska, Adrianna Stępień, Maciej Borowiec, Andrzej Bednarek, Agnieszka Robaszkiewicz, „BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel”

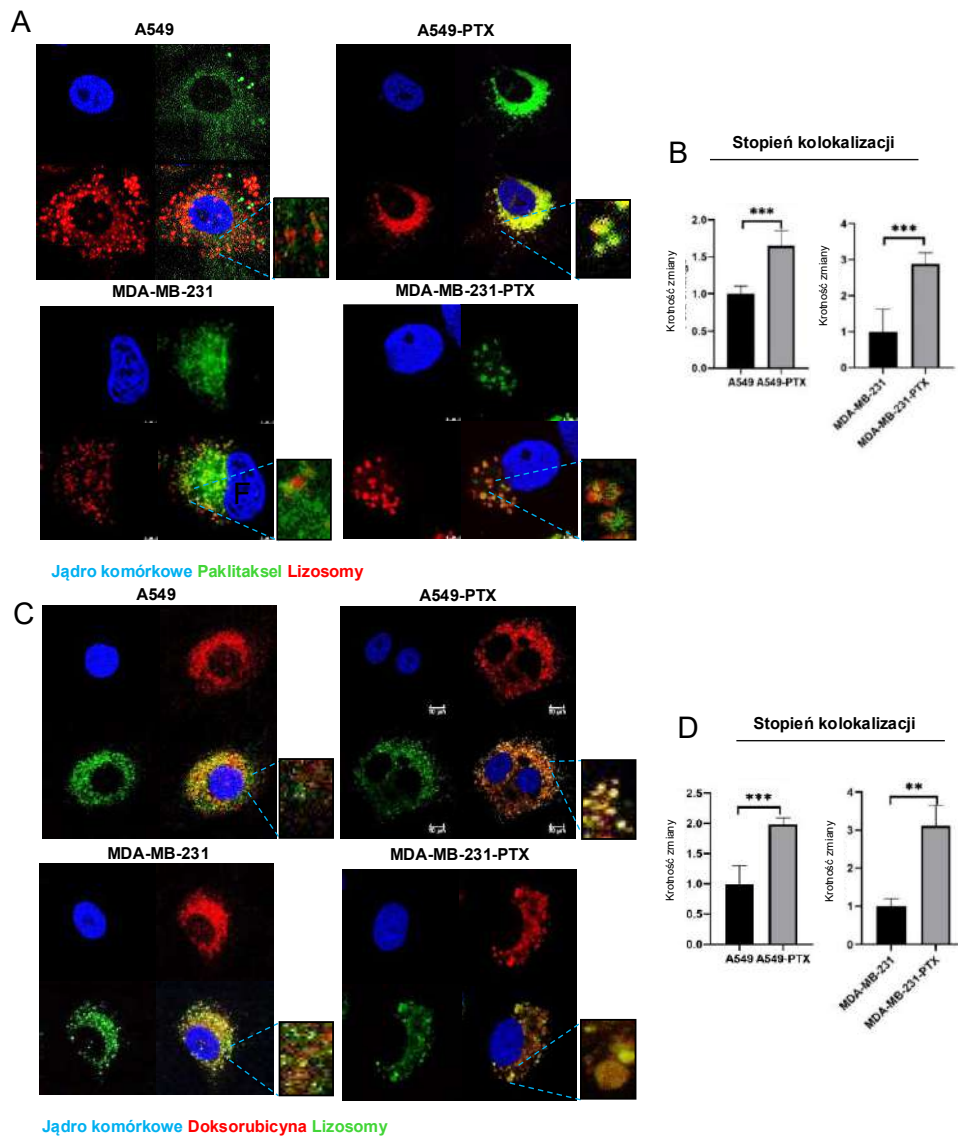
3) **Karolina Gronkowska**, Kinga Kołacz-Milewska, Sylwia Michlewska, Tomasz Płoszaj, Maciej Borowiec, Agnieszka Robaszkiewicz, „HIF1A, BRG1, and p300

interaction confers paclitaxel-induced drug resistance by enabling the overexpression of ABCC genes”

W pracy doktorskiej umieściłam dodatkowo wyniki z porównania transkryptomów komórek MDA-MB-231-PTX oraz A549-PTX bez i z wyciszonym BRM za pomocą sekwencjonowania nowej generacji RNA-Seq. Próbki te przygotowywałam wraz z próbkami z wyciszonym BRG1 i były przygotowywane i analizowane w ten sam sposób, który został omówiony w manuskrypcie „BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel”. Ponadto zastosowałam inhibitor p300 (C646; 2.5uM) do oceny roli p300 w wyindukowanej oporności na paklitaksel. Jednakże sposób zastosowania inhibitora, nie różnił się od sposobu zastosowania inhibitorów ACBI i PFI-3 opisanych w manuskrypcie „BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel”.

5.2 Omówienie najważniejszych wyników

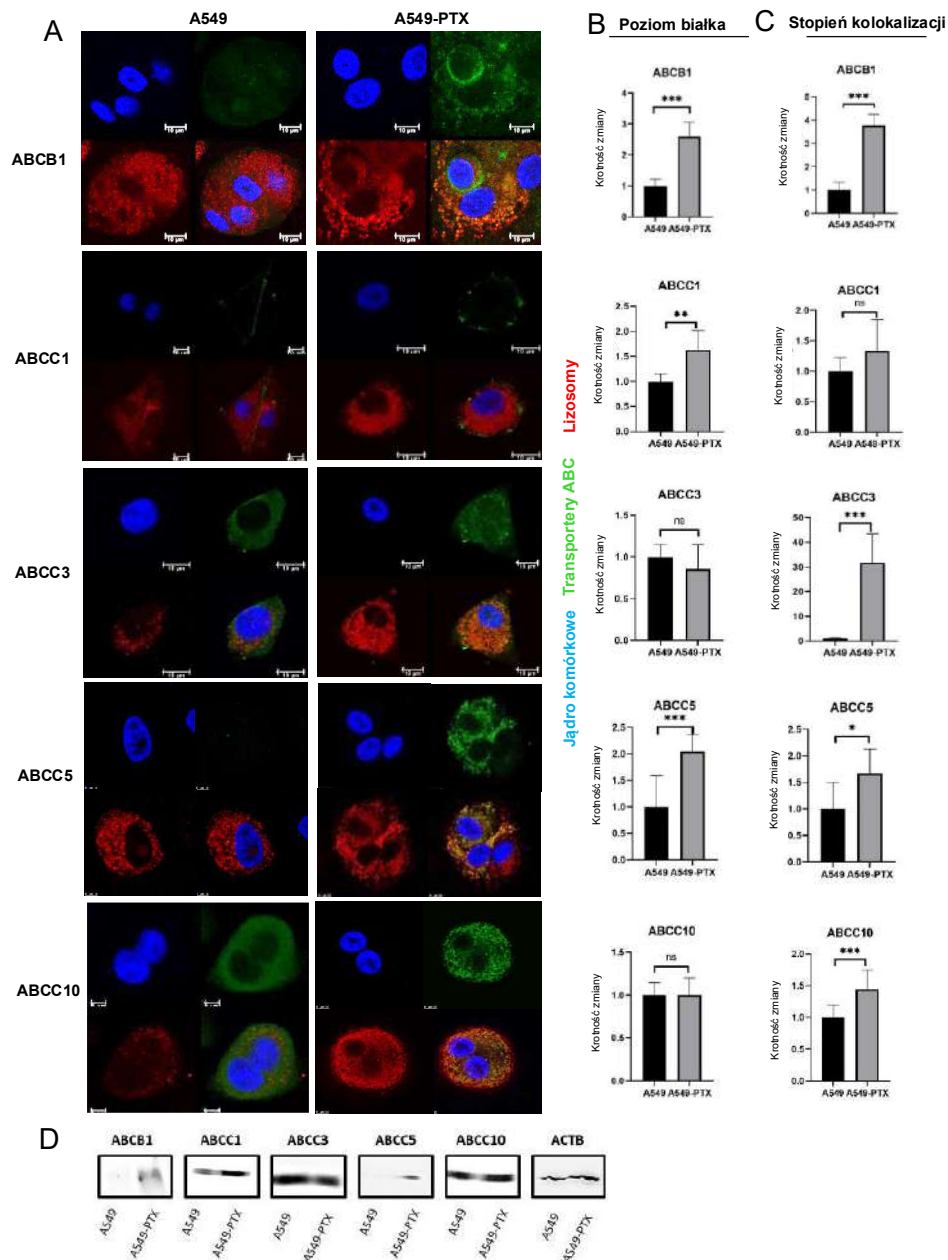
Wiedząc, że silnie kwaśne środowisko lizosomów determinuje bierną akumulację związków zależną od ich kwasowości, wykorzystałam neutralny paklitaksel skoniugowany z Oregon Green 488 (o negatywnym ładunku [110]), który może wnikać do lizosomów wyłącznie za pośrednictwem aktywnych transporterów błonowych. Prześledziłam jego wewnątrzkomórkową lokalizację za pomocą mikroskopii konfokalnej. Równolegle zbadałam wewnątrzkomórkową dystrybucję doksorubicyny, która może wnikać biernie do lizosomów. Jak pokazano na ryc. 6 uzyskanie oporności na paklitaksel znacząco zmieniło wewnątrzkomórkową lokalizację obu leków. W komórkach nieopornych Paclitaxel Oregon Green 488 gromadził się w cytoplazmie (wiązaną z cytoszkieletem), natomiast w liniach opornych silnie kolokalizował z lizosomami (Ryc.6A-B). Doksorubicyna była wykrywana w cytoplazmie, lizosomach i w mniejszym stopniu także w jądrze komórek wrażliwych, ale jej kolokalizacja z lizosomami uległa znaczącemu zwiększeniu w wariantach opornych (Ryc.6C-D).



Ryc. 6. Rozwojowi oporności komórek nowotworowych na paklitaksel towarzyszy wewnątrzkomórkowa redystrybucja leków do lizosomów. Na podstawie K. Gronkowska, S. Michlewska, A. Robaszekiewicz, Activity of Lysosomal ABCC3, ABCC5 and ABCC10 is Responsible for Lysosomal Sequestration of Doxorubicin and Paclitaxel-Oregongreen488 in Paclitaxel-Resistant Cancer Cell Lines., Cell Physiol Biochem 57 (2023) 360–378. [111]

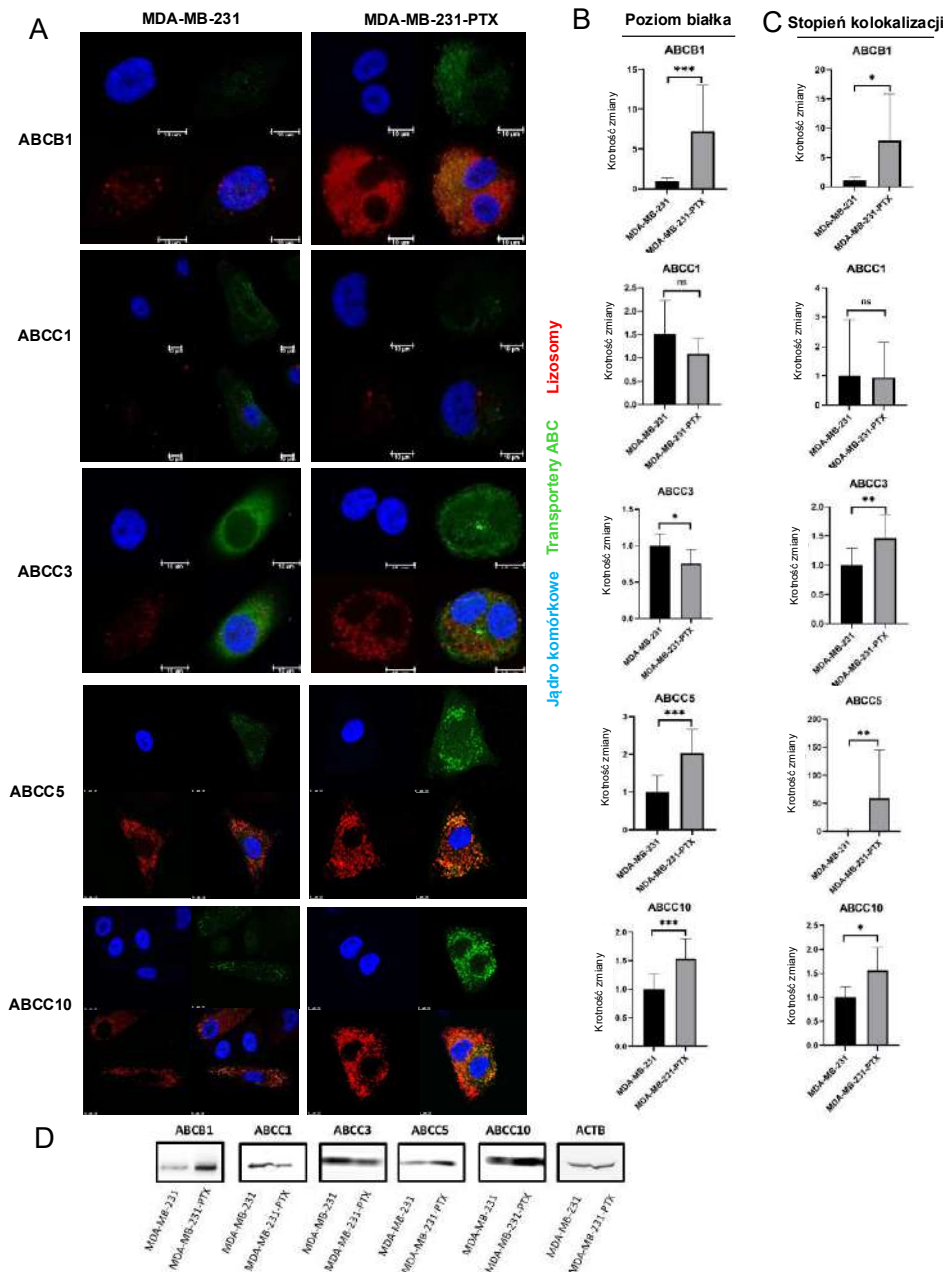
(A) Porównanie wewnątrzkomórkowej lokalizacji paklitakselu między liniami komórek nowotworowych nieopornych i opornych na paklitaksel (A549 i MDA-MB-231) po 24-godzinnej ekspozycji na paklitaksel za pomocą obrazowania konfokalnego (TCS SP8, Leica Microsystems, Niemcy). Paklitaksel Oregon Green™ 488 jest wybarwiony na zielono (0,1 μM), DNA (DAPI) na niebiesko, a lizosomy (LysoTracker™ Deep Red) na czerwono. (C) Porównanie lokalizacji wewnątrzkomórkowej doksorubicyny w liniach komórek nowotworowych nieopornych i opornych na paklitaksel (A549 i MDA-MB-231) po ekspozycji na doksorubicynę (0,05 μM ; 24 h; kolor czerwony). Lizosomy barwiono LysoTracker™ Deep Red (kolor zielony). DNA barwiono DAPI. Komórki obserwowano pod mikroskopem konfokalnym TCS SP8 (Leica Microsystems, Niemcy). (B, D) Kolokalizację pomiędzy fluorescencją Paklitakselu Oregon Green™ 488 (B), autofluorescencją doksorubicyny (D) i LysoTracker™ Deep Red określono w jednostkach arbitralnych (a.u.) za pomocą oprogramowania Leica Application Suite X. Różnicę pomiędzy dwoma średnimi sprawdzono za pomocą testu t-Studenta lub testu Manna-Whitneya, a statystycznie istotne różnice oznaczono *, gdy $p < 0,05$, **, gdy $p < 0,01$, ***, gdy $p < 0,001$.

W poszukiwaniu mechanizmów mogących promować transport leków do lizosomów, zbadalam poziom ekspresji i wewnątrzkomórkową lokalizację transporterów ABC, które zostały wcześniej opisane w literaturze, jako wykazujące nadekspresję w liniach opornych na paklitaksel (Ryc 7-8). Spośród testowanych transporterów, poziom tylko ABCB1 i ABCC5 zwiększał się w obu badanych liniach komórkowych po ekspozycji na paklitaksel, co zostało zwizualizowane za pomocą mikroskopii konfokalnej i analizą Western Blot lizatów całych komórek (ryc. 7A-B,D, ryc. 8A-B, D). Podwyższony poziom ABCC1 stwierdzono w komórkach A549 opornych na paklitaksel (ryc. 7 A-B, D), a ABCC10 w MDA-PTX (ryc. 8A-B,D). Jednakże rozwojowi lekooporności towarzyszył przyrost ABCB1, ABCC3, ABCC5 i ABCC10 w lizosomach (ryc. 7C, ryc. 8C), nawet jeśli nie wykazywały one zwiększonej ekspresji w liniach opornych.



Ryc. 7 Wpływ oporności na paklitaksel na ekspresję i dystrybucję ABCB1, ABCC1, ABCC3, ABCC5 i ABCC10 w komórkach A549. Na podstawie K. Gronkowska, S. Michlewska, A. Robaszekiewicz, Activity of Lysosomal ABCC3, ABCC5 and ABCC10 is Responsible for Lysosomal Sequestration of Doxorubicin and Paclitaxel-Oregongreen488 in Paclitaxel-Resistant Cancer Cell Lines., Cell Physiol Biochem 57 (2023) 360–378. [111]

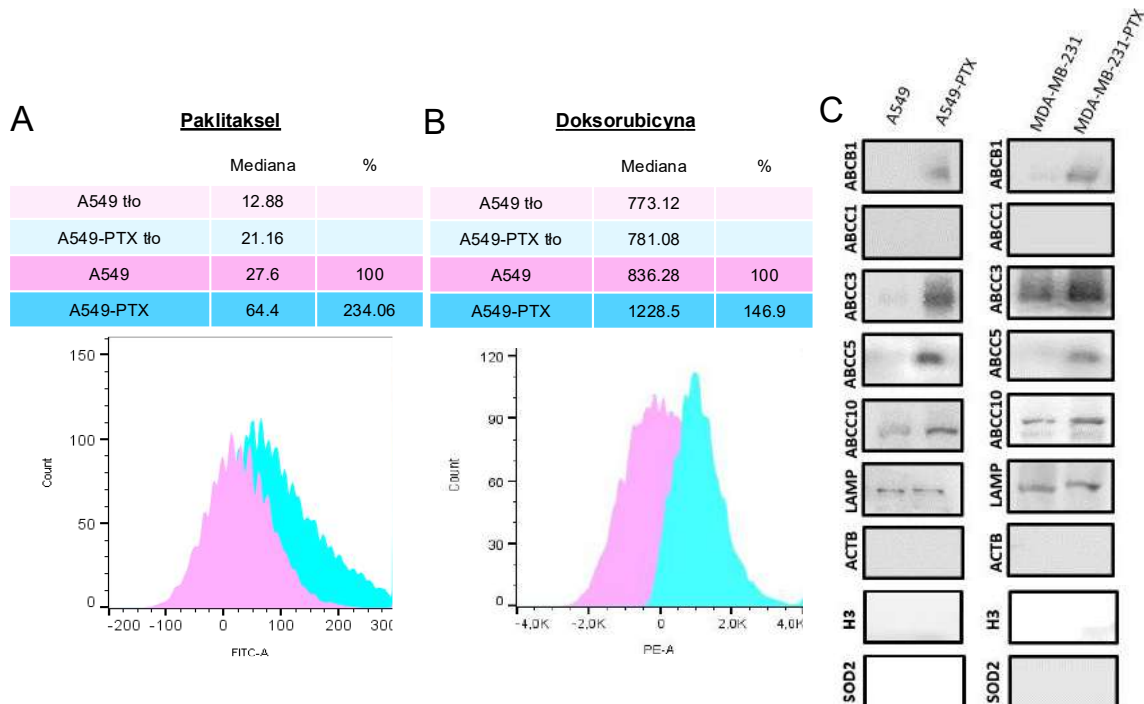
(A) Transportery ABC uwidoczniwiono w komórkach A549 nieopornych i opornych na paklitaksel metodą immunocytobarwienia, a następnie mikroskopii konfokalnej. Zielona fluorescencja transporterów ABC pochodzi z przeciwciała drugorzędowego sprzężonego z Alexafluorem 488, niebieskie DNA barwiono DAPI, natomiast lizosomy wybarwiono na czerwono wykorzystując LysoTracker™ Deep Red. (B i C) Intensywność fluorescencji, która odpowiada poziomowi białka ABC w komórkach (B) oraz kolokalizację między rozpatrywanymi białkami a lizosomami (C), określono w jednostkach arbitralnych (a.u.) za pomocą oprogramowania Leica Application Suite X. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono za pomocą testu t-Studenta lub testu Manna-Whitneya, a różnice istotne statystycznie oznaczono * dla $p < 0,05$, ** dla $p < 0,01$, *** dla $p < 0,001$. (D) Obrazy Western blot białek rozdzielonych SDS-PAGE z lizatów całych komórek uzyskano za pomocą ChemiDoc-IT2 (UVP, Meranco, Poznań, Polska). ACTB (aktyna) posłużyło jako wewnętrzna kontrola.



Ryc. 8 Wpływ oporności na paklitaksel na ekspresję i dystrybucję ABCB1, ABCC1, ABCC3, ABCC5 i ABCC10 w komórkach MDA-MB-231. Na podstawie K. Gronkowska, S. Michlewska, A. Robaszekiewicz, Activity of Lysosomal ABCC3, ABCC5 and ABCC10 is Responsible for Lysosomal Sequestration of Doxorubicin and Paclitaxel-Oregongreen488 in Paclitaxel-Resistant Cancer Cell Lines., Cell Physiol Biochem 57 (2023) 360–378. [111]

(A) Transportery ABC uwidoczniono w komórkach MDA-MB-231 nieopornych i opornych na paklitaksel metodą immunocytobarwienia, a następnie mikroskopii konfokalnej. Zielona fluorescencja transporterów ABC pochodzi z przeciwciała drugorzędowego sprzężonego z Alexafluorem 488, niebieskie DNA barwiono DAPI, natomiast lizosomy wybarwiono na czerwono wykorzystując LysoTracker™ Deep Red. (B i C) Intensywność fluorescencji, która odpowiada poziomowi białka ABC w komórkach (B) oraz kolokalizacji między rozpatrywanymi białkami a lizosomami (C), określono w jednostkach arbitralnych (a.u.) za pomocą oprogramowania Leica Application Suite X. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono za pomocą testu t-Studenta lub testu Manna-Whitneya, a różnice istotne statystycznie oznaczono * dla $p < 0,05$, ** dla $p < 0,01$, *** dla $p < 0,001$. (D) Obrazy Western blot białek rozdzielonych SDS-PAGE z lizatów całych komórek uzyskano za pomocą ChemiDoc-IT2 (UVP, Meranco, Poznań, Polska). ACTB wykorzystano jako wewnętrzną kontrolę.

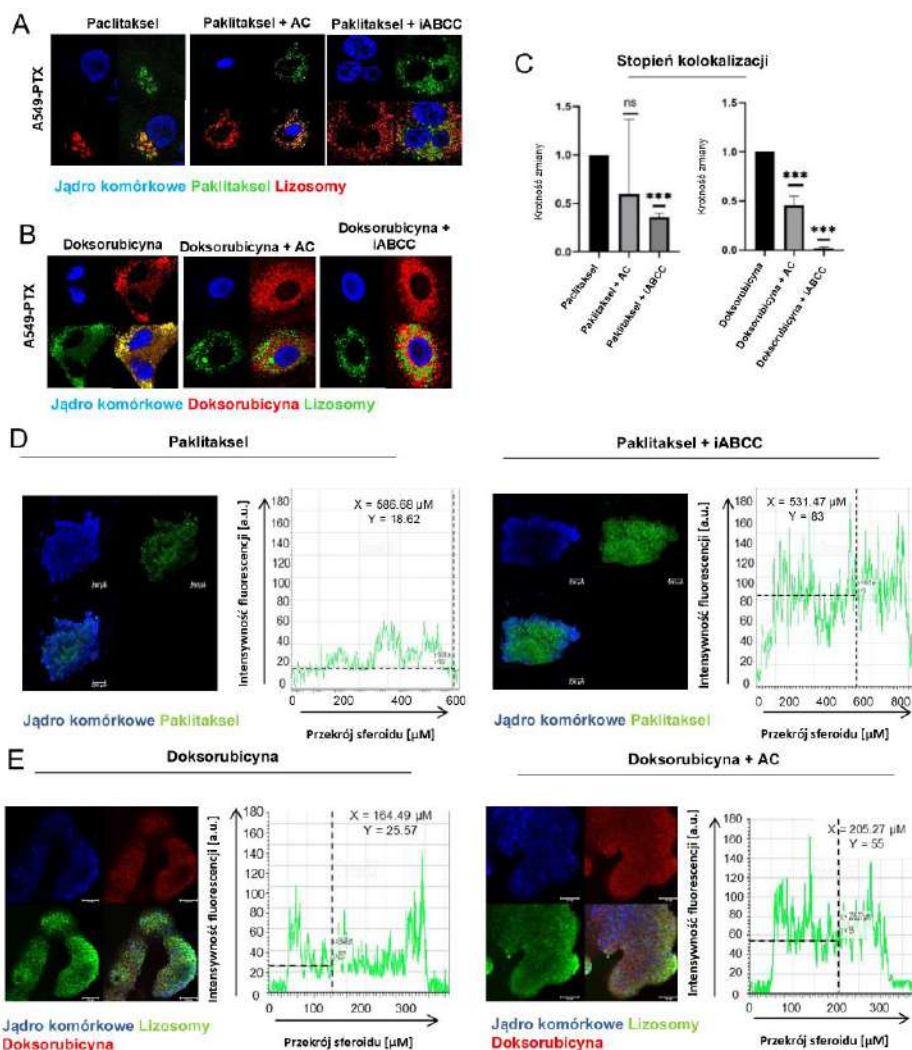
Aby potwierdzić zwiększoną akumulację badanych leków w lizosomach, porównano intensywność fluorescencji w lizosomach izolowanych z komórek A549 nieopornych i opornych na paklitaksel, inkubowanych z paklitakselem OregonGreen 488 (Ryc. 9A) i doksorubicyną (Ryc. 9 B). Mediana wartości rozkładu fluorescencji wskazuje na wzrost akumulacji leków w lizosomach. Dodatkowo, potwierdzono wzrost poziomu białek ABCB1, ABCC3, ABCC5 i ABCC10 w lizosomach wyizolowanych z komórek i opornych na paklitaksel względem komórek wrażliwych (Ryc. 9C).



Ryc.9 Porównanie akumulacji leków oraz obecności transporterów ABC w lizosomach wyizolowanych z linii A549 wrażliwych i opornych na paklitaksel Na podstawie K. Gronkowska, S. Michlewska, A. Robaszkiewicz, *Activity of Lysosomal ABCC3, ABCC5 and ABCC10 is Responsible for Lysosomal Sequestration of Doxorubicin and Paclitaxel-Oregongreen488 in Paclitaxel-Resistant Cancer Cell Lines., Cell Physiol Biochem 57 (2023) 360–378.* [111]

(A-B) Porównanie wychwytu lizosomalnego paklitakselu (A) i doksorubicyny (B) pomiędzy nieoporną i oporną na paklitaksel linią komórkową A549 po 24-godzinnej ekspozycji na leki, w oparciu o cytometrię przepływową. Intensywność fluorescencji mierzono cytometrem przepływowym LSR® II (Becton Dickinson) przy długości fali em: 595 nm/ex: 470 nm dla antracykliny i em: 524 nm/ex: 496 nm dla paklitakselu-Oregon Green. Intensywność fluorescencji komórek wizualizowano na histogramie w programie Flowing Stofware 2, a przesunięcie w dystrybucji fluorescencji wskazywało na zmianę dystrybucji leku. (C) Porównanie profilu transporterów ABC w błonach lizosomów wyizolowanych z komórek linii A549 oraz MDA-MB-231 i ich odpowiednikach opornych na paklitaksel metodą Western Blot. LAMP zastosowano jako kontrolę pozytywną; ACTB stanowił kontrolę zanieczyszczenia lizosomów frakcjami cytoplazmatycznymi i błonowymi; SOD2 stanowił kontrolę zanieczyszczenia mitochondriami; a histon H3 stanowił kontrolę zanieczyszczenia lizatu frakcją jądrową.

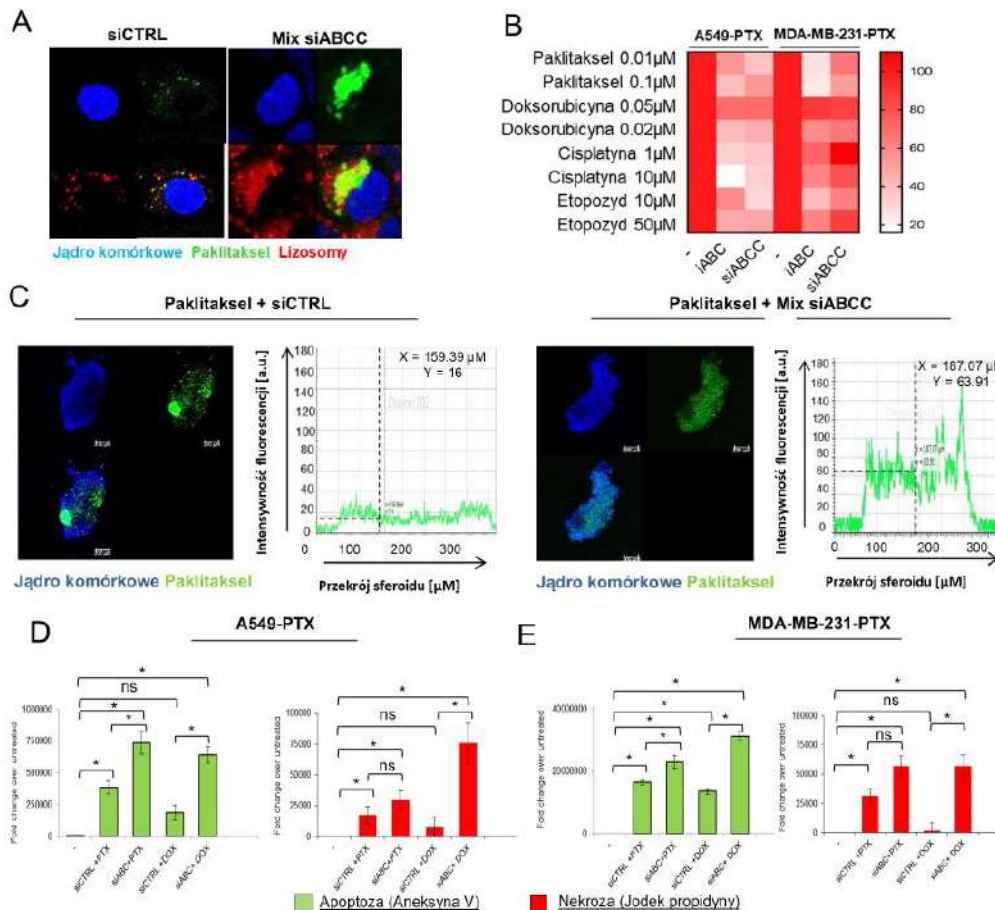
Biorąc pod uwagę brak informacji o potencjalnej roli białek z rodziny ABCC w lizosomach i zaobserwowany wzrost ich poziomu w komórkach opornych na paklitaksel, postawiliśmy hipotezę o ich możliwym udziale w sekwestracji leków, co nie zostało dotychczas zbadane mechanistycznie. Aby zweryfikować możliwą rolę transporterów ABCC3, ABCC5 i ABCC10 w lizosomalnym akumulowaniu leków, przeanalizowaliśmy lizosomalny wychwyty chemioterapeutyków w obecności dwóch inhibitorów: MK-571 i chlorku amonu (AC). MK-571 jest inhibitorem kilku transporterów ABCC, w tym ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC5 i ABCC10, ale nie ABCB1. Ze względu na nieselektywne działanie na kilka transporterów, MK-571 stanowi potencjalny inhibitor pan-ABCC [112]. AC to alkalizator lizosomów, który poprzez zwiększenie pH lizosomów zapobiega pułapkowaniu słabych zasad w tych organellach. Chlorek amonu zmniejszał akumulację dokсорubicyny (Ryc.10 B-C) wewnątrz lizosomów w linii komórkowej opornego raka płuca hodowanej w monowarstwie, ale nie miał wpływu na lokalizację wewnątrzkomórkową paklitakselu (Ryc.10 A,C). Co ciekawe, iABCC skuteczniej zmniejszał kolokalizację lizosomów i obydwu leków, prawie całkowicie zapobiegając sekwestracji dokсорubicyny wewnątrz lizosomów. Wskazuje to, że podrodzina białek ABCC bierze udział w sekwestracji lizosomalnej nie tylko paklitakselu, ale również dokсорubicyny. Rola transporterów ABCC w akumulacji leku została również potwierdzona w hodowli 3D, gdzie komórki nowotworowe poddano działaniu MK-571 (Ryc. 10D) i AC (Ryc. 10E). Spowodowało to głębszą penetrację leków. W sferoidach opornych na paklitaksel, leki zostawały uwięzione w obwodowych warstwach struktury. Zastosowanie inhibitorów umożliwiło dotarcie leków do komórek zlokalizowanych w wewnętrznych warstwach sferoidów.



Ryc.10 Rozwój oporności komórek nowotworowych na paclitaksel powoduje zależną od transporterów ABCC redystrybucję leków do lizosomów. Na podstawie K. Gronkowska, S. Michlewska, A. Robaszekiewicz, Activity of Lysosomal ABCC3, ABCC5 and ABCC10 is Responsible for Lysosomal Sequestration of Doxorubicin and Paclitaxel-Oregongreen488 in Paclitaxel-Resistant Cancer Cell Lines., *Cell Physiol Biochem* 57 (2023) 360–378. [111]

(A-B) Porównanie kolokalizacji lizosomów z paclitakselem (A) i doxorubicyną (B) w linii komórkowej A549-PTX po leczeniu komórek lekiem w monoterapii lub w skojarzeniu z neutralizatorem lizosomotropowym (chlorek amonu – AC; 25 mM) i inhibitorem ABCC (MK-571 – iABCC; 100 μ M), które dodano na 2 godziny przed podaniem Paclitaxel Oregon Green™ 488 (0,1 μ M) lub autofluorescentnej doxorubicyny (0,05 μ M). Zdjęcia wykonano za pomocą mikroskopu konfokalnego (TCS SP8, Leica Microsystems, Niemcy). DNA barwiono barwnikiem DAPI, a lizosomy zostały wybarwione znacznikiem LysoTracker™ Deep Red (C) Wpływ AC i MK-571 na kolokalizację doxorubicyny i paclitakselu z lizosomami określono w jednostkach arbitralnych (a.u.) za pomocą pakietu Leica Application Suite X. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono za pomocą testu t-Studenta lub testu Manna-Whitneya, a statystycznie istotne różnice oznaczono *, gdy $p < 0,05$ **, gdy $p < 0,01$, ***, gdy $p < 0,001$. (D) 4-tygodniowe 3D PTX-oporne komórki A549 traktowano Paclitakselem Oregon Green™ 488 (zielony) w monoterapii przez 48 godzin lub w skojarzeniu z MK-571 (100 μ M; 2 godziny przed paclitakselem) i wybarwiono DAPI (niebieski). (E) 4-tygodniowe 3D PTX-oporne komórki A549 traktowano autofluorescentną doxorubicyną (czerwony) w monoterapii przez 48 godzin lub w skojarzeniu z chlorkiem amonu (25 mM; 2 godziny przed lekiem), następnie wybarwiono LysoTracker™ Deep Red (zielony) i DAPI (niebieski). (D-E) Fluorescencję leków zarejestrowano za pomocą mikroskopu konfokalnego (TCS SP8, Leica Microsystems, Niemcy). Wykres intensywności fluorescencji na przekroju sferoidów wyznaczono w jednostkach arbitralnych (a.u.) za pomocą oprogramowania Leica Application Suite X.

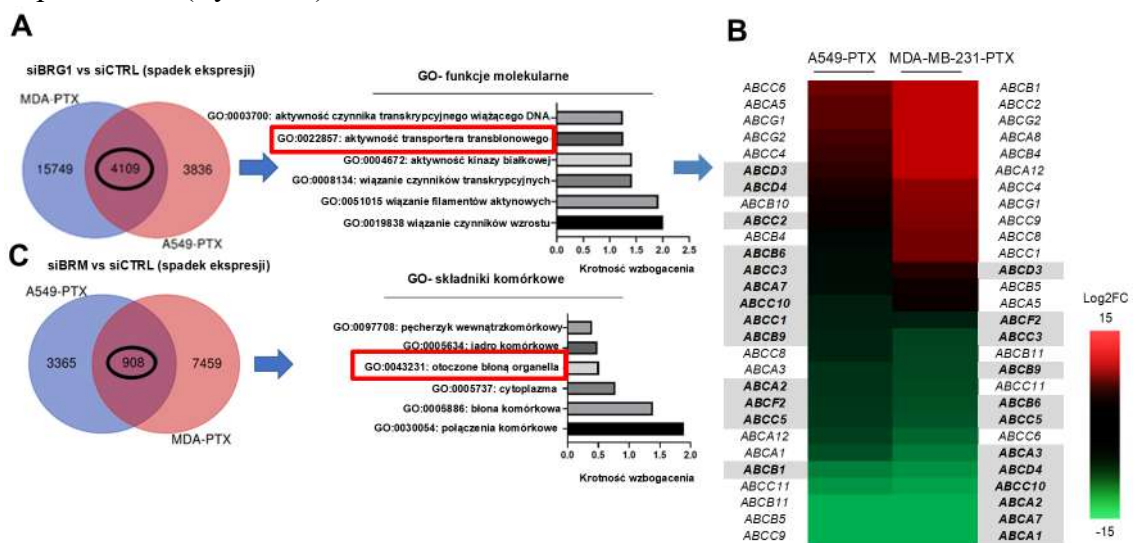
Następnie sprawdziłam, czy wyciszenie nowo zidentyfikowanych w lizosomach transporterów ABCC3, ABCC5 i ABCC10, może zapobiec sekwestracji leków i uwrażliwiać komórki nowotworowe na działanie chemioterapeutyków. Celowanie z wykorzystaniem siRNA w mRNA trzech transporterów ABCC obniżyło sekwestrację lizosomalną znakowanego fluorescencyjnie paklitakselu (ryc. 11A). Co istotne, obniżenie ekspresji ABCC3/ABCC5/ABCC10 zwiększyło cytotoksyczność paklitakselu, dokсорubicyny, cisplatyny i etopozydu, które różnią się kwasowością. Podobny efekt zaobserwowano również w przypadku inhibitora pan-ABCC (ryc. 11B). W hodowli 3D tych komórek, wyciszenie wszystkich trzech transporterów ABCC znacząco zwiększyło penetrację sferoidów przez paclitaxel Oregon Green 488, który był rozłożony względnie równomiernie w całym sferoidzie, niezależnie od analizowanej głębokości. W komórkach kontrolnych natomiast zielona fluorescencja leku była obserwowana głównie w zewnętrznych warstwach sferoidu (ryc. 11C). Aby sprawdzić, czy retencja leku w obwodowej części sferoidów przez ABCC3, ABCC5 i ABCC10 zmniejsza cytotoksyczność dokсорubicyny i paklitakselu, porównaliśmy frakcję komórek apoptotycznych i nekrotycznych między grupą kontrolną a komórkami z wyciszonymi białkami ABCC3/5/10. Analiza markera apoptozy – intensywności aneksyny V w hodowli 3D sferoidów A549-PTX i MDA-MB-231 – potwierdziła silniejszą indukcję apoptozy przez lek w komórkach z wyciszonymi genami ABCC niż transfekcja kontrolnym siRNA. Większy zakres martwicy obserwowano w komórkach po wyciszeniu ABCC i leczeniu dokсорubicyną, ale nie obserwowano jej po wyciszeniu ABCC i ekspozycji na paklitaxel, w porównaniu z kontrolnym siRNA (Fig 11 D-E).



Ryc.11 Przejściowe wyciszenie ABCC zwiększa cytotoksyczne działanie leków przeciwnowotworowych. Na podstawie K. Gronkowska, S. Michlewska, A. Robaszekiewicz, *Activity of Lysosomal ABCC3, ABCC5 and ABCC10 is Responsible for Lysosomal Sequestration of Doxorubicin and Paclitaxel-Oregongreen488 in Paclitaxel-Resistant Cancer Cell Lines.*, *Cell Physiol Biochem* 57 (2023) 360–378. [111]

(A) Wpływ jednoczesnego wyciszenia siABCC3, siABCC5 i siABCC10 na wewnątrzkomórkową dystrybucję paklitakselu Oregon Green 488 zbadano w komórkach A549 opornych na paklitaksel. Znakowany fluorescencyjnie paklitaksel (zielony) dodano do komórek 72 godziny po ich transfekcji mieszaniną siRNA (Mix siABCC) lub siRNA kontrolnym, na kolejne 24 godziny. Lizosomy barwiono LysoTracker™ Deep Red (kolor czerwony) i DAPI (kolor niebieski). (B) Aktywność metaboliczną komórek, służącą jako miara żywotności, badano za pomocą rezazuryny. iABCC (MK-571; 25 μM) podawano do hodowli na 2 godziny przed podaniem leków, natomiast transfekcję komórek mieszaniną siABCC3, siABCC5 i siABCC10 przeprowadzono 72 godziny przed traktowaniem lekami. Dla każdego testowanego chemioterapeutyku żywotność komórek nieleczonych siCTRL lub iABCC przyjęto jako 100%. (C) 4-tygodniową hodowlę 3D komórek A549 opornych na PTX transfekowano mieszaniną siABCC3, siABCC5 i siABCC10 lub kontrolnym siRNA 78 godzin przed leczeniem paklitaksellem (0,1 μM). DNA barwiono DAPI (na niebiesko). Fluorescencję paklitakselu Oregon Green 488 zarejestrowano za pomocą mikroskopu konfokalnego (TCS SP8, Leica Microsystems, Niemcy). Wykres intensywności fluorescencji w przekroju sferoidu wyznaczono w jednostkach arbitralnych (j.u.) za pomocą oprogramowania Leica Application Suite X. (D, E). Rólę ABCC3, ABCC5 i ABCC10 w ochronie komórek przed cytotoksycznością indukowaną doxorubicyną (0,05 μM; 48 h) i paklitaksellem (0,1 μM; 48 h) w hodowli 3D 4-tygodniowych sferoidów A549-PTX (D) i MDA-MB-231-PTX (E) badano poprzez pomiar związanej aneksyny V i jodku propidyny. Leki dodano do komórek 72 godziny po ich transfekcji mieszaniną siRNA (mix siABCC) lub siRNA niespecyficznym. Intensywność fluorescencji określono ilościowo przy użyciu oprogramowania Leica Application Suite X. Różnice między wariantami weryfikowano za pomocą jednokierunkowej analizy wariancji lub testu Kruskala-Wallisa, a różnice statystycznie istotne oznaczono *, gdy $p < 0,05$.

W kolejnym etapie przystąpiliśmy do poszukiwania białek remodelujących chromatynę, które mogą warunkować zwiększoną ekspresję transporterów ABC, których poziom w lizosomach jest wyższy po wielokrotnej ekspozycji komórek na działanie paklitakselu. W tym celu wyciszyliśmy dwie kluczowe ATPazy kompleksu SWI/SNF – BRG1 i BRM przy użyciu specyficznego siRNA (Ryc.12 A, C) oraz wyłoniliśmy geny, które ulegają represji po wyciszeniu ATPaz w obu liniach opornych na paklitaksel, a zatem są regulowane przez te białka. Po wyciszeniu BRG1 zaobserwowaliśmy spadek ekspresji genów, których produkty mogą mieć znaczący udział w powstawaniu oporności na paklitaksel (Ryc. 12A).



Ryc.12. BRG1 i BRM regulują ekspresję genów mogących sprzyjać powstawaniu oporności na paklitaksel, przy czym to BRG1 reguluje ekspresję transporterów ABC, w tym ABCC3, ABCC5 i ABCC10 uczestniczących w sekwestracji leków w liniach opornych na paklitaksel. Na podstawie K. Gronkowska, S. Michlewska, T. Płoszaj, M. Strachowska, A. Stępień, M. Borowiec, A. Bednarek, A. Robaszekiewicz, BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel, BioRxiv (2025) [113]+ dane dodatkowe.

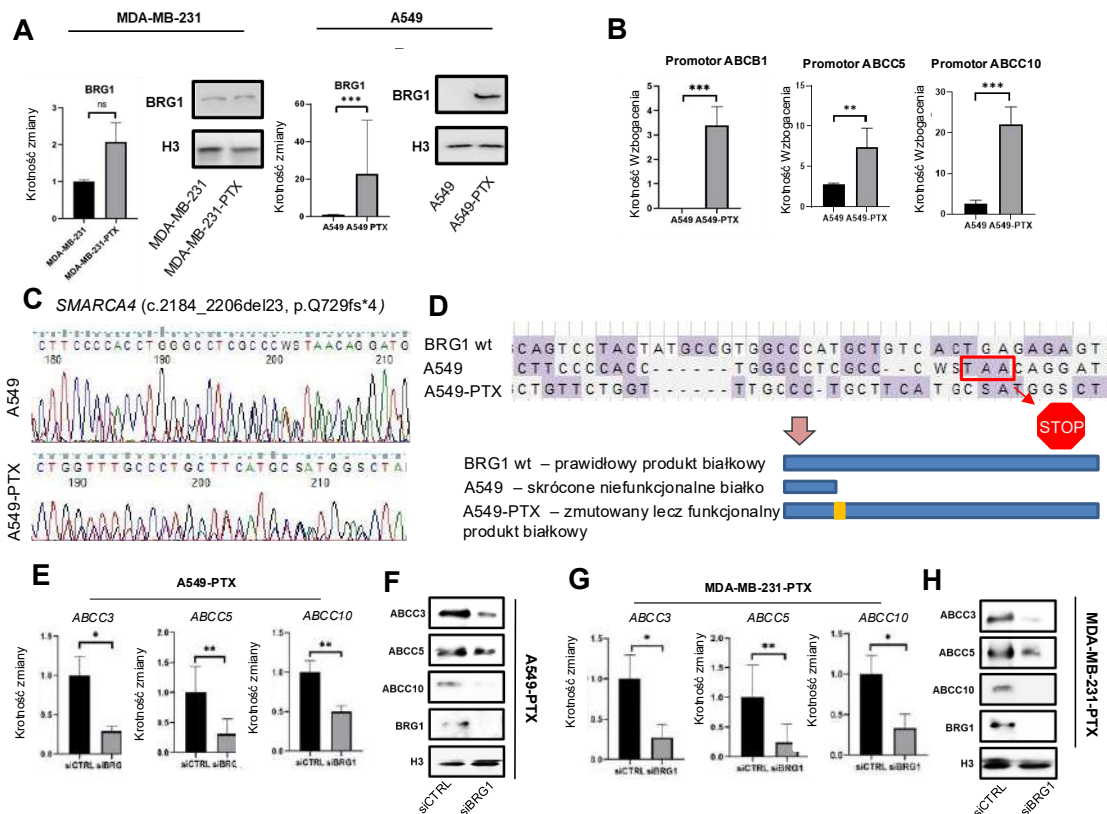
(A, C) Przejściowe wyciszenie BRG1 (A) i BRM (C) obniża transkrypcję wspólnego podzbioru genów w MDA-PTX i A549-PTX. Listę genów charakteryzujących się spadkiem transkrypcji w odpowiedzi na wyciszenie ATPaz ($\text{Log}_2\text{FC} < -0,5$) wygenerowano poprzez różnicową ekspresję w programie CuffDiff przy użyciu zestawów danych RNA-Seq z linii komórkowych transfekowanych siRNA kontrolnym oraz specyficznym dla badanych ATPaz. Diagram Venna wygenerowano przy użyciu <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. Ontologię genów przypisano wspólnym zestawom genów dla MDA-PTX i A549-PTX w Panther przy użyciu statystycznego testu nadreprezentacji. (B) Wyciszenie genu BRG1 zmienia transkrypcję genów ABC, co może przyczyniać się do oporności wielolekowej w komórkach poddanych kilku cyklom leczenia paklitakselem. Mapa cieplna różnicowej ekspresji genów przedstawia Log_2FC wygenerowany w CuffDiff na podstawie danych RNA-Seq z komórek kontrolnych i z wyciszonym BRG1 przy użyciu specyficznego siRNA. Pogrubione geny charakteryzują się stosunkowo wysoką, niezmienną ekspresją lub znacznym wzrostem transkrypcji spowodowanym paklitakselem.

Do tej grupy zakwalifikowano białka wiążących czynniki wzrostu, mogące promować nadmierną proliferację komórek, białka wiążące filamety aktynowe, mogące

mieć wpływ na dynamikę mikrotubul, kinazy białkowe zaangażowane w przekaźnictwo sygnałów oraz transportery transmembranowe mogące uczestniczyć w usuwaniu i sekwestracji leków. Wyłoniliśmy transportery ABC, które należą do tej grupy i zaobserwowaliśmy spadek ekspresji licznych transporterów ABC po wyciszeniu BRG1, w tym *ABCC3*, *ABCC5* i *ABCC10* (Ryc. 12B). Wyciszeniu BRM towarzyszyła represja genów związanych z otoczoną błoną organelami komórkowymi, w tym kodujących białka strukturalne lizosomów (Ryc. 12C).

Wynik ten, był zaskakujący, gdyż w poszukiwaniu potencjalnego udziału BRG1 i BRM w transkrypcji genów ABC w komórkach opornych na paklitaksel wykorzystano MDA-MB-231 z dzikim typem *SMARCA4* oraz A549 z mutacją *SMARCA4* powodującą brak funkcjonalnego białka BRG1. Adaptacja MDA-MB-231 do paklitakselu nie zmieniła ekspresji BRG1 na poziomie mRNA i białka. Co zaskakujące, stwierdzono obecność mRNA genu *SMARCA4* i białka BRG1 w komórkach A549 opornych na paklitaksel (Ryc.13A). W celu potwierdzenia, że w komórkach A549 opornych na paklitaksel występuje funkcjonalny BRG1, posiadający zdolność do wiązania chromatyny przeprowadziliśmy eksperyment CHIP-qPCR (Ryc. 13B), w którym zaobserwowaliśmy wiązanie enzymu w regionach promotorowych *ABCB1*, *ABCC3* i *ABCC10* w fenotypie lekoopornym linii komórkowej A549. Sekwencjonowanie metodą Sangera fragmentu *SMARCA4* obejmującego delecję c.2184_2206del23 (Ryc.13C), powodującą zmianę ramki odczytu i przedwczesne pojawienie się kodonu STOP, wskazało na dodatkową delecję 7 nukleotydów i insercję 2 nukleotydów w sekwencji *SMARCA4* przed miejscem delecji. Zmiany sekwencji nukleotydowej wywołane paklitakselem doprowadziły do mutacji odwracającej kodon STOP, przywracając ekspresję BRG1 w komórkach A549 opornych na paklitaksel. Co ważne, rozważana mutacja nie wystąpiła w żadnej z funkcjonalnych domen BRG1 (Ryc.13D) umożliwiając zachowanie pierwotnej funkcji BRG1

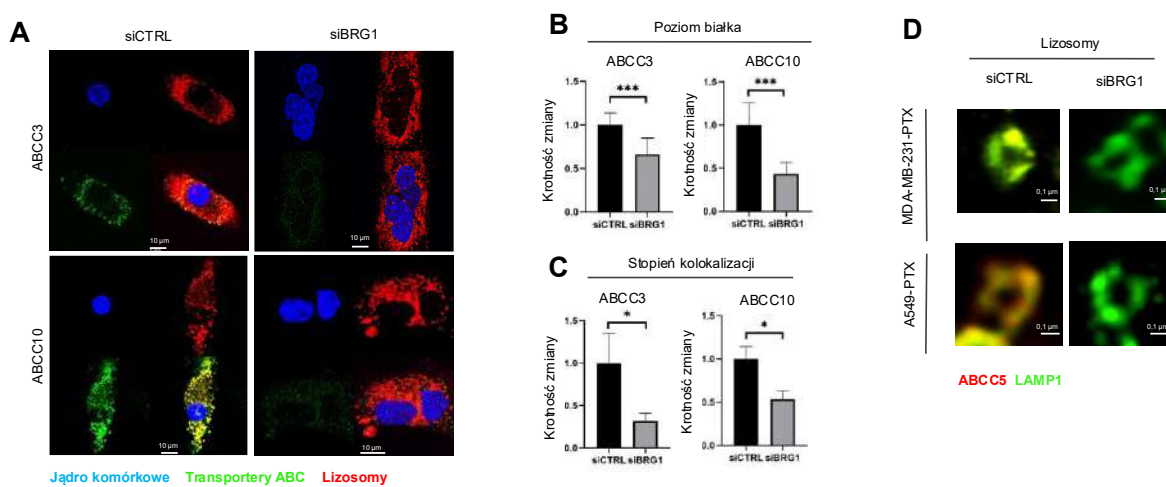
Po rozwianiu wątpliwości dotyczących linii A549-PTX, potwierdziliśmy na poziomie mRNA (Ryc.13 E,G) oraz białka (Ryc.13 F,H) zależność ekspresji *ABCC3*, *ABCC5* i *ABCC10* od poziomu BRG1, stosując wyciszenie BRG1 przy użyciu specyficznego siRNA.



Ryc 13. Zmiany w sekwencji nukleotydowej *SMARCA4* wywołane paklitakselem doprowadziły do mutacji odwracającej kodon STOP, która przywróciła ekspresję funkcjonalnego BRG1 w komórkach A549 opornych na paklitaksel. BRG1 nasila transkrypcję *ABCC3*, *ABCC5* i *ABCC10*, które są istotne dla oporności wielolekowej w liniach komórek opornych na paklitaksel. Na podstawie K. Gronkowska, S. Michlewska, T. Płoszaj, M. Strachowska, A. Stępień, M. Borowiec, A. Bednarek, A. Robaszekiewicz, BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel, *BioRxiv* (2025) [113]

(A). Poziom mRNA *SMARCA4* porównano w liniach komórkowych MDA-MB-231 i A549 nieopornych i opornych na PTX metodą PCR w czasie rzeczywistym. Poziom transkrypcji znormalizowano najpierw do genów metabolizmu podstawowego (*ACTB*, *GAPDH* i *HPRT1*), a następnie poziom mRNA w liniach komórek wrażliwych przyjęto jako 1. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono za pomocą testu t-Studenta, a różnice statystycznie istotne oznaczono * dla $p < 0,05$, ** dla $p < 0,01$, *** dla $p < 0,001$. Poziom białka BRG1 porównano w liszatkach komórek MDA-MB-231 i A549 oraz ich PTX-opornych odpowiedników metodą Western Blot. Histon H3 użyto jako kontrolę. (B) Rekrutacja BRG1 do promotorów *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCC5* i *ABCC10* w dwóch fenotypach A549 monitorowano metodą ChIP-qPCR. Surowe wartości ChIP znormalizowano do odpowiadających im kontroli IgG. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono testem t-Studenta, a różnice statystycznie istotne oznaczono * dla $p < 0,05$, ** dla $p < 0,01$, *** dla $p < 0,001$ (C) Wyniki sekwencjonowania Sangera przedstawione w Finch TV (D) Zestawienie sekwencji *SMARCA4* w oprogramowaniu MEGA11. (E,G) Poziom mRNA transporterów *ABC* porównano między próbkami kontrolnymi i z wyciszonym BRG1 w A549-PTX (E) oraz MDA-MB-231-PTX (G) metodą PCR w czasie rzeczywistym. Poziom transkrypcji znormalizowano najpierw do genów metabolizmu podstawowego (*ACTB*, *GAPDH* i *HPRT1*), a następnie poziom mRNA kontroli przyjęto jako 1. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono za pomocą testu t-Studenta, a różnice istotne statystycznie oznaczono *, gdy $p < 0,05$ * i **, gdy $p < 0,01$. (F,H) Wpływ przejściowego wyciszenia BRG1 w komórkach A549-PTX (F) oraz MDA-MB-231-PTX (H) na poziom białek *ABCC3*, *ABCC5* i *ABCC10* badano metodą Western Blot. BRG1 zastosowano jako kontrolę skuteczności wyciszenia. Histon H3 zastosowano jako kontrolę ładowania.

Mając na uwadze, że BRG1 kontroluje transkrypcję genów *ABC*, których obecność wykazaliśmy w znacznym stężeniu w lizosomach komórek opornych na paklitaksel, sprawdziliśmy czy niedobór BRG1 przyczyni się do spadku poziomu ABCC3, ABCC5 i ABCC10 w tych organellach. Wyciszenie BRG1 spowodowało widoczną i istotną redukcję poziomów ABCC3 i ABCC10 wewnątrz komórek (Ryc. 14A, 14B) oraz zmniejszenie ich lokalizacji lizosomalnej, co określono ilościowo poprzez pomiar kolokalizacji białek i lizosomów (Ryc. 14C). Mikroskopia konfokalna z algorytmem dekonwolucji umożliwiła wizualizację spadku poziomu ABCC5 w błonie lizosomu, który był spowodowany wyciszeniem BRG1 w obu liniach komórkowych opornych na paklitaksel (Ryc. 14D).

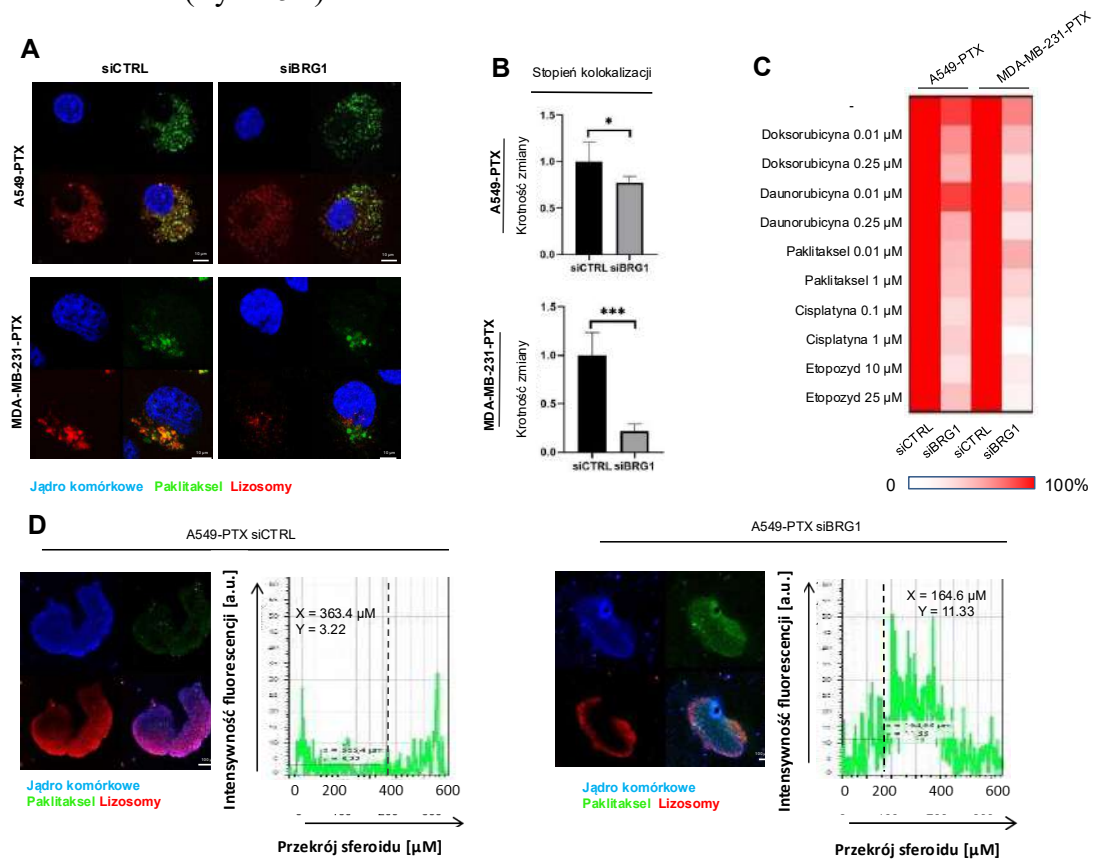


Ryc.14 BRG1 nasila ekspresję transporterów *ABC* zlokalizowanych w lizosomach linii komórkowych opornych na PTX. Na podstawie K. Gronkowska, S. Michlewska, T. Płoszaj, M. Strachowska, A. Stępień, M. Borowiec, A. Bednarek, A. Robaszekiewicz, BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel, BioRxiv (2025) [113]

(A) Ekspresję i lokalizację transporterów ABC po 72 godzinach od transfekcji komórek siCTRL i siBRG1 uwidoczniło za pomocą następnie mikroskopii konfokalnej. Zielona fluorescencja pochodząca z przeciwciała drugorzędowego sprzężonego z Alexafluorem 488 odpowiada transporterom ABC. DNA barwiono DAPI (kolor niebieski). Lizosomy barwiono LysoTrackerem (kolor czerwony). Intensywność fluorescencji (B) i kolokalizacja (C) zostały określone w jednostkach arbitralnych (a.u.) za pomocą oprogramowania Leica Application Suite X. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono za pomocą testu t-Studenta, a statystycznie istotne różnice oznaczono *, gdy $p < 0,05$, **, gdy $p < 0,01$, ***, gdy $p < 0,001$ (D) Czerwona fluorescencja ABCC5 pochodzi z drugorzędowego przeciwciała znakowanego R-fikoerytryną, a zielona fluorescencja LAMP1 z przeciwciała sprzężonego z Alexafluor488. Skany lizosomów zostały zdekonwolucowane za pomocą 3D-Deconvolution dostępnego w oprogramowaniu Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems, Niemcy).

Aby sprawdzić funkcjonalny wpływ zależnej od BRG1 ekspresji transporterów *ABC*, których produkty są obecne w lizosomach komórek opornych na paklitaksel, na wewnątrzkomórkową dystrybucję leku, porównałam kolokalizację paklitakselu Oregon Green z lizosomami w komórkach z prawidłową i wyciszoną ekspresją BRG1 za pomocą

mikroskopii konfokalnej (Ryc. 15A). Wyciszenie enzymu widocznie zmniejszyło akumulację leku w lizosomach, co określiłam ilościowo jako kolokalizację fluorescencji leku i lizosomu (Ryc. 15B).



Ryc.15 BRG1 jest zaangażowany w proces sekwestracji leków i zmniejszenia ich cytotoksyczności. Na podstawie K. Gronkowska, S. Michlewska, T. Płoszaj, M. Strachowska, A. Stępień, M. Borowiec, A. Bednarek, A. Robaszekiewicz, BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel, BioRxiv (2025) [113]

(A) Kolokalizację znakowanego fluorescencyjnie paklitakselu i lizosomów porównano między komórkami traktowanymi siRNA kontrolnym i siBRG1. Paklitaksel oznaczono na zielono (Oregon Green 488), lizosomy na czerwono (LysoTracker Deep Red), a DNA na niebiesko (DAPI). Kolokalizację (B) określono w jednostkach arbitralnych (a.u.) za pomocą oprogramowania Leica Application Suite X. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono testem t-Studenta, a różnice statystycznie istotne oznaczono *, gdy $p < 0,05$, **, gdy $p < 0,01$, ***, gdy $p < 0,001$ (C). Wrażliwość na dokсорubicynę, daunorubicynę, paklitaksel, cisplatynę i etopozyd porównano między liniami komórkowymi kontrolnymi i z wyciszoną ekspresją BRG1. Żywotność mierzono za pomocą resazury. Aktywność metaboliczną komórek kontrolnych przyjęto jako 100%. (D) Akumulacja paklitakselu Oregon Green w lizosomach komórek opornych na paklitaksel hodowanych w hodowlach trójwymiarowych wymaga obecności białka BRG1. Sferoidy linii komórkowej A549 kontrolnej i opornej na paklitaksel z wyciszonym białkiem BRG1 przeskanowano pod kątem wewnątrzkomórkowej dystrybucji białka Oregon Green w komórkach kontrolnych. Lek oznaczono na zielono, DNA na niebiesko, a lizosomy na czerwono (barwienie zgodnie z opisem w punkcie A). Wykres intensywności fluorescencji na przekroju sferoidu wyznaczono w jednostkach arbitralnych (a.u.) za pomocą oprogramowania Leica Application Suite X.

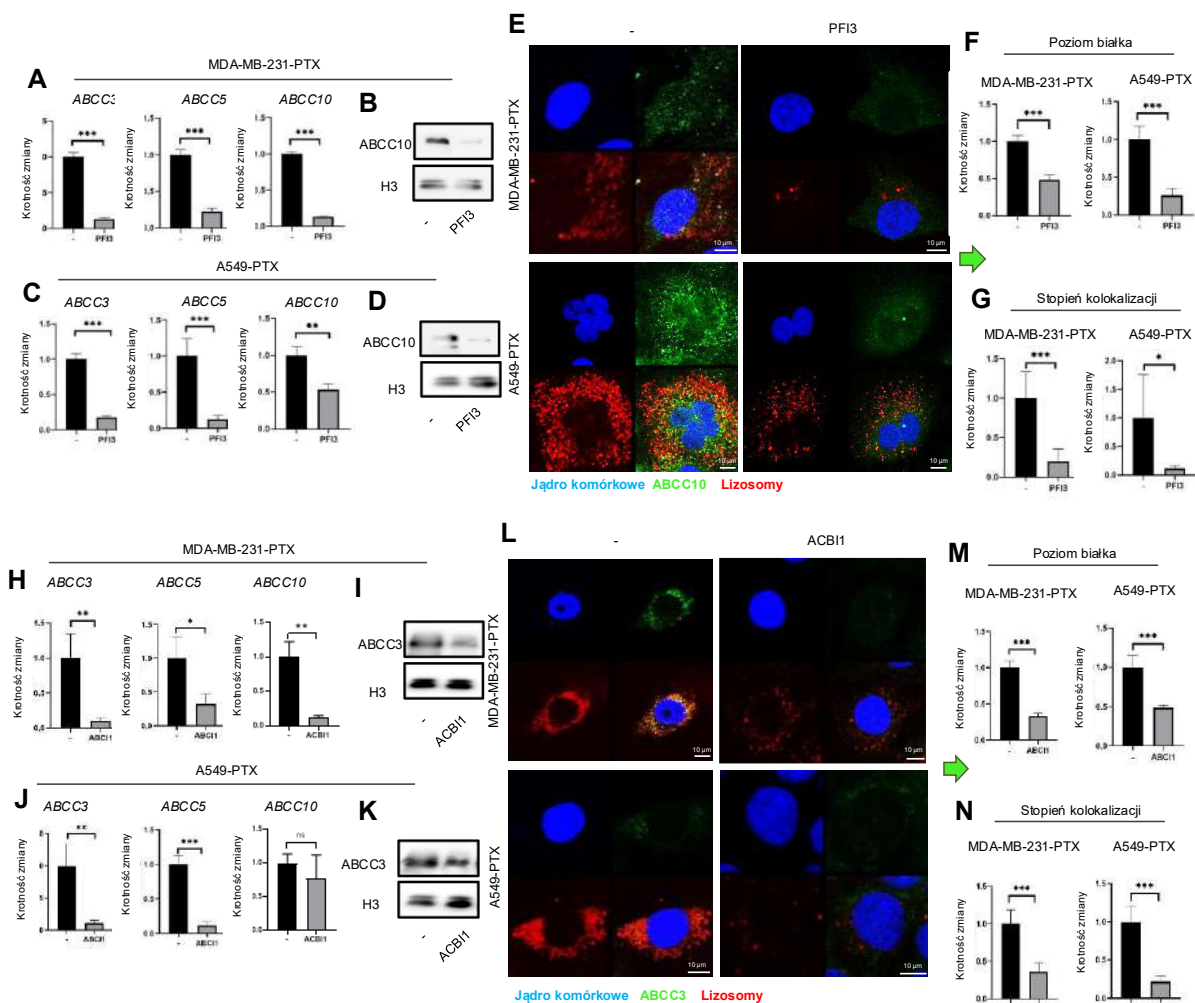
Następnie sprawdziłam czy BRG1 może wpływać na odpowiedź komórkową na chemioterapeutyki i powodować chemiooporność na związki inne niż paklitaksel. Zostało

to sprawdzone poprzez porównanie żywotności komórek różniących się poziomem BRG1 i eksponowanych na chemioterapeutyki o różnej kwasowości. Ta cecha badanych leków definiuje sposób ich biernego lub zależnego od ABC napływu do lizosomów. Wyciszenie BRG1 w obu liniach uwrażliwiło komórki na wszystkie testowane chemioterapeutyki (ryc. 15C), przy czym cytotoksyczność znacznie wzrosła w przypadku kwaśnych leków (cisplatyna, etopozyd), które nie wnikają do lizosomów na drodze dyfuzji biernej.

Wpływ BRG1 na penetrację leków zbadalam również w sferoidach. Kultury 3D komórek MDA-PTX i A549-PTX charakteryzują się akumulacją leku w warstwie obwodowej, podczas gdy wyciszenie BRG1 powodowało dotarcie leku do wewnętrznych warstw sferoidów (ryc. 15D). Sugeruje to, że zależne od BRG1 uwięzienie leków w lizosomach chroni głębsze części sferoidów przed cytotoksycznością leków.

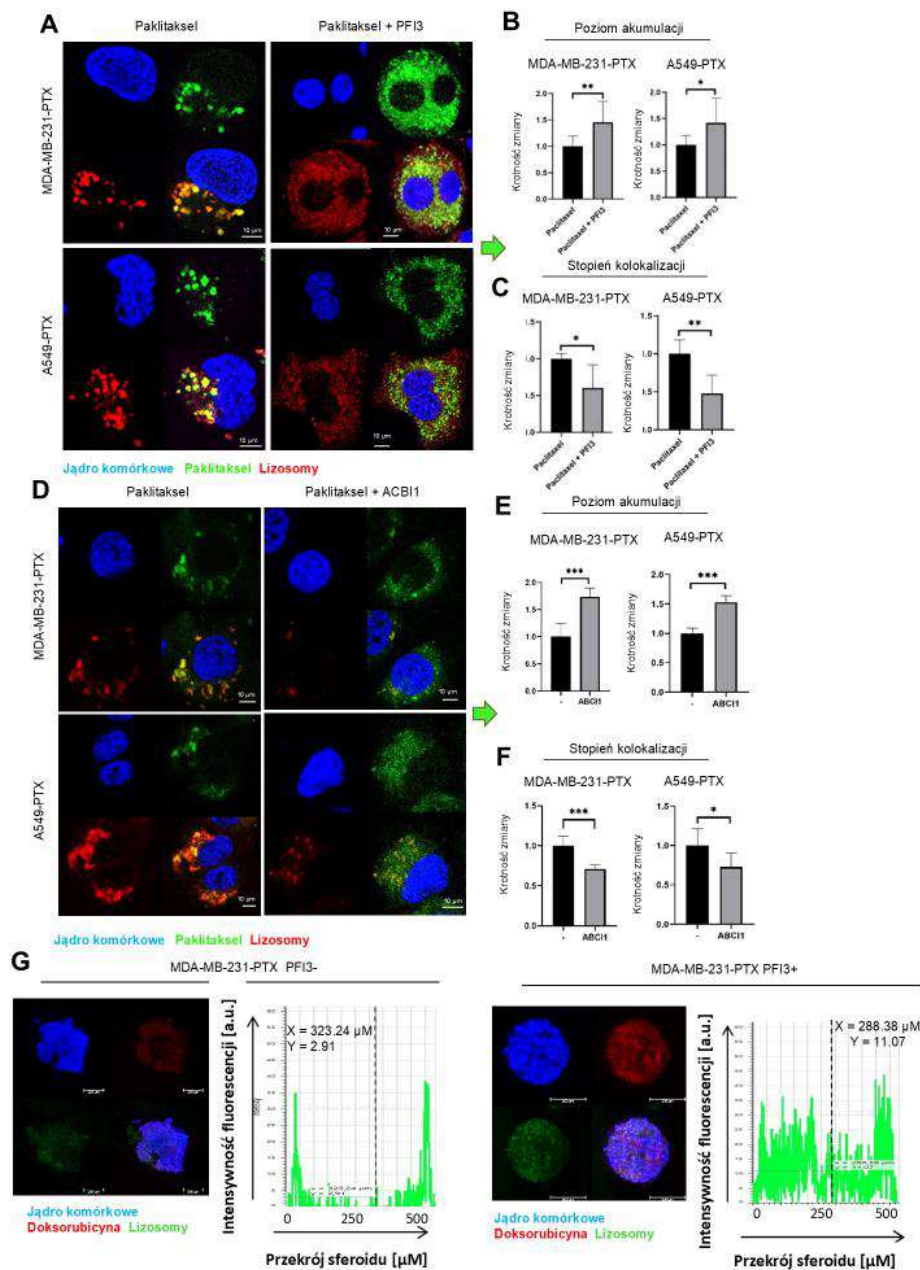
Ponieważ BRG1 odpowiada za ekspresję transporterów ABC i zwiększoną chemiooporność komórek opornych na paklitaksel, inhibitor BRG1/BRM – PFI3 i degrader SMARCA2/4 PROTAC – ACBI1 zostały przetestowane pod kątem ich potencjalnego zastosowania do uwrażliwiania komórek opornych na leki stosowane w chemioterapii. Wykazałam, że inhibitor SWI/SNF skutecznie obniża zarówno poziom mRNA, jak i białka trzech rozważanych transporterów (Ryc. 16A-D). Degradacja BRG1/BRM przez ACBI1 zmniejszyła ekspresję wszystkich trzech transporterów w linii MDA-MB-231-PTX oraz ABCC3 i ABCC5, nie mając znaczącego wpływu na ekspresję ABCC10 w linii A549-PTX (Ryc. 16 H-K). Zmniejszona ekspresja transporterów ABCC3 i ABCC10 oraz ich zmniejszone współwystępowanie z markerem lizosomalnym (Ryc. 16 E-G, 16 L-N) po PFI3 i ACBI1, zostało uwidocznione i skwantyfikowane za pomocą mikroskopii konfokalnej w liniach komórkowych opornych na paklitaksel.

PFI3 i ACBI1 zmieniały wewnątrzkomórkową dystrybucję leków, utrzymując znaczne stężenie leku poza lizosomami. Potwierdzono to mierząc akumulację i kolokalizację leku w lizosomach (ryc. 17A-F). Ponadto, wykazałam na przykładzie PFI-3, że zablokowanie kompleksu umożliwia również głębszą penetrację leku w sferoidach, podczas gdy nienaruszone hodowle 3D charakteryzowały się akumulacją leku wyłącznie w zewnętrznych warstwach komórek (ryc. 17G).



Ryc.16 Celowanie w kompleks SWI/SNF z wykorzystaniem PFI-3 i ACBI1 zmniejsza ekspresję transporterów ABCC występujących w lizosomach komórek opornych na paklitaxel. Na podstawie K. Gronkowska, S. Michlewska, T. Płoszaj, M. Strachowska, A. Stępień, M. Borowiec, A. Bednarek, A. Robaszkiewicz, BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel, *BioRxiv* (2025) [113]

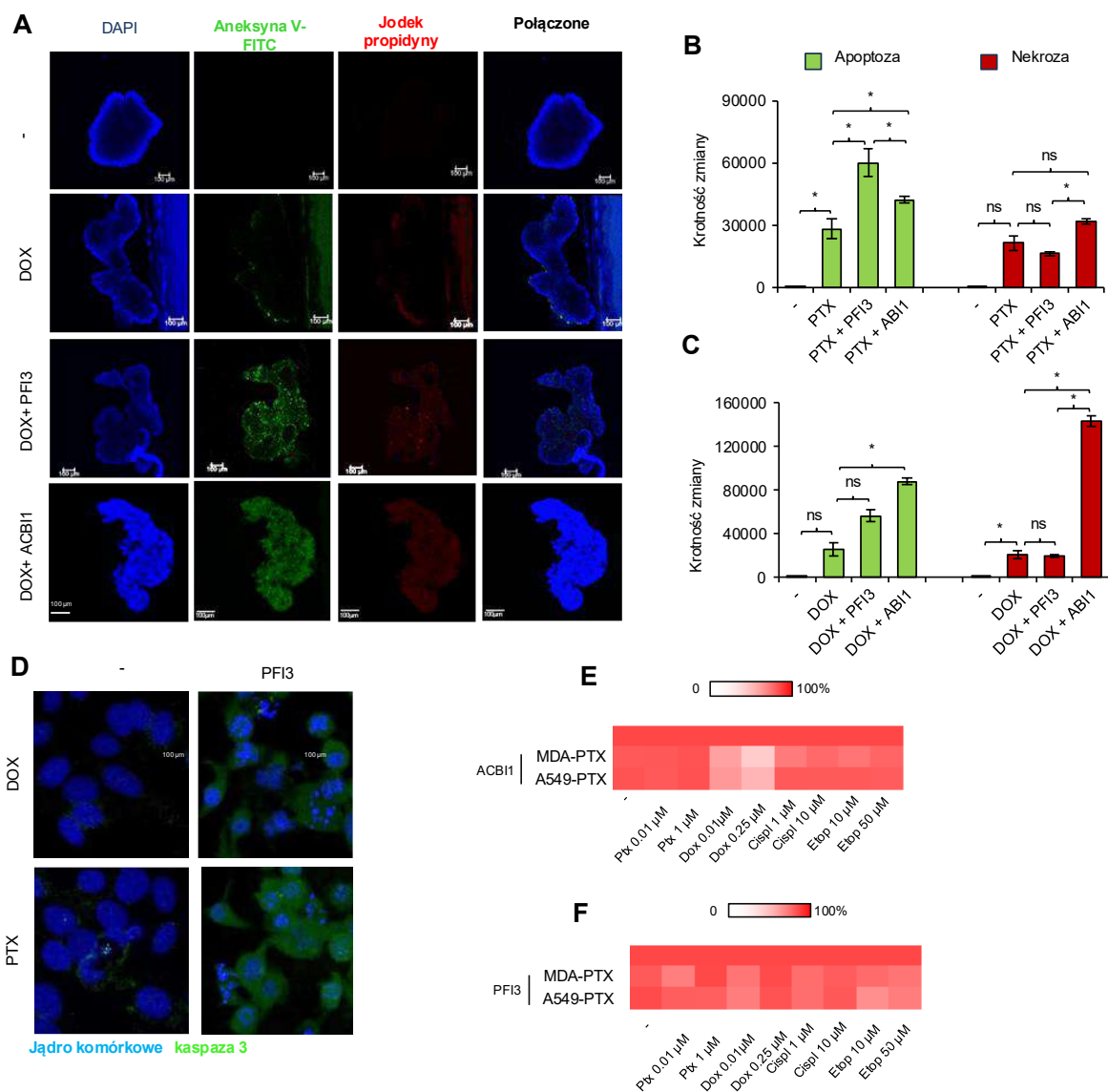
(A, C, H, J) Poziom mRNA *ABCC3*, *ABCC5* i *ABCC10* porównano metodą PCR w czasie rzeczywistym w komórkach MDA-MB-231 (A) i A549 (C) opornych na paklitaxel, eksponowanych na PFI3 (2,5 μ M, 72 godz.) oraz komórkach MDA-MB-231 (H) i A549 (J) opornych na paklitaxel, eksponowanych na ACBI1 (0,5 μ M, 72 godz.). Poziom transkrypcji znormalizowano do *ACTB*, *GAPDH* i *HPRT1*, a dla próbki kontrolnej przyjęto wartość 1. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono za pomocą testu t-Studenta, a różnice statystycznie istotne oznaczono *, gdy $p < 0,05$, **, gdy $p < 0,01$, ***, gdy $p < 0,001$. (B, D) Wpływ PFI3 na poziom białka ABCC10 w lizatach komórek MDA-MB-231 (B) i A549 (D) opornych na paklitaxel zbadano metodą Western Blot. (I, K) Wpływ degradacji podjednostek SWI/SNF ukierunkowanych na ACBI1 na poziom białka ABCC3 w lizatach komórek MDA-MB-231 (I) i A549 (K) opornych na paklitaxel zbadano metodą Western Blot. Histon H3 zastosowano jako kontrolę ładowania. (E, L) Ekspresję i lokalizację transporterów ABC uwidoczniono za pomocą mikroskopii konfokalnej w komórkach nieleczonych w porównaniu z komórkami traktowanymi PFI3 (E) i ACBI1 (L). Zielona fluorescencja transporterów ABC pochodzi od drugorzędowego przeciwciała sprzężonego z Alexafluor488, niebieska fluorescencja DNA z DAPI, natomiast lizosomalna czerwona fluorescencja z LysoTracker Deep Red. Intensywność fluorescencji (F, M) i kolokalizację (G, N) określono w jednostkach arbitralnych (a.u.) za pomocą oprogramowania Leica Application Suite X. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono za pomocą testu t-Studenta, a statystycznie istotne różnice oznaczono *, gdy $p < 0,05$, **, gdy $p < 0,01$, ***, gdy $p < 0,001$.



Ryc.17 Celowanie w SWI/SNF za pomocą PFI-3 i ABC11 zmniejsza akumulację leku w lizosomach komórek nowotworowych opornych na paklitaksel. Na podstawie K. Gronkowska, S. Michlewska, T. Płoszaj, M. Strachowska, A. Stępień, M. Borowiec, A. Bednarek, A. Robaszkiewicz, BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel, BioRxiv (2025) [113]

(A, D) Celowanie w SWI/SNF powoduje istotny spadek akumulacji paklitakselu w Oregon Green w lizosomach komórek opornych na paklitaksel. Do zbadania wpływu inhibitora SWI/SNF – PFI3 (2,5 μM, 24 h) (A) i ABC11 (D) na lokalizację wewnątrzkomórkową znakowanego fluorescencyjnie paklitakselu wykorzystano obrazowanie konfokalne. Lek oznaczono na zielono (Oregon Green 488), DNA na niebiesko (DAPI), a lizosomy na czerwono (LysoTracker Deep Red). Intensywność fluorescencji paklitakselu Oregon Green (B, E) i kolokalizację między lekiem a lizosomami (C, F) określono w jednostkach arbitralnych (a.u.) za pomocą pakietu Leica Application Suite X. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono za pomocą testu t-Studenta, a statystycznie istotne różnice oznaczono *, gdy $p < 0,05$, **, gdy $p < 0,01$, ***, gdy $p < 0,001$ (G) Sferoidy linii komórkowej MDA-MB-231-PTX kontrolnej i leczonej inhibitorem PFI3 (2,5 μM, 48 h) zostały zobrazowane pod kątem wewnątrzkomórkowej dystrybucji dokсорubicyny. Lek autofluorescencyjny oznaczono na czerwono, DNA na niebiesko, a lizosomy na zielono. Wykres intensywności fluorescencji na przekroju sferoidu wyznaczono w dowolnych jednostkach (a.u.) przy użyciu oprogramowania Leica Application Suite X.

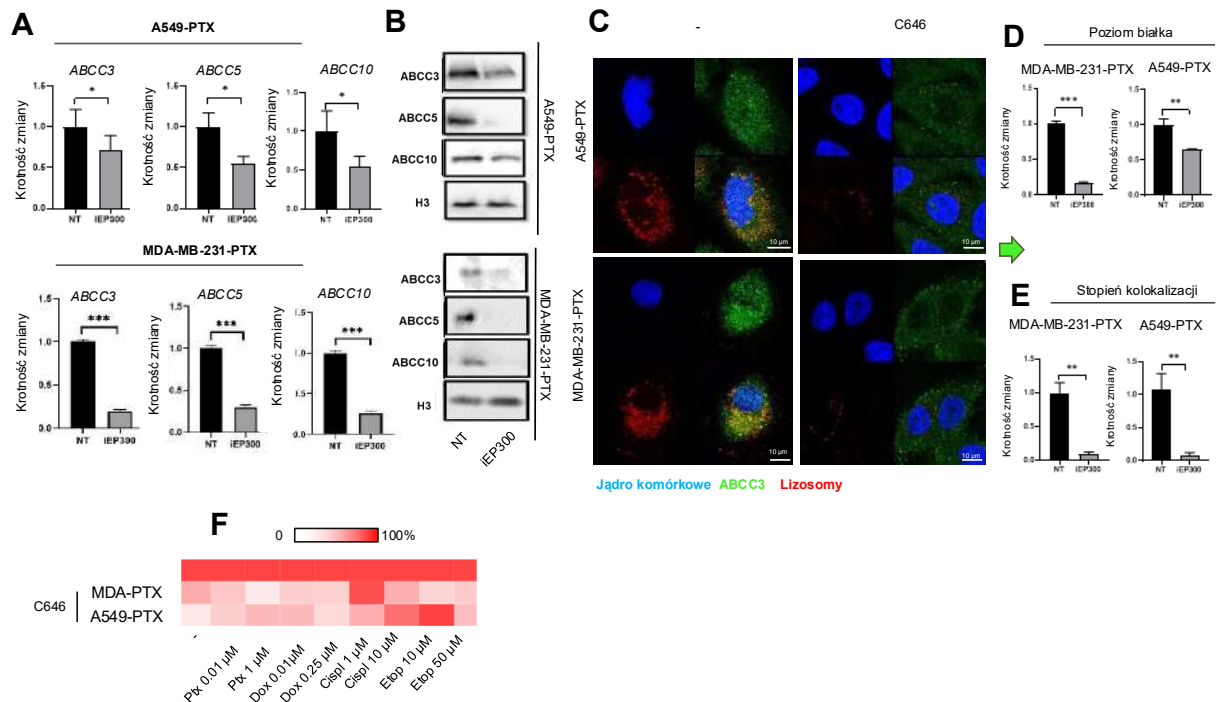
W kolejnym kroku sprawdziłam czy celowanie w kompleks SWI/SNF może uwrażliwiać komórki na działanie chemioterapeutyków. W sferoidach połączenie dokсорubicyny lub paklitakselu z PFI3 lub ABC11 okazało się skuteczniejsze w indukcji apoptozy w porównaniu z samymi lekami, co pokazano na obrazach konfokalnych z ilościowego oznaczenia zielonej fluorescencji aneksyny V (Ryc. 18A-C). Co istotne, komórki wyznakowane aneksyną V były równomiernie rozmieszczone na wszystkich głębokościach sferoidów poddanych działaniu PFI3 lub ABI1 i leków, w przeciwieństwie do komórek traktowanych samym lekiem, gdzie komórki apoptotyczne były zlokalizowane w warstwach zewnętrznych sferoidów. Istotną indukcję nekrozy obserwowano jedynie w sferoidach eksponowanych na dokсорubicynę, a dalsze nasilenie obumierania komórek na drodze nekrozy i apoptozy było spowodowane przez ABI1. Z kolei PFI3 znacząco nasilił apoptozę w sferoidach, jak również w hodowli 2D komórek traktowanych paklitakselem (ryc. 18D). Degradator PROTAC uwrażliwił komórki nowotworowe odporne na paklitaksel w modelu 2D, w szczególności na dokсорubicynę, ale również na niższe dawki cisplatyny i etopozydu (Ryc18E). Inhibitor SWI/SNF umiarkowanie zwiększał toksyczność wszystkich badanych leków, szczególnie przy ich niższych dawkach (ryc. 18F).



Ryc.18 PFI3 i ACBI1 zwiększają toksyczność leków przeciwnowotworowych w liniach komórek nowotworowych opornych na PTX. Na podstawie K. Gronkowska, S. Michlewska, T. Płoszaj, M. Strachowska, A. Stępień, M. Borowiec, A. Bednarek, A. Robaszkiewicz, BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel, BioRxiv (2025) [113]

(A) Celowanie w SWI/SNF zwiększa śmiertelność komórek opornych na paklitaksel w sferoidalnym modelu leczenia przeciwnowotworowego. 3-tygodniowe sferoidy inkubowano najpierw z PFI3 lub ACBI1 przez 72 godziny, a następnie dodawano paklitaksel i doksorubicynę przez 48 godzin. Eksternalizację fosfatydyloseryny, która jest markerem komórek apoptotycznych, monitorowano za pomocą mikroskopii konfokalnej po barwieniu komórek aneksyną V sprzężoną z FITC (kolor zielony). DNA komórek martwiczych (z zaburzoną integralnością błony komórkowej) barwiono jodkiem propidyny (kolor czerwony). DNA barwiono DAPI (kolor niebieski). (B, C) Intensywność fluorescencji określono w jednostkach arbitralnych (a.u.) za pomocą oprogramowania Leica Application Suite X. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono za pomocą testu t-Studenta, a statystycznie istotne różnice oznaczono *, gdy $p < 0,05$ *, **, gdy $p < 0,01$,***, gdy $p < 0,001$. (D) PFI3 (2,5 μM, 72 godz.) wzmacnia indukcję apoptozy przez doksorubicynę i paklitaksel w komórkach A549-PTX. Do porównania intensywności fluorescencji kaspazy 3 między komórkami leczonymi i nieleczonymi PFI3 zastosowano obrazowanie konfokalne z użyciem Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Niemcy). Wpływ ACBI1 (0,5 μM, 48 godz.) (E) i PFI3 (2,5 μM, 48 godz.) na toksyczność niektórych leków przeciwnowotworowych. Żywotność komórek określono ilościowo za pomocą testu opartego na resazuryinie 24 po podaniu leków. Żywotność komórek z samym lekiem przyjęto jako 100%.

Mając na uwadze funkcjonalną zależność między BRG1 i p300, sprawdziłam czy p300 również uczestniczy w ekspresji ABCC3, ABCC5 i ABCC10. Wykazałam, że inhibitor p300 (C646) skutecznie obniża zarówno poziom mRNA, jak i białka trzech rozważanych transporterów (Ryc. 19A-B). Zmniejszona ekspresja transportera ABCC3 po zastosowaniu C646 została zwizualizowana za pomocą mikroskopii konfokalnej (Ryc. 19C) oraz skwantyfikowana (Ryc. 19D). Podobnie jak inhibicja SWI/SNF, inhibicja p300 znacząco zmniejszyła kolokalizację transportera z lizosomami (Ryc.19E).



Ryc.19 p300 uczestniczy w aktywacji transkrypcji *ABCC3*, *ABCC5* i *ABCC10*, istotnych dla sekwestracji lizosomalnej leków w komórkach opornych na paklitaksel. p300 podobnie jak SWI/SNF zmniejsza wrażliwość komórek na działanie chemioterapii w modelu komórek opornych na paklitaksel. Dane dodatkowe

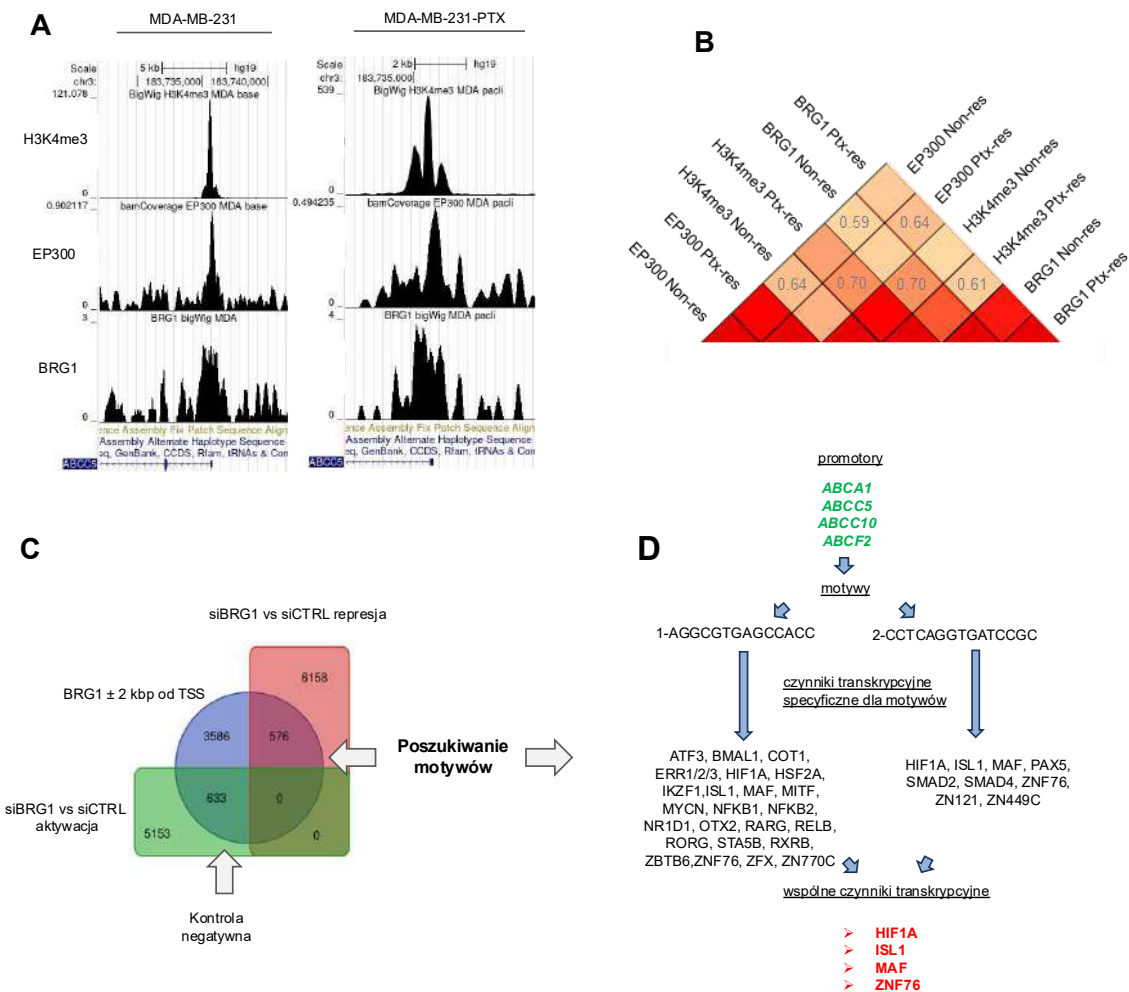
(A) Poziom mRNA transporterów ABC porównano między próbkami kontrolnymi oraz inhibicją p300 (C646; 2,5 uM) metodą PCR w czasie rzeczywistym. Poziom transkrypcji znormalizowano najpierw do genów metabolizmu podstawowego (*ACTB*, *GAPDH* i *HPRT1*), a następnie poziom mRNA kontroli przyjęto jako 1. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono za pomocą testu t-Studenta, a różnice istotne statystycznie oznaczono *, gdy $p < 0,05$ * i **, gdy $p < 0,01$. (B) Wpływ inhibicji EP300 (C646; 2,5 uM) na poziomy białka ABCC3, ABCC5 i ABCC10. Lizaty komórek analizowano metodą Western Blot. Histon H3 zastosowano jako kontrolę na równą ilość nakładanego lizatu. (C) Ekspresję i lokalizację transportera ABCC3 uwidoczniono za pomocą mikroskopii konfokalnej w komórkach nieleczonych w porównaniu z komórkami traktowanymi C646. Zielona fluorescencja transporterów ABCC3 pochodzi z drugorzędowego przeciwciała sprzężonego z Alexafluor488, niebieska fluorescencja DNA z DAPI, natomiast lizosomalna czerwona fluorescencja z LysoTracker Deep Red. Intensywność fluorescencji zielonego sygnału (D) i kolokalizację sygnałów (E) określono w jednostkach arbitralnych (a.u.) za pomocą oprogramowania Leica Application Suite X. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono za pomocą testu t-Studenta, a statystycznie istotne różnice oznaczono *, gdy $p < 0,05$ *, **, gdy $p < 0,01$, ***, gdy $p < 0,001$.

Biorąc pod uwagę znaczącą redukcję transporterów ABC poprzez inhibicję p300, sprawdziłam czy inhibicja acetylotransferazy będzie uwrażliwiała komórki

nowotworowe na działanie chemioterapii. Zastosowanie C646 uwrażliwiło komórki na działanie wszystkich testowanych chemioterapeutyków, przy czym najsilniejsze działanie zaobserwowano przy połączeniu inhibitora z doksorubicyną i paklitakselem (Ryc.19F).

Wiedząc już, że p300 oraz BRG1 uczestniczą w aktywacji ekspresji transporterów zaangażowanych w oporność na paklitaksel oraz mając na uwadze opisywane w literaturze współwystępowanie BRG1 z p300 w promotorach niektórych genów transkrypcyjnie aktywnych, charakteryzujących się trójmetylacją H3K4, zbadalam współwystępowanie p300, BRG1 i H3K4me3 na promotorach genów *ABC*. Co ciekawe, promotor *ABCC5*, który jest kontrolowany transkrypcyjnie przez BRG1 tylko w fenotypie opornym na leki, był podobnie wzbogacony w BRG1 i p300 i charakteryzował się podobnym profilem trójmetylacji H3K4 w obu fenotypach komórek (Ryc. 20A). Sugeruje to, że zależność transkrypcji od BRG1 może być determinowana przez inny, wciąż nieznaną czynnik. Może być to powiązane z reorganizacją proksymalnych promotorów podczas aktywacji genu i uwzględniania dodatkowych czynników inicjacji transkrypcji. Współczynnik korelacji Spearmana dla współdystrybucji BRG1 z H3K4me3 spadł z 0,7 do 0,61 podczas nabywania lekooporności, co sugeruje ekstruzję BRG1 z chromatyny, translokację do bardziej odległych regionów genomu lub spadek liczby regionów aktywnych transkrypcyjnie. Jednakże współwystępowanie p300 z BRG1 wzrosło z 0,59 do 0,64. Może to wskazywać na występowanie mechanizmu mającego na celu ułatwienie transkrypcji genów nasilanej przez p300 w komórkach opornych (Ryc. 20B).

Biorąc pod uwagę powyższe ustalenia, zdecydowałam się zidentyfikować potencjalne koregulatory p300-BRG1. W tym celu wykorzystałam analizę różnicowej ekspresji genów na podstawie danych z RNA-Seq, w której porównano profile mRNA komórek traktowanych siRNA kontrolnym oraz komórek z wyciszonym BRG1. Geny ulegające zmianie zestawione zostały z promotorami, na których występował BRG1, które wyłonione zostały w oparciu o analizę danych z eksperymentu ChIP-seq. Z tych dwóch zestawów danych wybraliśmy sekwencje, na których zidentyfikowano BRG1 w promotorach genów ulegających istotnej represji po wyciszeniu BRG1. Stanowiły one matryce do wyszukiwania motywów, natomiast sekwencje pików BRG1 w promotorach genów, których ekspresja została zwiększona po wyciszeniu enzymu, posłużyły jako kontrola (Ryc. 20C).

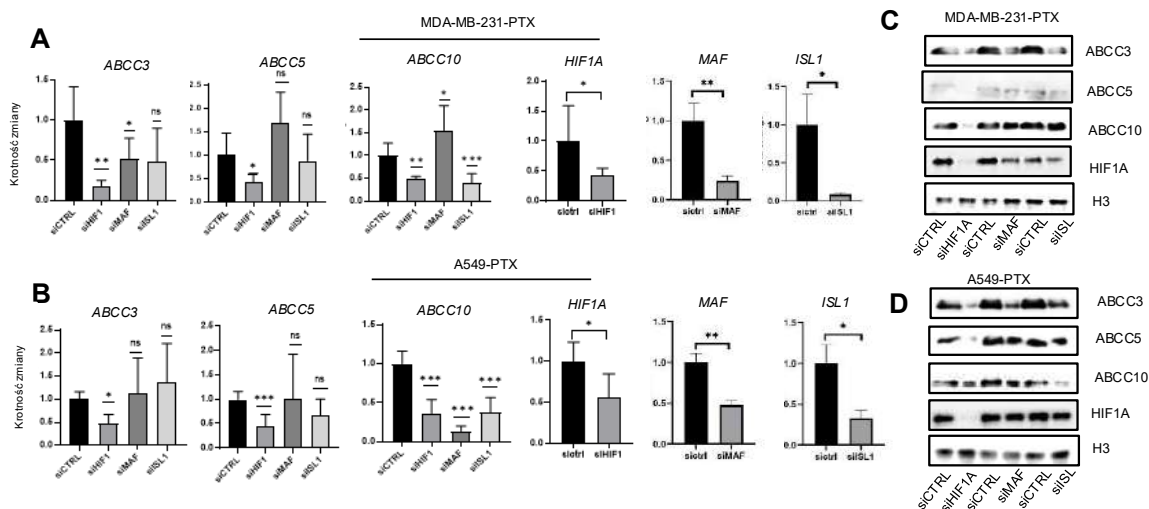


Ryc.20 MAF, ZNF76, HIF1A i ISL1 okazują się możliwymi koaktywatorami transkrypcji genów *ABC* zależnej od BRG1. Na podstawie: Karolina Gronkowska, Kinga Kołacz-Milewska, Sylwia Michlewska, Tomasz Płoszaj, Maciej Borowiec, Agnieszka Robaszkiewicz, „HIF1A, BRG1, and p300 interaction confers paclitaxel-induced drug resistance by enabling the overexpression of ABCC genes” [114]

(A) BRG1, p300 i H3K4me3 są wzbogacone w promotorze genu *ABCC5*, niezależnie od oporności komórek MDA-MB-231 na paklitaksel. Pokrycie genomu (w bamCoverage) dwoma białkami i modyfikacją histonów wokół TSS genu *ABCC5* zostało zwizualizowane w przeglądarce genomu USCS. (B) Współwystępowanie BRG1 i p300 jest słabsze w promotorach komórek opornych na paklitaksel. Kodystrybucję tych dwóch enzymów i H3K4me3 w komórkach MDA-MB-231 nieopornych i opornych obliczono za pomocą (computeMatrix) i zwizualizowano (plotHeatmap) dla regionów promotorowych przyjętych jako TSS ± 2,5 kbp. (C) Schemat uzasadniający wybór konkretnej grupy promotorów brane pod uwagę w poszukiwaniu motywów specyficznych dla BRG1. Wzbogacone w BRG1 promotory genu (TSS ± 2 kbp) zostały naniesione na wykres względem genów znacząco aktywowanych i represjonowanych przez BRG1 ($1 < \text{Log}_2\text{FC} < 1$; CuffDiff na danych RNA-Seq). Piki BRG1 w promotorach genów transkrypcyjnie aktywowanych przez ten enzym posłużyły jako dane wejściowe, podczas gdy piki BRG1 w promotorach genów tłumionych przez BRG1 posłużyły jako kontrola negatywna. (D) Dwa motywy dla BRG1 występują w promotorach transkrypcyjnie aktywnych genów *ABC* w komórkach MDA-MB-231 opornych na paklitaksel. Wzbogacone motywy BRG1 przeszukano z wykorzystaniem XSTREME. Występowanie zidentyfikowanych motywów STREME w promotorach rozważanych genów *ABC* sprawdzono w FIMO, ale wymieniono tylko promotory genów z $q < 0,01$. Listę drugorzędnych znanych motywów HOCOMOCO Human (rdzeń v11) dla czynników transkrypcyjnych ze znacząco wzbogaconymi odstępami (Significant Secondaries), które mogą wskazywać na tworzenie kompleksów białkowych z BRG1, wygenerowano w SpaMo.

Analiza wzbogacenia motywów za pomocą narzędzia XSTREME dostarczyła 3 motywy o długości od 10 do 15 nukleotydów. Pierwszy motyw, 1-AGGCGTGAGCCACC, pojawiał się w 11 promotorach, a drugi motyw, 2-CCTCAGGTGATCCGC w 7 promotorach genów *ABC*, ulegających ekspresji w nieopornych i opornych na paklitaksel komórkach MDA-MB-231 oraz znacznie nadekspresjonowanych w wyniku adaptacji komórek do paklitakselu. Te 2 motywy znaleziono również w promotorach *ABCC3*, *ABCC5* i *ABCC10*, których produkty były funkcjonalnie powiązane z lizosomalną sekwestracją leków. Trzeciego motywu, 3-CADCCTGAMA, w żadnym z promotorów genów *ABC* z FDR (q) < 0,01. W związku z tym pierwsze 2 motywy okazały się odpowiednimi kandydatami do wykorzystania w dalszych poszukiwaniach kofaktorów BRG1. Poszukiwanie podobieństw w 2 rozważanych motywach i znanych motywach wiążących czynniki transkrypcyjne doprowadziło do identyfikacji specyficznych dla motywu i wspólnych dla 3 genów *ABCC* czynników transkrypcyjnych. Należały do nich HIF1A, ISL1, MAF i ZNF76 (Ryc.20D).

Następnie przeanalizowaliśmy potencjalne koreulatory BRG1 pod kątem regulacji ekspresji *ABCC3*, *ABCC5* i *ABCC10* z wykorzystaniem siRNA.



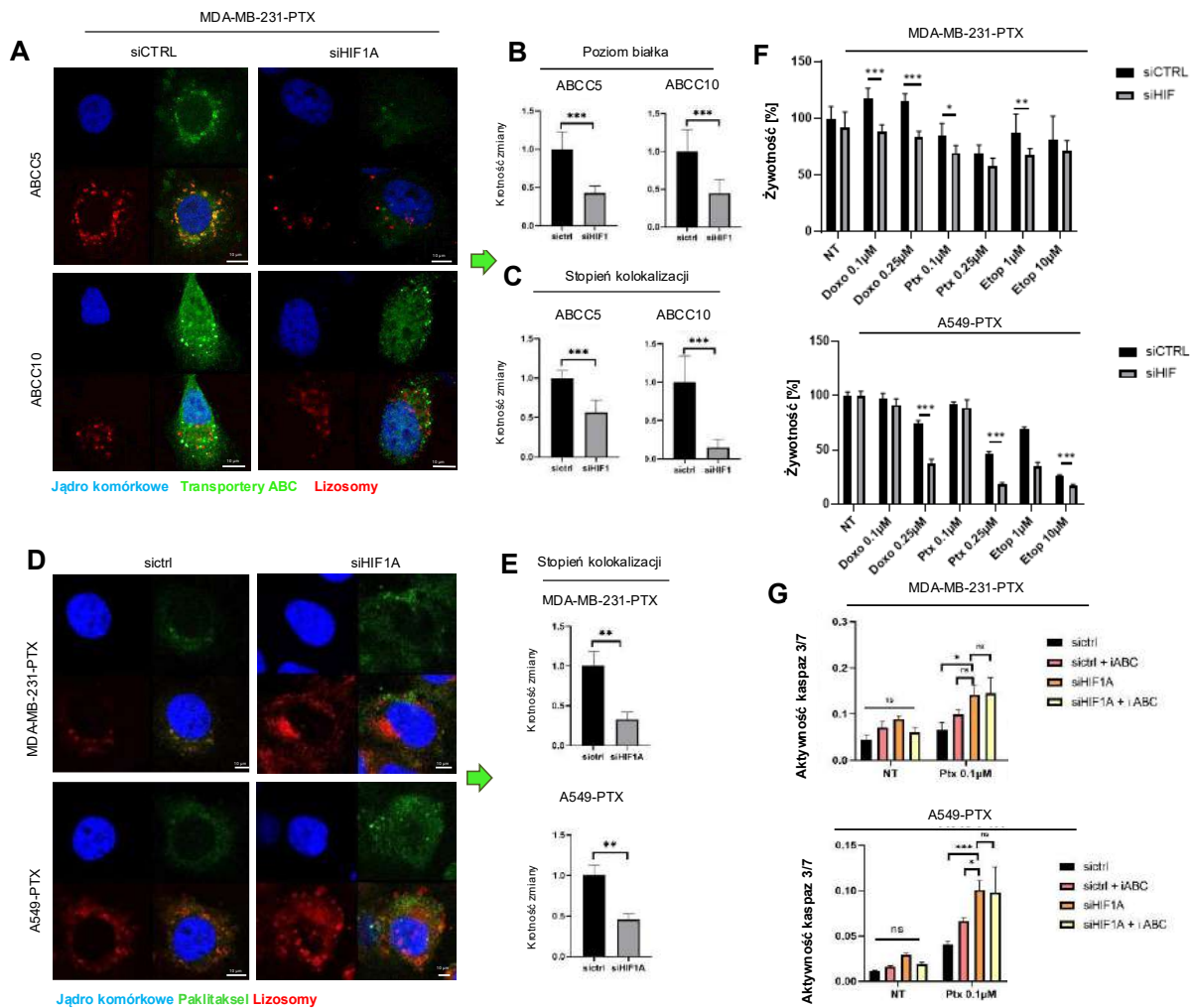
Ryc 21. HIF1A definiuje transkrypcję transporterów ABCC w komórkach raka piersi i płuc opornych na paklitaksel. Na podstawie: Karolina Gronkowska, Kinga Kołacz-Milewska, Sylwia Michlewska, Tomasz Płoszaj, Maciej Borowiec, Agnieszka Robaszekiewicz, „HIF1A, BRG1, and p300 interaction confers paclitaxel-induced drug resistance by enabling the overexpression of ABCC genes”[114]

(A-B) Poziom mRNA *ABCC3*, *ABCC5* i *ABCC10* porównano w komórkach 72 godziny po ich transfekcji siCTRL lub siHIF1A, siMAF, siISL1 metodą PCR w czasie rzeczywistym w komórkach MDA-MB-231 (A) i A549 (B) opornych na paklitaksel. Wartości surowe znormalizowano najpierw do *ACTB*, *GAPDH* i *HPRT1*, a następnie przyjęto stosunek 1 w próbce kontrolnej. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono za pomocą testu t-Studenta. (C-D) Wpływ przejściowego wyciszenia HIF1A, MAF i ISL1 na poziom białka *ABCC3* i *ABCC10* badano metodą Western Blot w komórkach MDA-MB-231 (C) i A549 (D) opornych na paklitaksel. Histon H3 zastosowano jako kontrolę ładowania.

Spośród wyłonionych koregulatorów, jedynie HIF1A regulował ekspresję wszystkich trzech białek ABC, co potwierdziliśmy na poziomie mRNA za pomocą Real-time PCR (Ryc. 21A, B) oraz na poziomie białka wykorzystując technikę Western Blot (Ryc.21 C, D).

Następnie za pomocą mikroskopii konfokalnej (Ryc. 22 A) wykazałam, że wyciszenie tego czynnika obniża poziom białek (Ryc. 22B) ABCC5 i ABCC10 oraz obniża ich kolokalizację z lizosomami (Ryc.22 C). Aby sprawdzić funkcjonalny wpływ zależnej od HIF1A ekspresji transporterów ABC, które są wzbogacone w lizosomach komórek opornych na paklitaksel, porównałam kolokalizację paklitakselu OregonGreen (Rys. 21C) z lizosomami w komórkach z prawidłową i obniżoną ekspresją HIF1A przy użyciu mikroskopii konfokalnej. Niedobór HIF1A uzyskany za pomocą siHIF1A znacząco zmniejszył akumulację leku w lizosomach w porównaniu z komórkami transfekowanymi siCTRL, co wykazano za pomocą ilościowego określenia kolokalizacji leków (Ryc 22E). Doprowadziło nas to do hipotezy, że HIF1A może wpływać na odpowiedź komórek na chemioterapeutyki i powodować chemiooporność związaną z lizosomalnym wychwytem leków. Aby przetestować taką opcję, porównałam żywotność komórek różniących się poziomem HIF1A i poddanych działaniu chemioterapeutyków. Wyciszenie HIF1A uwrażliwiło komórki obu linii opornych na dokсорubicynę, paklitaksel i etopozyd (Ryc. 22F). Odkrycie to sugeruje, że celowanie w HIF1A uwrażliwia komórki nowotworowe odporne na paklitaksel na niektóre chemioterapeutyki.

Aby potwierdzić, że zwiększona toksyczność paklitakselu w komórkach z wyciszonym HIF1A jest spowodowana głównie obniżeniem ekspresji transporterów ABC, porównałam aktywność kaspazy 3/7 w następujących próbkach: sictrl, sictrl + iABC, siHIF1A, siHIF1A + iABC leczonych i nieleczonych lekiem (Ryc. 22G). W komórkach MDA-MB-231-PTX opornych na paklitaksel, wyciszenie HIF1A, traktowanie komórek iABC oraz połączenie siHIF1A/iABC przed podaniem paklitakselu spowodowało podobny stopień uwrażliwienia komórek na lek. Sugeruje to, że HIF1A i cele zastosowanego inhibitora, którymi były białka ABCC, działają w tym samym szlaku regulatorowym.

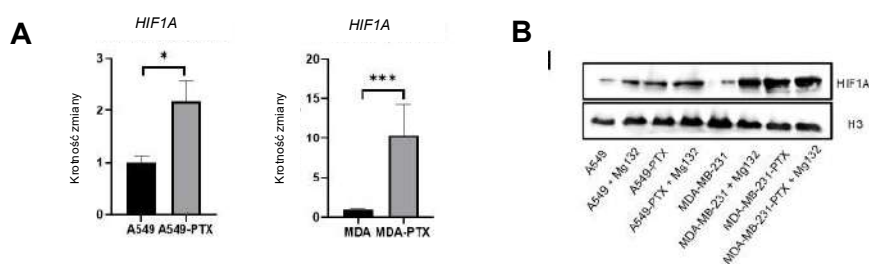


Ryc 22. Wyciszenie HIF1A uwrażliwia komórki raka płuc i piersi na działanie chemioterapii poprzez obniżenie ekspresji lizosomalnie zlokalizowanych transporterów ABCC. Na podstawie: Karolina Gronkowska, Kinga Kołacz-Milewska, Sylwia Michlewska, Tomasz Płoszaj, Maciej Borowiec, Agnieszka Robaszkiewicz, „HIF1A, BRG1, and p300 interaction confers paclitaxel-induced drug resistance by enabling the overexpression of ABCC genes”[114]

(A) Ekspresję i wewnątrzkomórkową lokalizację ABCC5 i ABCC10 w komórkach MDA-MB-231-PTX z prawidłową i wyciszoną ekspresją HIF1A analizowano metodą mikroskopii konfokalnej. Zielona fluorescencja odpowiada ABCC5 i ABCC10, DNA barwiono za pomocą DAPI (niebieski), natomiast lizosomy za pomocą LysoTracker (czerwony). Intensywność zielonej fluorescencji, która odpowiada ilości białek (B), oraz kolokalizację między białkami a lizosomami (C) określono w arbitralnych jednostkach (a.u.) za pomocą oprogramowania Leica Application Suite X. (D) HIF1A powoduje lizosomalną sekwestrację paklitakselu Oregon Green w lizosomach linii komórek nowotworowych opornych na paklitaksel. Porównano kolokalizację znakowanego fluorescencyjnie paklitakselu i lizosomów między komórkami z prawidłową i wyciszoną ekspresją HIF1A. Paklitaksel oznaczono na zielono (Oregon Green 488), lizosomy na czerwono (LysoTracker Deep Red), a DNA na niebiesko (DAPI). Kolokalizację (E) określono w jednostkach arbitralnych (a.u.) za pomocą pakietu Leica Application Suite X. (F) Toksyczność leków przeciwnowotworowych porównano w komórkach z prawidłowym (siCTRL) i z niedoborem (siHIF1A) HIF1. Komórki transfekowano 24 godziny przed podaniem leków przez kolejne 48 godzin. Żywność komórek określono ilościowo za pomocą testu opartego na resazuryinie. Żywność komórek z lekiem samym/w kontroli, komórki nieleczone lekiem przyjęto jako 100%. (G) Wpływ wyciszenia HIF1A (siHIF1A), iABC (MK571, 25µM) i ich kombinacji na apoptozę indukowaną paklitaksem (0,1 µM) porównano, mierząc aktywność kaspazy 3/7 za pomocą odczynnika Caspase-Glo® 3/7. Aktywność kaspazy 3/7 znormalizowano do względnej frakcji żywych komórek, którą oznaczono ilościowo za pomocą testu z resazuryiną.

W przypadku A549-PTX, wyciszanie HIF1A okazało się silniejsze niż iABC w uwrażliwianiu komórek na lek, stąd możliwy jest dodatkowy mechanizm antyapoptotyczny warunkowany przez HIF1A w tych komórkach, jednak nie zaobserwowano synergistycznego efektu połączenia siHIF1A z iABC w porównaniu z samym siHIF1A. Pozwala to wnioskować, że w obserwowanej oporności zależnej od HIF1A w znacznym stopniu pośredniczą białka ABCC.

Co ciekawe, linie odporne na paklitaksel charakteryzowały się zwiększoną ekspresją *HIF1A* na poziomie mRNA (Ryc. 23A). Mając na uwadze, że poziom HIF1A jest również kontrolowany przez proteasom, wykorzystałam jego inhibitor - związek MG132, aby sprawdzić, czy powtarzająca się ekspozycja komórek na paklitaksel zmienia zależną od proteasomu degradację rozważanego czynnika transkrypcyjnego (Ryc. 23 B). W liniach komórek wrażliwych na leki potwierdziłam udział proteasomu w degradacji HIF1A, podczas gdy komórki odporne wykazywały porównywalny poziom HIF1A niezależnie od ekspozycji na MG132. Sugeruje to, że podwyższony poziom HIF1A w komórkach opornych jest spowodowany wzmożoną transkrypcją genu *HIF1A* i ograniczoną degradacją proteasomalną białka HIF1A (Ryc. 23B).



Ryc. 23 HIF1A ulega zwiększonej ekspresji i zmniejszonej degradacji proteasomalnej w komórkach opornych na paklitaksel. Na podstawie: Karolina Gronkowska, Kinga Kołacz-Milewska, Sylwia Michlewska, Tomasz Płoszaj, Maciej Borowiec, Agnieszka Robaszkiewicz, „HIF1A, BRG1, and p300 interaction confers paclitaxel-induced drug resistance by enabling the overexpression of ABCC genes”[114]

(A) Porównanie poziomu mRNA *HIF1A* w nieopornych i opornych na paklitaksel komórkach A549 i MDA-MB-231 metodą PCR w czasie rzeczywistym. Surowe wartości znormalizowano najpierw do genów metabolizmu komórkowego (*ACTB*, *GAPDH* i *HPRT1*), a następnie w próbie kontrolnej przyjęto stosunek 1. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono za pomocą testu t-Studenta, a różnice statystycznie istotne oznaczono *, gdy $p < 0,05$, **, gdy $p < 0,01$, ***, gdy $p < 0,001$. (B) Porównanie poziomu białka HIF1A i p300 w nieopornych i opornych na paklitaksel komórkach A549 i MDA-MB-231 badano metodą Western Blot. Histon H3 zastosowano jako kontrolę ładowania. (H) Porównano stabilność HIF1A w komórkach kontrolnych bazowych i opornych na paklitaksel oraz w komórkach traktowanych inhibitorem proteasomu (MG132; 1 μ M). Poziom białka HIF1a badano metodą Western Blot. Histon H3 użyto jako kontroli ładowania.

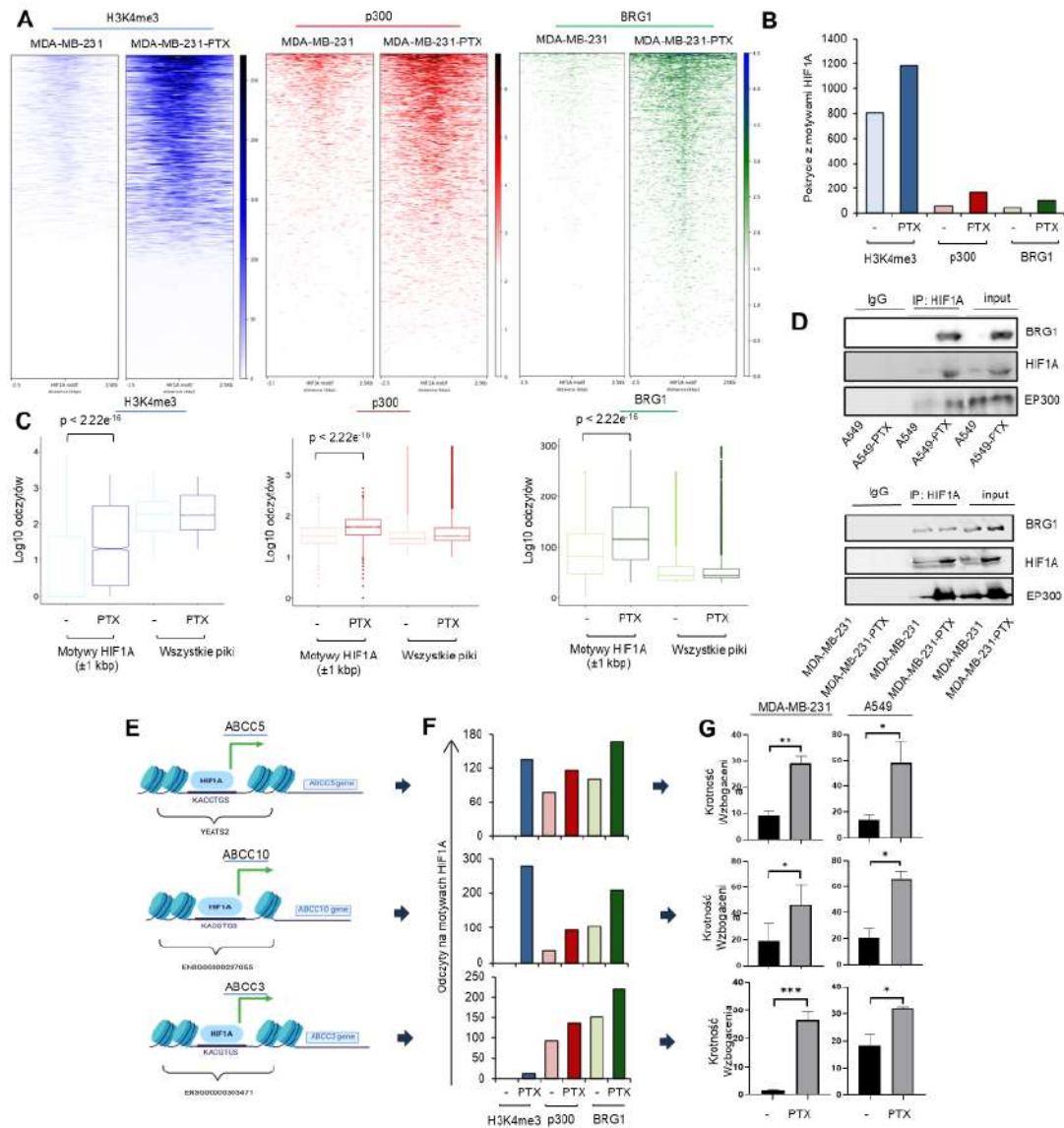
Porównaliśmy rozkład p300, BRG1 oraz modyfikacji H3K4me3 na motywach HIF1A w komórkach MDA-MB-231 nieopornych i opornych na paklitaksel. W tym celu najpierw zidentyfikowaliśmy potencjalne motywy dla wiązania HIF1A według danych z bazy JASPAR dla całego genomu. Następnie zbiór uzyskanych współrzędnych został zawężony do promotorów genów, które przyjęto jako TSS \pm 2 kbp. BRG1, p300 i H3K4me3 były znacznie wzbogacone w regionach genomowych obejmujących sekwencje wiążące HIF1A \pm 2,5 kbp w fenotypie opornym (Ryc.24A). Spośród trzech testowanych białek to BRG1 było najbardziej skupione na miejscach wiązania HIF1A, podczas gdy p300 i H3K4me3 były rozproszone wokół motywów dla HIF1A.

Aby określić, czy nabyciu lekooporności towarzyszy wzrost liczby motywów HIF1A charakteryzujących się występowaniem BRG1, p300 i H3K4me3, określiliśmy liczbę nakładających się interwałów dla: motywów HIF1A \pm 1 kbp w promotorach genów, pików BRG1, p300 i H3K4me3 wyłonionych za pomocą narzędzia MACS2 (Ryc. 24B). Spośród 4617 promotorów z motywem HIF1A, około 800 pokrywało się z miejscami występowania H3K4me3, co potwierdza aktywność transkrypcyjną promotorów z motywami dla HIF1A. Ich liczba wzrosła do \sim 1200 po wielokrotnym wystawieniu komórek na działanie paklitakselu. Podobne zmiany zaobserwowano dla BRG1 i p300, ale odsetek promotorów z BRG1 i p300 pozostał stosunkowo niski nawet w komórkach opornych (<5%). Taka ocena motywów HIF1A opierała się na metodzie binarnej i silnie zależała od statystyki związanej z MACS2, czyli od statystycznej analizy występowania białek w genomie w oparciu o ich immunoprecypitację. Dlatego wygenerowano stopień pokrycia miejsc wiązania HIF1A \pm 1 kbp przez mapowane odczyty dla 3 zestawów danych pochodzących z ChIP-Seq, czyli dla p300, BRG1 i H3K4me3. Zostało to porównane ze średnim pokryciem wszystkich pików wygenerowanych dla danego białka za pomocą MACS2 (rys. 24C). Również za pomocą tej metody wykazano istotne wzbogacenie H3K4me3, BRG1 i p300 na motywach HIF1A w komórkach opornych na paklitaksel. Sugeruje to, że lekooporność indukowana paklitakselem jest związana z bardziej transkrypcyjnie permissywną strukturą chromatyny w podzbiorze promotorów genów charakteryzujących się występowaniem motywu HIF1A, czemu towarzyszy istotne wzbogacenie p300 i BRG1.

Koimmunoprecypitacja dostarczyła dowodów na fizyczną interakcję między HIF1A, BRG1 i p300 w liniach komórkowych opornych na paklitaksel A549 i MDA-MB-231 (Ryc. 24D). W komórkach nieopornych ze stosunkowo niskim poziomem HIF1A, precypitacja tego białka wykazała niewielką interakcję z p300 w obu liniach

komórkowych oraz BRG1 w komórkach MDA-MB-231, co sugeruje, że niektóre kompleksy HIF1A-p300-BRG1 mogły istnieć również w komórkach wrażliwych, a interakcja między tymi 3 białkami była znacznie wzmocniona w odpowiedzi na stres wywołany paklitakselem. Mogło to wynikać ze wzrostu poziomu między innymi HIF1A w wyniku ekspozycji komórek obu linii na działanie paklitakselu oraz jego silniejszej interakcji z DNA i elementami chromatyny.

Mając na uwadze zależność transkrypcyjną *ABCC3*, *ABCC5* i *ABCC10* od poziomu HIF1A w fenotypach opornych na paklitaksel, zidentyfikowaliśmy motyw wiążący „KACGTGS” dla tego czynnika transkrypcyjnego w promotorach 3 genów *ABCC* i wykonaliśmy dla nich podobną analizę (Ryc. 24E). Trimetylacja H3K4 oraz poziom białek p300 i BRG1 był wyższy w promotorach *ABCC3*, *ABCC5* i *ABCC10* w komórkach opornych na paklitaksel w porównaniu z nieopornymi (Ryc. 24F). Aby potwierdzić możliwość tworzenia kompleksu HIF1A-p300-BRG1 w promotorach *ABCC3*, *ABCC5* i *ABCC10*, wykonałam immunoprecypitację HIF1A związanego z chromatyną, a następnie kwantyfikację DNA metodą PCR w czasie rzeczywistym (ChIP-qPCR) (Ryc. 24G). Technika to pokazała wyższy poziom HIF1A na promotorach genów *ABCC3*, *ABCC5* i *ABCC10* w komórkach opornych na paklitaksel. Sugeruje to, że HIF1A, BRG1 i p300 tworzą jednostkę regulatorową, która umożliwia silniejszą ekspresję genów *ABCC3*, *ABCC5* i *ABCC10*, warunkujących oporność komórek leczonych paklitakselem.

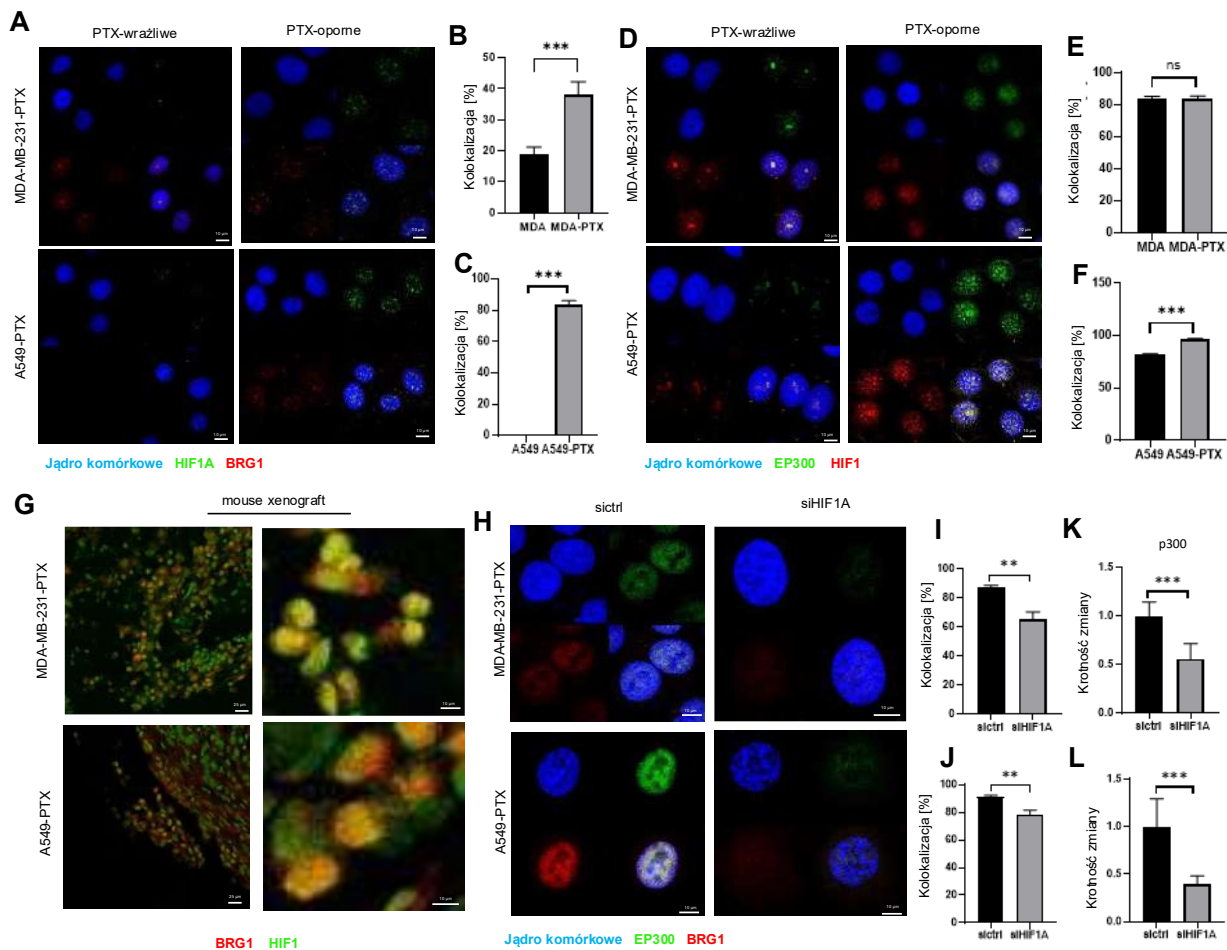


Ryc. 24 BRG1 i p300 wiążą się z motywami dla HIF1A na promotorach transkrypcyjnie aktywnych genów *ABCC*. Na podstawie: Karolina Gronkowska, Kinga Kołacz-Milewska, Sylwia Michlewska, Tomasz Płoszaj, Maciej Borowiec, Agnieszka Robaszkiewicz, „HIF1A, BRG1, and p300 interaction confers paclitaxel-induced drug resistance by enabling the overexpression of *ABCC* genes” [114]

(A) Porównanie rozkładu H3K4me3, p300 i BRG1 wokół motywu dla HIF1A (HRE±2,5 kbp) na promotorach genów w fenotypie wrażliwym i opornym komórek MDA-MB-231. (B) Liczba promotorów z motywami dla HIF1A, na których zaobserwowano statystycznie istotne występowanie H3K4me3, p300 i BRG1. Kwantyfikację przeprowadzono obliczając nakładające się interwały regionów wzbogaconych w H3K4me3, p300 i BRG1 i promotorów HRE-pozytywnych. (C) Pokrycie zmapowanych odczytów H3K4me3, p300 i BRG1 wokół motywu wiążącego HIF1A (±1 kbp) w komórkach nieopornych i opornych na paklitaksel. (D) HIF1A fizycznie oddziałuje z p300 i BRG1 w komórkach A549 i MDA-MB-231 opornych na paklitaksel. HIF1A, p300 i BRG1 wykryto metodą Western blot w immunoprecypitatach HIF1A. IgG stanowiło kontrolę. (E) Diagramy przedstawiające motyw wiążący dla HIF1A („KACGTGS”) w promotorach *ABCC10*, *ABCC5* i *ABCC3* w odniesieniu do miejsca inicjacji transkrypcji (TSS) tych genów. (F) Wykres kolumnowy przedstawia zmapowane odczyty H3K4me3, p300 i BRG1 zliczone na motywie HRE (±1 kbp) w promotorach wybranych *ABCC* (G) HIF1A jest wzbogacony w promotorach *ABCC3*, *ABCC5* i *ABCC10* w fenotypach opornych na paklitaksel linii A549 i MDA-MB-231. Poziom HIF1A związanego z promotorami genów został porównany i określona ilościowo metodą ChIP-qPCR w liniach komórkowych wrażliwych i opornych na paklitaksel. Wartości znormalizowano do IgG. Różnice między dwiema średnimi sprawdzono za pomocą testu t-Studenta.

Aby dodatkowo potwierdzić i zobrazować zakres interakcji HIF1A-BRG1 i HIF1A-p300 w całym genomie, zbadalam współwystępowanie tych białek w chromatynie za pomocą mikroskopii konfokalnej. HIF1A kolokalizuje z BRG1 (Ryc. 25A-C) i z p300 (Ryc. 25D-F) w fenotypach opornych na paklitaksel. Wizualne współwystępowanie wymienionych par białek zostało potwierdzone kwantyfikacją nakładania się fluorescencji między dwoma rozważanymi barwnikami fluorescencyjnymi w obszarze jądra komórkowego i porównane z wynikiem dla komórek nieopornych (Ryc. 25B-C, 25E-F). W komórkach A549 opornych HIF1A silnie kolokalizował z p300 i BRG1, natomiast w modelu raka piersi fenotyp lekooporności wykazywał zwiększoną kolokalizację HIF1A tylko z BRG1. Brak istotnie nasilonej interakcji HIF1-p300, ilościowo określanej na podstawie kolokalizacji tych dwóch białek w komórkach opornych na paklitaksel w porównaniu z komórkami nieopornymi, może wynikać z redystrybucji jądrowej p300 i HIF1A. Podobnie, stosunkowo silną ko-dystrybucję BRG1 i HIF1A zaobserwowano w skrawkach tkanek pobranych z guzów opornych na paklitaksel, które wyhodowano z komórek MDA-MB-231-PTX wstrzykniętych pod skórę myszy bezgranicznych (Ryc. 25G).

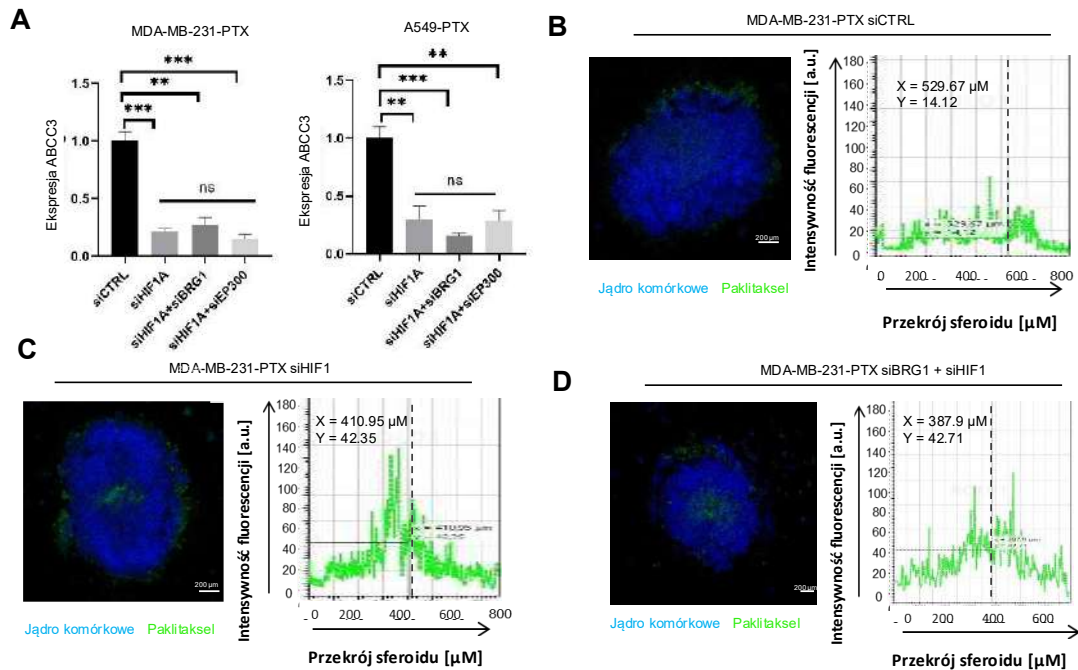
Biorąc pod uwagę wyższą ekspresję HIF1A w liniach komórkowych opornych na paklitaksel, a także zwiększone współwystępowanie BRG1 i p300 z HIF1A na chromatynie, postawiliśmy hipotezę, że HIF1A może mieć kluczowe znaczenie dla rekrutacji kompleksu BRG1/p300. Aby zweryfikować tę hipotezę, przetestowałam wpływ wyciszenia HIF1A na występowanie p300 i BRG1 związanych z chromatyną (Ryc. 25H). Niski poziom HIF1A znacząco zmniejszył kolokalizację pozostałych dwóch białek (Ryc. 25I-J). Ponadto, zmniejszeniu uległy frakcje p300 i BRG1 w obszarze jądra komórkowego (Ryc. 25K-L). Wyniki te potwierdzają rolę HIF1A w rekrutacji p300 i BRG1 do chromatyny w komórkach opornych na paklitaksel.



Ryc. 25 Współwystępowanie HIF1A-p300-BRG1 na chromatynie w raku piersi i płuc opornych na paklitaksel oraz ich wpływ na wnikanie leku do wnętrza sferoidu. Na podstawie: Karolina Gronkowska, Kinga Kolacz-Milewska, Sylwia Michlewska, Tomasz Płoszaj, Maciej Borowiec, Agnieszka Robaszkiewicz, „HIF1A, BRG1, and p300 interaction confers paclitaxel-induced drug resistance by enabling the overexpression of ABCC genes”[114]

(A, D) BRG1-HIF1A i p300-HIF1A kolokalizują na chromatynie w liniach komórkowych A549 i MDA-MB-231 opornych na paklitaksel, co potwierdza immunobarwienie i mikroskopia konfokalna. (A) HIF1A znakowany Alexa Fluor® 488 jest oznaczony na zielono, BRG1 znakowany Alexa Fluor® 594 jest oznaczony na czerwono, natomiast DNA barwione DAPI jest oznaczone na niebiesko. (D) p300 znakowany Alexa Fluor® 488 jest oznaczony na zielono, BRG1 znakowany Alexa Fluor® 594 jest oznaczony na czerwono, natomiast DNA barwione DAPI jest oznaczone na niebiesko. (B-C, E-F) Kolokalizację HIF1A i BRG1 (B-C) oraz HIF1A i p300 (E-F) określono w jednostkach arbitralnych (a.u.) za pomocą oprogramowania Leica Application Suite X. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono za pomocą testu t-Studenta, a statystycznie istotne różnice oznaczono *, **, *** dla $p < 0,05$, **, *** dla $p < 0,01$, *** dla $p < 0,001$. (G) Kolokalizację HIF1A i BRG1 w przeszczepie ksenogenicznym guza myszy (MDA-MB-231-PTX) potwierdzono za pomocą immunobarwienia i mikroskopii konfokalnej. HIF1A znakowany Alexa Fluor® 488 oznaczono na zielono, a BRG1 znakowany Alexa Fluor® 594 oznaczono na czerwono. (H) Wyciszenie HIF1A zmniejsza interakcję pomiędzy p300 i BRG1, co zostało przedstawione za pomocą immunobarwienia i mikroskopii konfokalnej w adherentnej hodowli komórkowej. P300 znakowane Alexa Fluor® 488 oznaczono na zielono, BRG1 znakowane Alexa Fluor® 594 oznaczono na czerwono, natomiast DNA barwione DAPI oznaczono na niebiesko. Kolokalizację (I-J) między BRG1 a p300 oraz ilość p300 (K-L) określono w jednostkach arbitralnych (a.u.) za pomocą oprogramowania Leica Application Suite X. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono testem t-Studenta, a różnice statystycznie istotne oznaczono * dla $p < 0,05$, ** dla $p < 0,01$, *** dla $p < 0,001$.

Wiedząc, że HIF1A, p300 i BRG1 regulują ekspresję transporterów ABCC, które są wzbogacone w lizosomach linii komórek nowotworowych opornych na paklitaksel, sprawdziłam, czy białka te działają w ramach jednej jednostki regulatorowej, czy też ich działanie jest niezależne od siebie i synergistyczne. Podwójne wyciszanie par HIF1A i BRG1 lub HIF1A i p300 zmniejsza transkrypcję *ABCC3* podobnie jak wyciszanie samego HIF1A (Ryc. 26A).



Ryc. 26 Wpływ HIF1A-p300-BRG1 na wnikanie leku do wnętrza sferoidu. Na podstawie: Karolina Gronkowska, Kinga Kołacz-Milewska, Sylwia Michlewska, Tomasz Płoszaj, Maciej Borowiec, Agnieszka Robaszekiewicz, „HIF1A, BRG1, and p300 interaction confers paclitaxel-induced drug resistance by enabling the overexpression of ABCC genes”[114]

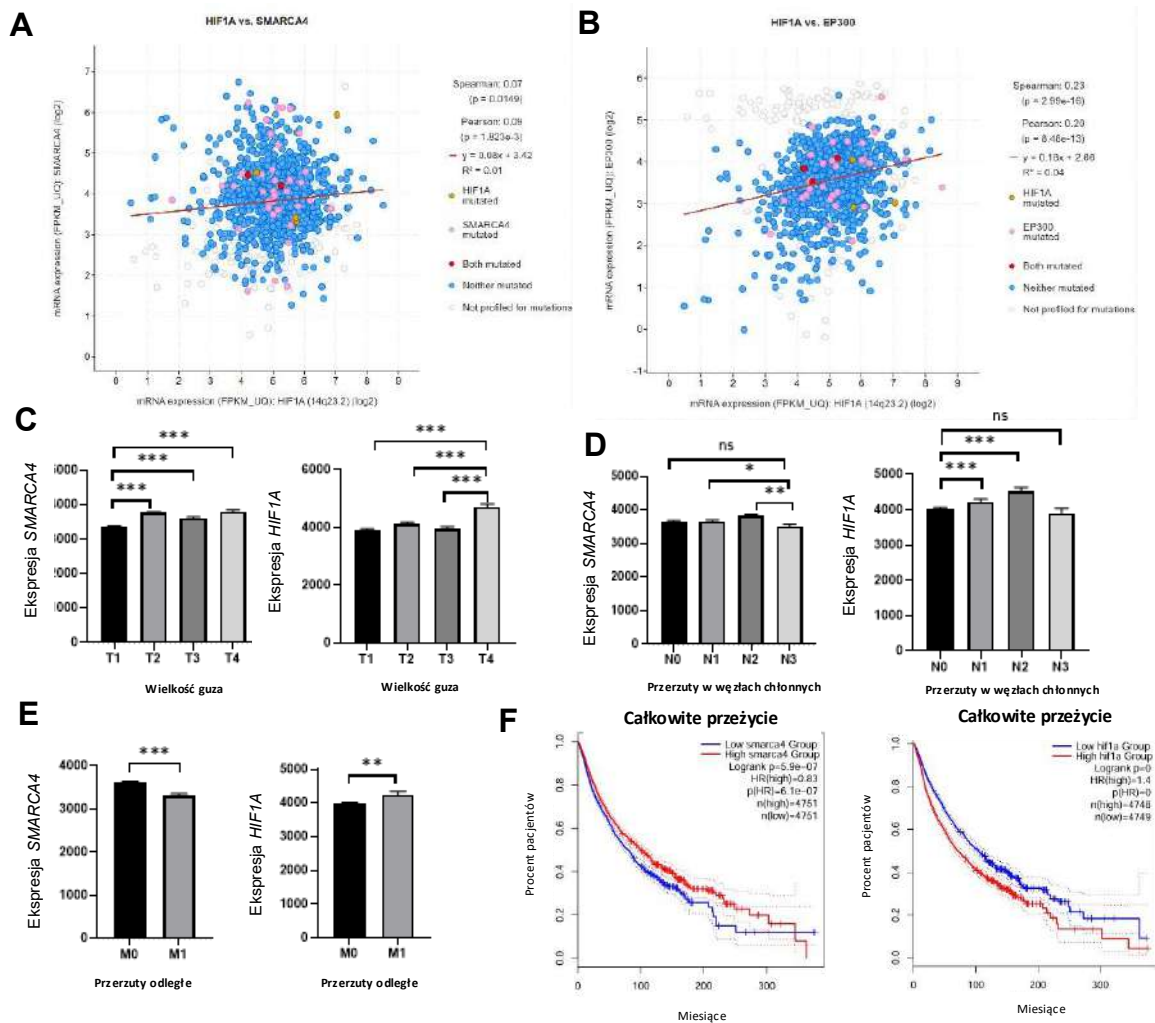
(A) Wyciszenie HIF1A i BRG1 oraz HIF1A i p300 nie wykazuje efektu synergistycznego i nie zmienia stopnia wyciszenia transkrypcji *ABCC3* wywołanego wyciszeniem samego HIF1A. Eksperyment przeprowadzono w komórkach MDA-MB-231 i A549 opornych na paklitaksel. Poziom mRNA porównano w komórkach 72 godziny po ich transfekcji siCTRL, siHIF1A samodzielnie lub w połączeniu z siSMARACA4 i siEP300 metodą PCR w czasie rzeczywistym w komórkach MDA-MB-231 i A549 opornych na paklitaksel. Surowe wartości znormalizowano najpierw do genów metabolizmu podstawowego (*ACTB*, *GAPDH* i *HPRT1*), a następnie przyjęto stosunek jako 1 w próbce kontrolnej. Różnicę między średnimi sprawdzono za pomocą jednokierunkowej analizy wariancji. (B-D) HIF1A zapobiega akumulacji paklitakselu w głębszych warstwach sferoidów MDA-MB-231 opornych na paklitaksel. 21-dniowe sferoidy transfekowano siHIF1A (C) lub siCTRL (B) albo kombinacją siHIF1A i siBRG1 (D), a 72 godziny później poddano działaniu paklitakselu Oregon Green na 48 godzin. Zdjęcia wykonano za pomocą mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Niemcy). Zielona fluorescencja odpowiada paklitakselowi, niebieska DNA barwionemu DAPI. Wykres intensywności fluorescencji w przekroju sferoidu wyznaczono w jednostkach arbitralnych (a.u.) za pomocą oprogramowania Leica Application Suite X.

Ponadto, przeanalizowałam funkcjonalny wpływ pojedynczego wyciszenia HIF1A i podwójnego wyciszenia HIF1A/BRG1 na penetrację leku w hodowlach 3D komórek MDA-PTX traktowanych paklitaksellem OregonGreen. W komórkach z wysoką ekspresją

HIF1A lek gromadził się w warstwie zewnętrznej sferoidu (Ryc. 26B), podczas gdy wyciszenie HIF1A pozwalało paklitakselowi dotrzeć do wewnętrznych warstw kultury 3D (Ryc. 26C). Co istotne, efekt podwójnego wyciszenia HIF1A i BRG1 nie różnił się od efektu pojedynczego wyciszenia HIF1A (Ryc. 26C). Nie zaobserwowałam także efektu synergistycznego, co potwierdza, że HIF1A/BRG1/p300 działają w tym samym szlaku, który warunkuje oporność komórek nowotworowych poprzez lizosomalną sekwestrację leków.

Korzystając z dostępnych danych klinicznych zdeponowanych w cBioportal (Pan-Cancer Atlas TGCA) wykazałam korelację w poziomie mRNA *HIF1A* i *SMARCA4*, a także *HIF1A* i *EP300* w nowotworach (Ryc. 27A-B), sugerując tym samym ich możliwą wspólną rolę w progresji nowotworu i odpowiedzi na leczenie.

Aby poprzeć tę hipotezę, porównałam ekspresję *SMARCA4* i *HIF1A* z kilkoma cechami kliniczno-patologicznymi, w tym wielkością nowotworu oraz powstawaniem przerzutów do węzłów chłonnych i przerzutów odległych (Ryc. 27 C-E). Według danych, wyższy poziom transkrypcji *HIF1A* jest związany z wyższym stadium zaawansowania nowotworu, które opisuje wielkość guza pierwotnego (Ryc. 27 C). Ponadto, podwyższonej ekspresji *HIF1A* towarzyszy wyższy poziom przerzutów do węzłów chłonnych i przerzutów odległych oraz znacznie krótsze całkowite przeżycie pacjentów (Ryc. 27 D-E). W przypadku *SMARCA4* wykazano związek pomiędzy wyższą ekspresją genu, a większym stopniem zaawansowania guza (Ryc. 27 C), oraz powstawaniem przerzutów do lokalnych oraz nieco oddalonych węzłów chłonnych (Ryc. 27 E-F). Obecności przerzutów w licznych węzłach chłonnych, które dodatkowo mogą naciekać sąsiednie struktury nie towarzyszył wzrost ekspresji *SMARCA4*. Podobnie, przerzuty odległe, charakteryzują się niższą ekspresją BRG1, co może wynikać z faktu, że subklony guza charakteryzujące się odmienną ekspresją BRG1 mogą mieć większą tendencję do przerzutowania do lokalnych węzłów chłonnych (wysoki BRG1) lub innych tkanek i narządów (niski BRG1).

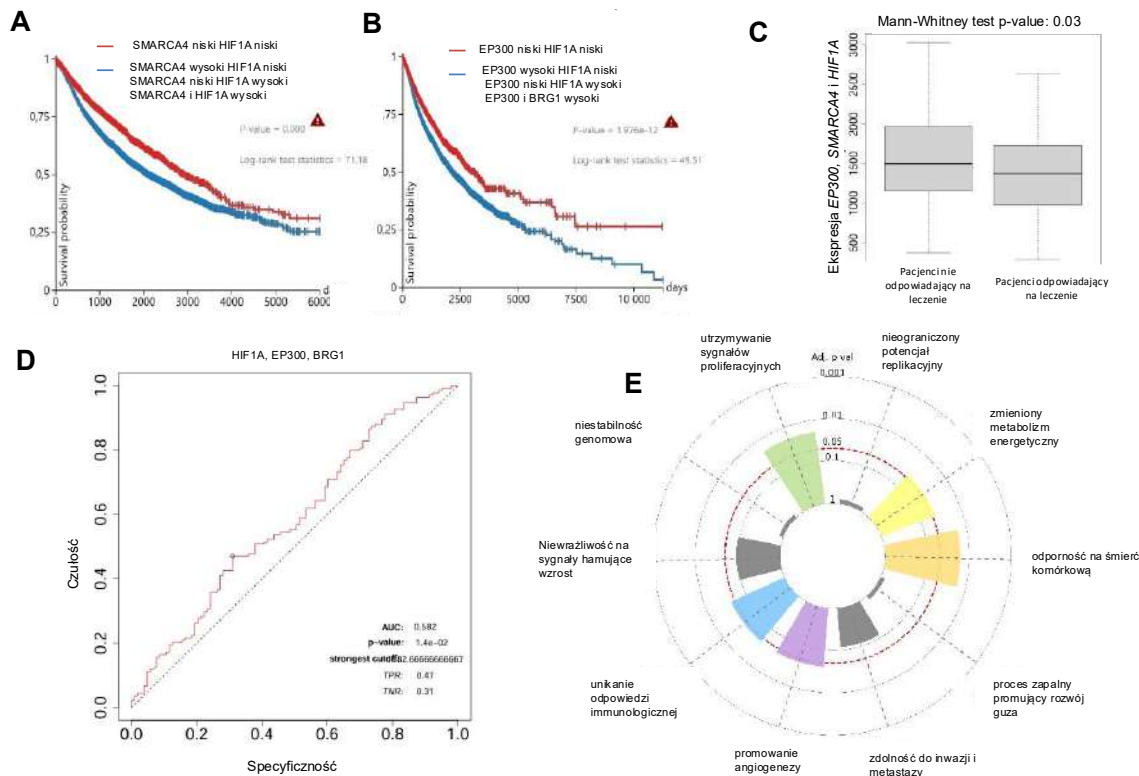


Ryc. 27 Związek między ekspresją *EP300* a wybranymi parametrami klinicznymi. Na podstawie: Karolina Gronkowska, Kinga Kołacz-Milewska, Sylwia Michlewska, Tomasz Płoszaj, Maciej Borowiec, Agnieszka Robaszkievicz, „HIF1A, BRG1, and p300 interaction confers paclitaxel-induced drug resistance by enabling the overexpression of ABCC genes”[114]

(A,B) Wykres korelacji transkrypcji *HIF1A* i *SMARCA4* (A) oraz *HIF1A* i *EP300* (B). Dane bazowe uzyskano ze wszystkich próbek TGCA Pan-Cancer Atlas (Pan-cancer analysis of whole-genome (ICGC/TCGA, Nature 2020)) przy użyciu cBioPortal. (C-E) Korelacja poziomu ekspresji *HIF1A* oraz *SMARCA4* z parametrami klinicznymi: wielkością guza (C), przerzutami w węzłach chłonnych (D) i przerzutami odległymi (E). Analizę statystyczną przeprowadzono w programie GraphPad Prism 8, a istotne różnice oznaczono * dla $p < 0,05$, ** dla $p < 0,01$, *** dla $p < 0,001$. (F) Całkowite przeżycie pacjentów w zależności od ekspresji *HIF1A* i *SMARCA4* wygenerowano w programie GEPIA 2.

Biorąc pod uwagę wielogenową analizę całkowitego przeżycia, jednoczesna niska ekspresja *SMARCA4* i *HIF1A* (Ryc. 28A) lub *HIF1A* i *EP300* (Ryc. 28B) wiąże się ze stosunkowo lepszym rokowaniem, podczas gdy wyższy poziom któregoś z dwóch sprzężonych czynników negatywnie wpływa na całkowite przeżycie pacjentów. Wskazuje to na możliwe pronowotworowe i promujące chorobę działanie HIF1A, p300 i BRG1. Korzystając z dostępnego online narzędzia ROCplot.org, przeanalizowałam związek między poziomem mRNA *HIF1A*, *EP300* i *SMARCA4* a 5-letnim przeżyciem

bez nawrotu u pacjentek z rakiem piersi leczonych taksanami (Ryc. 28C). Pozytywną odpowiedź na terapię i dłuższe przeżycie bez nawrotu zaobserwowano w kohorcie charakteryzującej się niższą ekspresją 3 analizowanych genów. Ponadto analiza ROC u pacjentów leczonych taksanami sugeruje, że współekspresję tych genów można uznać za biomarker odpowiedzi na chemioterapię opartą na taksanach (Ryc. 28D).



Ryc. 28. Związek pomiędzy współekspresją *HIF1A*, *EP300* i *SMARCA4* a odpowiedzią na terapię i rokowaniem pacjentów. Na podstawie: Karolina Gronkowska, Kinga Kolacz-Milewska, Sylwia Michlewska, Tomasz Płoszaj, Maciej Borowiec, Agnieszka Robaszekiewicz, „HIF1A, BRG1, and p300 interaction confers paclitaxel-induced drug resistance by enabling the overexpression of ABCC genes”[114]

(A-B) Całkowite przeżycie pacjentów w odniesieniu do niskiej ekspresji *HIF1A* i *SMARCA4* (A), a także *HIF1A* i *EP300* (B) wygenerowano przy użyciu Xena Functional Genomics Explorer. (C) Zależność odpowiedzi pacjentów klinicznych na terapię taksanami od transkrypcji *HIF1A*, *EP300* i *SMARCA4* oszacowano przy użyciu ROC Plotter. (D) Krzywa ROC opisująca odpowiedź na chemioterapię taksanami w grupie pacjentów charakteryzujących się jednocześnie wysoką transkrypcją *HIF1A*, *EP300* i *SMARCA4* (E) Analiza związku ekspresji *HIF1A*, *EP300* i *SMARCA4*, a cechami charakterystycznymi nowotworów warunkującymi progresję nowotworów. Kolorami oznaczono cechy charakterystyczne nowotworów charakteryzujących się wysoką ekspresją *EP300* i *HIF1A*.

Zatem jednoczesna podwyższona transkrypcja *SMARCA4*, *HIF1* i *EP300* może mieć niekorzystny wpływ na wynik leczenia pacjentów paklitakselem i innymi lekami z grupy taksanów. Analizy cech charakterystycznych raka identyfikują współekspresję *HIF1A* i *EP300* jako markery komórek nowotworowych mogące sprzyjać sygnalizacji pro-mitotycznej, opierających się mechanizmom śmierci komórkowej, podtrzymującym angiogenezę i unikającym destrukcji immunologicznej (Ryc. 28E). Odkrycie to wskazuje

również na możliwość występowania innych mechanizmów oporności i progresji napędzanych przez HIF1A, które prawdopodobnie ograniczają przeżycie pacjentów i odpowiedź na chemioterapię.

5.3 Podsumowanie i wnioski:

Podsumowanie:

- 1) Rozwój oporności komórek nowotworowych na paklitaksel powoduje wewnątrzkomórkową, zależną od transporterów ABCC redystrybucję leków do lizosomów
- 2) Inhibicja transporterów z grupy ABCC oraz wyciszenie *ABCC3*, *ABCC5* i *ABCC10* zapobiega lizosomalnej sekwestracji leków i uwrażliwia komórki odporne na paklitaksel na działanie chemioterapeutyków
- 3) BRG1 i EP300 uczestniczą w aktywacji transkrypcji niektórych transporterów ABC istotnych dla oporności wielolekowej w liniach komórek opornych na paklitaksel
- 4) Celowanie w SWI/SNF wykorzystując PFI-3 i ACB11 oraz w p300 wykorzystując C646 zmniejsza ekspresję transporterów ABCC występujących w lizosomach komórek opornych na paklitaksel i uwrażliwia komórki nowotworowe na działanie chemioterapii
- 5) Funkcjonalna interakcja HIF1A-p300-BRG1 definiuje transkrypcję transporterów *ABCC3*, *ABCC5* i *ABCC10* w komórkach raka piersi i płuc opornych na paklitaksel

Wnioski:

Przy wykorzystaniu chemioterapii warto zwrócić uwagę na ekspresję transporterów ABC, które jak opisano w literaturze mogą usuwać leki z komórki lub jak wykazałam w pracy sekwestrować leki w lizosomach. Ponadto, poziom ekspresji *SMARCA4*, *EP300* i *HIF1A*, zarówno przed terapią jak i w trakcie leczenia, może być istotnym markerem wskazującym rokowania chemioterapii. Jak wykazałam w pracy zwiększona ekspresja już jednego z tych białek, wiązała się z gorszym rokowaniem u pacjentów onkologicznych, a wysoka ekspresja wszystkich trzech genów wykazywała związek z chemioopornością pacjentów. Wysoki poziom białek BRG1, p300 i HIF1A może regulować ekspresję transporterów ABC u pacjentów, co w efekcie może prowadzić do powstania lekooporności. Ze względu, że białka te współdziałają na jednym szlaku zahamowanie aktywności jednego z nich mogłoby uwrażliwić pacjentów na działanie

chemioterapii i przywrócić działanie leków u pacjentów, u których występuje oporność związana z transporterami ABC. Jednakże, aby móc zastosować takie podejście terapeutyczne wymagane są dalsze badania nad inhibitorami tych białek, gdyż do chwili obecnej żaden inhibitor p300, HIF1A i BRG1 nie został zatwierdzony do zastosowania u ludzi.

6. Rola kompleksu SWI/SNF-p300 w zdolności komórek nowotworowych do regulowania odpowiedzi transkrypcyjnej w wyniku aktywacji ścieżki ATM/ATR-Chk1/Chk2-p53 przez cisplatynę

Cisplatyna jest często stosowanym lekiem chemioterapeutycznym należącym do grupy związków alkilujących, które zaburzają procesy replikacji oraz powodują uszkodzenia DNA. Działanie cytotoksyczne cisplatyny powstaje poprzez tworzenie wiązań poprzecznych wewnątrz- i międzyciociowych DNA oraz wiązań DNA-białko. Interakcja cisplatyny z DNA blokuje postęp replikacyjnych polimeraz DNA w fazie S, co może prowadzić do powstawania pęknięć dwuniciowych (DSB), które są wysoce toksyczną formą uszkodzenia DNA ze względu na ich skłonność do powodowania insercji, delecji, a nawet translokacji [115,116].

Kinaza białkowa z mutacją ataksji-teleangiektazji (ATM) i kinaza białkowa związana z ATM (ATR) są aktywowane w komórkach we wczesnej odpowiedzi na uszkodzenie DNA. Podczas gdy ATM jest aktywowana przez DSB, ATR jest aktywowana przez zablokowane widelki replikacyjne DNA między innymi po leczeniu cisplatyną. Te kinazy białkowe prowadzą do zatrzymania cyklu w fazie G1 za pośrednictwem fosforylacji p53 [117]. ATM i ATR fosforylują p53 na Ser15 i stabilizują go, ponadto aktywują dodatkowo kinazy punktów kontrolnych Chk1 i Chk2, które fosforylują p53 na Ser20 [118]. Fosforylacja Ser15 i Ser20 promuje wiązanie acetylotransferaz lizyny: PCAF, p300 i/lub białka wiążącego CREB (CBP) oraz acetylację karboksylowego końca p53 [119], co zwiększa specyficzne wiązanie p53 do DNA i może aktywować transkrypcję poprzez rekrutację koaktywatorów lub ułatwianie acetylacji histonów [118]. Aktywowany p53 prowadzi do transaktywacji p21, kodowanego przez *CDKN1A*. Białko tohamuje kinazy zależne od cyklin (CDK) i zatrzymuje podziały mitotyczne poprzez rekrutację represora transkrypcyjnego Rb do promotorów kontrolowanych przez czynnik transkrypcyjny E2F1. Umożliwia to naprawę uszkodzeń DNA [120,121]. Fosforylowanie H2AX w miejscach uszkodzeń DNA powoduje rekrutację białek naprawczych DNA

[117]. Białka MGMT i ALKBH uczestniczą w bezpośrednim odwróceniu alkilacji zasad [122]. Wewnątrzniowe wiązania poprzeczne są zwykle naprawiane przez naprawę przez wycinanie nukleotydów (NER), podczas gdy ścieżka naprawy niedopasowań (MMR) może rozpoznawać addukty, ale ich nie naprawia. Pęknięcia dwuniciowe są naprawiane poprzez rekombinację homologiczną (HR), łączenie końców niehomologicznych (NHEJ), syntezę ponad miejscem uszkodzenia (TLS) i przez szlak niedokrwistości Fanconiego (FA) [116,123]. W przypadku upośledzonej naprawy lub nadmiernych uszkodzeń komórki ulegają apoptozie. Chociaż cisplatyna jest wysoce skuteczna, oporność wewnętrzna i nabyta podczas cykli leczenia są stosunkowo powszechne i pozostają głównym wyzwaniem dla terapii przeciwnowotworowej opartej na cisplatynie. Wśród mechanizmów oporności na cisplatinę wyróżnić można zmniejszone wchłanianie leku do komórek, jego usuwanie i detoksykacja oraz zwiększenie zdolności do naprawy uszkodzeń DNA powodowanych cisplatiną [117]. Oporność na leki uszkadzające DNA powiązано z nadekspresją genów zaangażowanych w naprawę uszkodzeń DNA takich jak: *FEN1*, *FANCG*, *RAD23B*, *ERCCI* [124], *FANCI* [125], *XRCC2* [126] *XRCC1* [127] *RAD51* [128] oraz białek zapobiegających indukowanej uszkodzeniami apoptozie np. *DUSP12* [129], *RECQL4* [130] czy *HSP70* [131].

p53 jest kluczowym elementem szlaku ATM/ATR aktywowanego przez uszkodzenia DNA. Jest to czynnik transkrypcyjny wiążący się z DNA za pomocą motywu rozpoznającego DNA - elementu odpowiedzi p53 (p53RE). Sprzyja to lub zapobiega tworzeniu aktywnych kompleksów transkrypcyjnych [120,132]. Pomimo długotrwałych badań nad tym białkiem, nie ma udokumentowanego, uniwersalnego modelu aktywacji lub supresji genów zależnych od p53. Warto podkreślić, że te dwa przeciwstawne oddziaływania wydają się być specyficzne dla konkretnych ścieżek sygnałowych. Przypuszczano, że różnice w sekwencjach regionów wiążących p53 (p53 responsive element; p53RE) determinują indukcję lub represję genów przez to białko, ale późniejsze badania obejmujące cały genom sugerowały, że p53 jest funkcjonalnie związany wyłącznie z aktywacją transkrypcyjną w miejscach wiązania [132]. Oprócz *CDKN1A*, p53 bezpośrednio transaktywuje również *E2F7*, który koduje represyjnego członka rodziny E2F. p53 aktywuje ponadto ekspresję miRNA i długich niekodujących RNA, co również może pośrednio wpływać na transkrypcję genów [120,121]. Analiza bezpośredniego programu transkrypcyjnego zależnego od p53 z wykorzystaniem

sekwencjonowania Global Run-On (GRO-seq) wykazała jednak, że p53 represjonuje podzbiór genów (np. *PTP4A1*, *HES2*, *GJB5*) w proliferujących komórkach przed jego aktywacją [133]. Jednakże mechanizm, który odpowiada na występowanie p53 w represjonowanych promotorach, a także sposób, który przełącza transkrypcyjny kierunek zmian w zależności od miejsca związania p53 lub warunków nie został dotychczas opisany. Dane literaturowe wskazują, że p53 może aktywować ekspresję genów zaangażowanych w naprawę DNA takich jak: *DDB2* [134], *XPC*, *XRCC5* i *TP53I3* [135], ale także represjonować niektóre z nich np. *RAD51* [128] czy *BRCA2* [136].

Według doniesień to BRG1, a nie BRM, jest niezbędne do aktywacji ekspresji *CDKN1A* przez p53 w komórkach MCF7. Jednak w komórkach H1299 z niedoborem BRG1, BRM również indukuje ekspresję *CDKN1A*. Podobnie, BRM uaktywnia ekspresję p21 w komórkach MCF7, w których BRG1 jest trwale wyciszony. [137]. Z kolei w innej pracy eksperymentalnej BRG1 miał hamujący wpływ na aktywność p53 w kilku liniach komórkowych. Wyciszenie BRG1 ale nie BRM za pomocą RNAi, powodowało aktywację p53 i wzrost poziomu p21. Wykazano, że region bogaty w prolinę (PRR), unikalny dla BRG1, był niezbędny do wiązania się BRG1 z acetylotransferazą CBP, jak również z p53. Delecja PRR prowadząca do powstania BRG1 defektywnego w wiązaniu CBP hamowała destabilizację p53. Co ważne, obniżenie ekspresji BRG1 i CBP za pomocą RNAi zmniejszyło poliubikwitynację p53 *in vivo*. Sugerowano więc, że sygnały mitogenne promują destabilizację p53 w proliferujących komórkach za pośrednictwem CBP-BRG1. Natomiast w odpowiedzi na uszkodzenia genotoksyczne, CBP i p300 zmieniają się w aktywatory, indukując acetylację p53 i aktywując jego funkcje protranskrypcyjne. W odpowiedzi na uszkodzenie DNA, zdecydowanie mniejsza frakcja CBP tworzyła kompleks z BRG1, co korelowało ze stabilizacją p53. Co więcej, zaobserwowano zmniejszenie poziomu BRG1 i CBP w miejscu wiązania p53 do promotora *CDKN1A*, podczas gdy dla porównania, poziomy p53 i p300 na promotorach były podwyższone. Zaproponowano model, w którym p53 jest stale rekrutowane do promotorów docelowych, gdzie jest inaktywowane przez kompleks BRG1 zawierający CBP, a proliferujące komórki nowotworowe z ekspresją dzikiego typu p53 zachowują funkcję BRG1-CBP, aby uniknąć zahamowania wzrostu [138]. Ponadto, w komórkach poddanych działaniu cisplatyny zaobserwowano funkcjonalne interakcje p53 z p300. p53 rekrutował CITED2/p300 do promotora genu *ERCC1* promując naprawę DNA [116] oraz

p300 do promotora *ABCC10*, którego białko przyczynia się do usuwania leku z komórek lub zamyka go w wewnątrzkomórkowych organellach [63].

Mając na uwadze sprzeczne doniesienia dotyczące roli kompleksu SWI/SNF w transaktywacji *CDKN1A* przez p53 oraz dane wskazujące na współdziałanie p300 i p53 w kontrolowaniu transkrypcji *CDKN1A*, *ERCC1* i *ABCC10* celem ostatniej części rozprawy doktorskiej stało się określenie roli kompleksu SWI/SNF-p300 w zależnej od p53 ekspresji genów aktywowanych przez cisplatynę.

6.1 Materiały i metody

Materiał badawczy:

Materiał badawczy stanowiła linia komórkowa MCF7 (ATCC), którą wybraliśmy ze względu na dziki typ p53 oraz fakt, że komórki te charakteryzują się zależną od p53 opornością na cisplatynę, co zostało potwierdzone uwrażliwieniem komórek na leki po zaburzeniu p53 [139]. Komórki hodowano w podłożu DMEM uzupełnionym 10% FBS i penicyliną/streptomycyną (odpowiednio 50 U/ml i 50 µg/ml) w 5% CO₂.

Metody:

- 1) Western Blot – analiza poziomu białek w lizatach komórkowych
- 2) Real-time PCR – analiza poziomu mRNA określonych genów
- 3) Mikroskopia konfokalna – analiza poziomu białek, kolokalizacja białek
- 4) Cytometria przepływowa – analiza cyklu komórkowego
- 5) Sekwencjonowanie RNA – analiza transkryptomu komórki
- 7) Immunoprecypitacja chromatyny – analiza oddziaływania białek z sekwencjami regulatorowymi DNA określonych genów (ChIP-qPCR) lub genomowo (ChIP-seq)
- 8) Analiza bioinformatyczna danych ChIP-seq i RNA-seq
- 9) Koimmunoprecypitacja białek – analiza bezpośredniego oddziaływania pomiędzy białkami
- 10) Testy cytotoksyczności - analiza aktywności metabolicznej komórek z wykorzystaniem resazuryiny celem porównania cytotoksyczności badanych związków

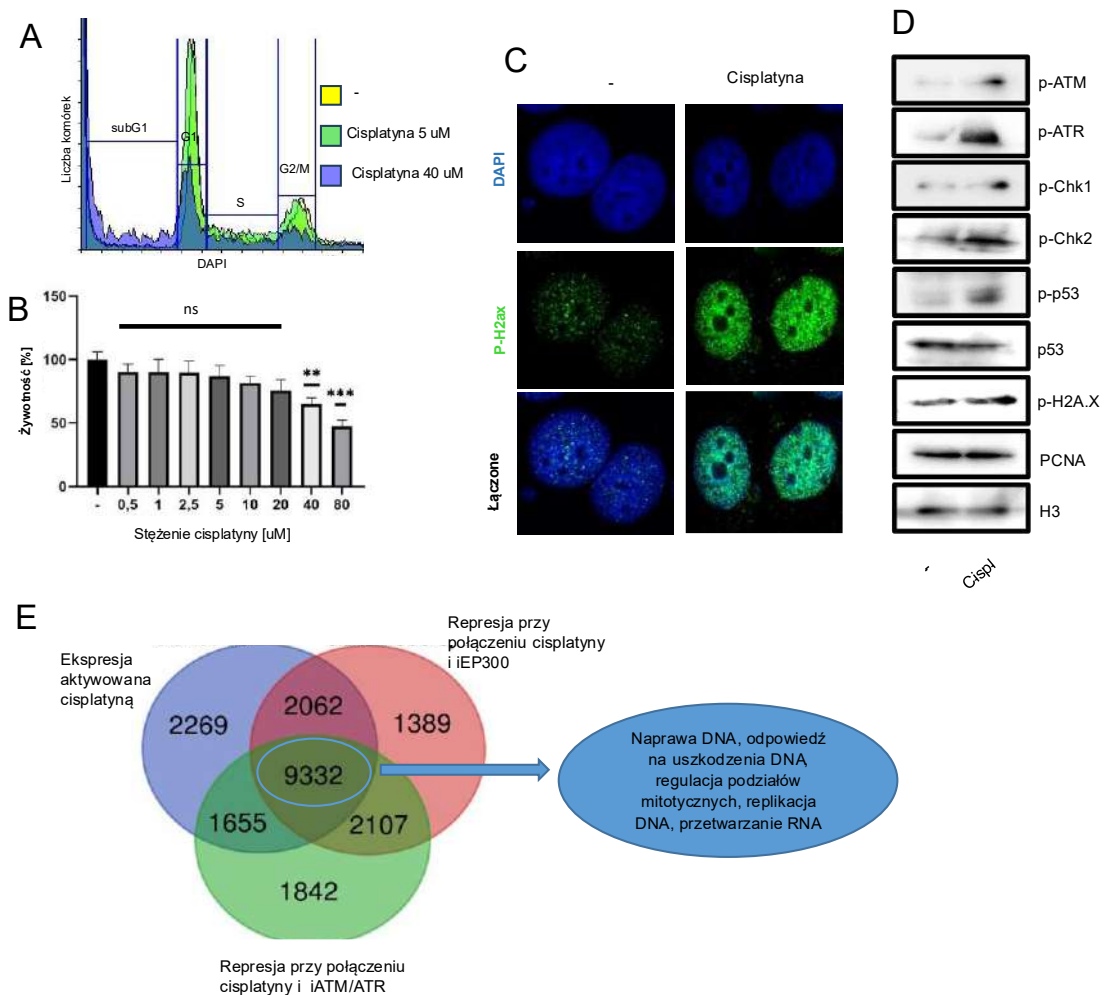
Lista odczynników, dokładna metodyka oraz opis statystyki figurują w załączonym manuskrypcie:

1) **Karolina Gronkowska**, Kinga Kołacz-Milewska, Sylwia Michlewska, Agnieszka Robaszkiewicz „P53 supresses transcription of the p300-E2F1-dependent gene subset by maintaining KDM5B associated with gene promoters”

Ponadto, w niniejszej pracy umieszczono wyniki z różnicowej ekspresji za pomocą metody RNA-Seq komórek MCF po zastosowaniu cisplatyny (5 μ M), iATM/ATR (KU-60019, 5 μ M) + cisplatyny oraz ip300 (C646, 5 μ M) + cisplatyny. Sposób przygotowania próbek oraz ich analizy był analogiczny do tego opisanego w manuskrypcie „BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel”. Dołączono również eksperymenty koimmunoprecypitacji E2F1 w komórkach nietraktowanych oraz poddanych działaniu cisplatyny z detekcją p300, BRM i BRG1, oraz koimmunoprecypitację E2F1 w komórkach traktowanych cisplatyną oraz kombinacją iATM/ATR (KU-60019, 5 μ M) i cisplatyny z detekcją acetylacji. Ponadto, scharakteryzowano wpływ wyciszenia BRG1, BRM oraz HIF1A na ekspresję genów metodą qPCR oraz zbadano występowanie BRM na promotorach genów za pomocą ChIP-qPCR. Eksperymenty te przeprowadzono w sposób analogiczny jak opisano w manuskrypcie „P53 supresses transcription of the p300-E2F1-dependent gene subset by maintaining KDM5B associated with gene promoters”. Zbadano także możliwość wykorzystania inhibitora p300 (C646; 5 μ M) i SWI/SNF (PFI3; 5 μ M) jako związków uwrażliwiających komórki na cisplatynę. Związki podano 2 godziny przed zastosowaniem cisplatyny, a stężenia cisplatyny oraz opis metody są zostały szczegółowo opisane w mauskrypcie „P53 supresses transcription of the p300-E2F1-dependent gene subset by maintaining KDM5B associated with gene promoters”. Dodatkowo, przeprowadziłam analizę ROC u pacjentów leczonych związkami platyny, w sposób opisany w manuskrypcie „Interaction of HIF1A with BRG1 and p300 confers paclitaxel-induced drug resistance by enabling the overexpression of ABCC genes”

6.2 Omówienie najważniejszych wyników

W pierwszej kolejności szukałam odpowiedniego stężenia cisplatyny, które aktywuje szlak ATM/ATR-Chek1/2-p53 nie wywołując istotnych zmian w przebiegu cyklu komórkowego.



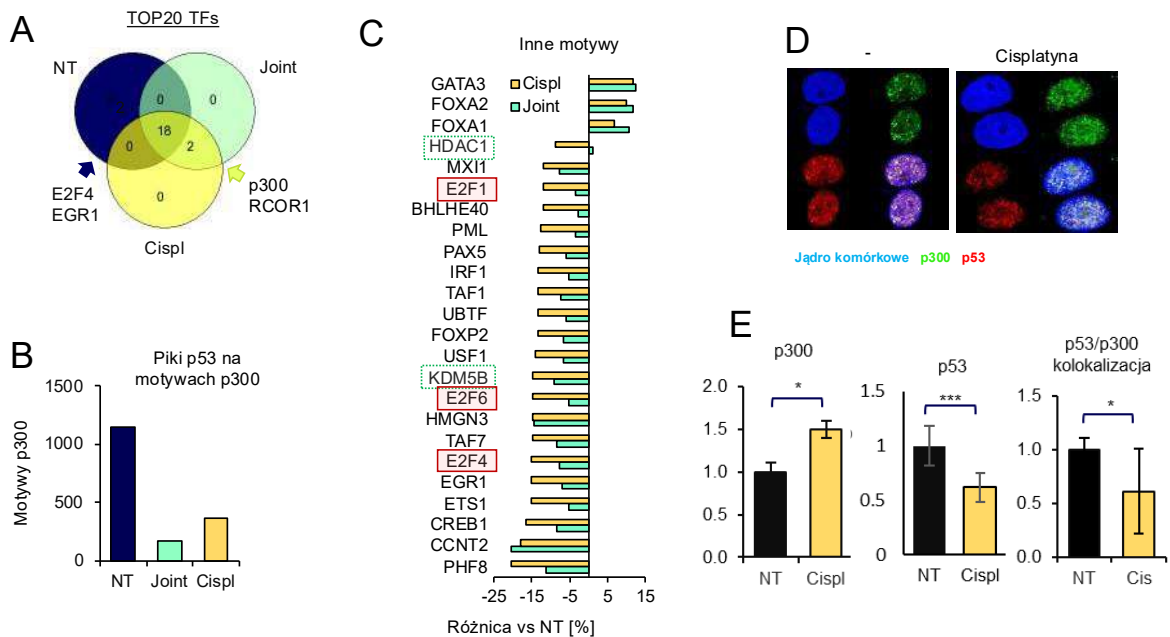
Ryc 29. 5 μM cisplatylna aktywuje szlak ATM/ATR i powoduje uszkodzenia DNA nie mając wpływu na przebieg cyklu komórkowego. Na podstawie: Karolina Gronkowska, Kinga Kołacz-Milewska, Sylwia Michlewska, Agnieszka Robaszekiewicz „P53 supresses transcription of the p300-E2F1-dependent gene subset by maintaining KDM5B associated with gene promoters” [140] + dane dodatkowe

(A) Wpływ 24-godzinnej inkubacji z cisplatylną na cykl komórkowy określono za pomocą cytometrii przepływowej. Uzyskane wyniki przeanalizowano za pomocą oprogramowania Flowing Software, bazując na zależności fluorescencji markera DAPI od zawartości wewnątrzkomórkowego DNA, który ulega zmianie w kolejnych fazach cyklu mitotycznego. (B) Aktywność metaboliczną komórek, służącą do określenia żywotności komórek, oznaczono testem z rezazuryną. Stosunkowo szeroki zakres stężeń cisplatylny dodano do hodowli na 24 godziny. Fluorescencję dla komórek nielezione przyjęto jako 100% żywotności. (C) Aktywacja p-H2ax po leczeniu cisplatylną (5 μM cisplatylny; 6h) uwidoczniła się za pomocą mikroskopii konfokalnej. p-H2AX barwiono za pomocą swoistego przeciwciała pierwotnego i przeciwciała drugorzędowego znakowanego Alexafluor 488, jądro wybarwiono DAPI. (D) Cisplatylna (5 μM; 6h) powoduje uszkodzenia DNA i aktywuje kaskadę odpowiedzi na uszkodzenia DNA, co potwierdzono metodą Western Blot z detekcją fosforylowanego p-H2AX i składników szlaku ATM/ATR-Chk1/2-p53. Histon H3 służył jako kontrola. (E) Zastosowanie inhibitorów iEP300 (C646,5 μM) oraz iATM/ATR (KU-60019, 5 μM) na 2 godziny przed traktowaniem komórek cisplatylną zapobiega zwiększonej ekspresji genów zaangażowanych w odpowiedź na uszkodzenia DNA, naprawę DNA czy przebieg mitozy. Listę genów charakteryzujących się zróżnicowaną ekspresją wykonano w Cuffdiff. Za wzrost ekspresji po zastosowaniu cisplatylny uznano wartości $\text{Log}_2\text{FC} > 0,5$, a za spadek transkrypcji w odpowiedzi na zastosowanie inhibitorów wartości $\text{Log}_2\text{FC} < -0,5$. Diagram Venna wygenerowano przy użyciu <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. Ontologię genów przypisano wspólnym zestawom genów w Panther przy użyciu statystycznego testu nadreprezentacji.

Nie stwierdzono zatrzymania cyklu komórkowego przy stężeniach cisplatyny do 5 μM , co wykazała analiza cyklu komórkowego (Ryc.29A) i test żywotności (Ryc. 29B). Przy stężeniu 5 μM rozważany lek wywoływał łagodny stres genotoksyczny, co potwierdził wyższy poziom pęknięć dwuniciowych DNA (pH2Ax) (Ryc.29C) i fosforylacja składników kaskady ATM/ATR-Chek1/2-p53, podczas gdy poziom p53 pozostał niezmienny (Ryc. 29D). Aktywacja szlaku ATM/ATR przez cisplatynę powoduje aktywację genów m.in. uczestniczących w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, naprawie DNA, regulacji podziałów mitotycznych czy replikacji DNA przy udziale p300 (Ryc.29E).

Biorąc pod uwagę, że p53 jest kluczowym białkiem regulującym ekspresję genów po aktywacji szlaku ATM/ATR w pierwszym etapie wykorzystałam technikę ChIP-Seq w celu zidentyfikowania miejsc wiązania p53 w genomie komórek proliferujących jak i poddanych działaniu cisplatyny przez 6 godzin. Miejsca występowania p53 zostały podzielone na 3 główne grupy: występujące wyłącznie w komórkach nietraktowanych, pojawiające się wyłącznie po cisplatynie i wspólne dla obydwu warunków hodowli (pozostające w genomie po cisplatynie) (ryc. 30A). Dla każdej z tych grup wyznaczono listę 20 najczęściej pojawiających się czynników transkrypcyjnych, których motywy pokrywały się z pikami p53. Porównano je za pomocą diagramu Venn. Piki p53 usuwane w wyniku działania cisplatyny często pokrywały się z miejscami wiązania E2F4 i EGR1, podczas gdy niezmiennione i *de novo* zdeponowane piki znajdowały się w motywach p300 i RCOR1. Poparta wcześniejszymi badaniami obserwacja ta może sugerować, że rekrutacja p53 do chromatyny w odpowiedzi na cisplatynę może aktywować transkrypcję poprzez interakcję z p300. Chociaż motywy dla p300 nie występowały w TOP20 najczęściej pokrywających się z pikami p53 w komórkach nietraktowanych, to ilościowa ocena liczby takich miejsc pokazała, że piki p53 występujące wyłącznie w komórkach nietraktowanych pojawiają się częściej na motywach dla p300, niż w pozostałych dwóch grupach (ryc. 30B). W komórkach nieleczonych, piki p53 na motywach p300 charakteryzowały się również częstszym występowaniem miejsc wiązania dla członków rodziny E2F, a konkretnie E2F1, E2F4 i E2F7, a także dla enzymów remodelujących chromatynę, takich jak KDM5B i HDAC1 (Ryc.30C). Obrazowanie p53 i p300 w jądrach komórkowych za pomocą mikroskopii konfokalnej potwierdziło kolokalizację p53 i p300 na chromatynie komórek nieleczonych, a ich kodystrybucja zmniejszyła się po podaniu cisplatyny (ryc. 30D-E). Chociaż poziom p53 malał w jądrach komórek poddanych

działaniu leku przeciwnowotworowego, występowanie p300 na chromatynie znacznie wzrosło (ryc. 30E).

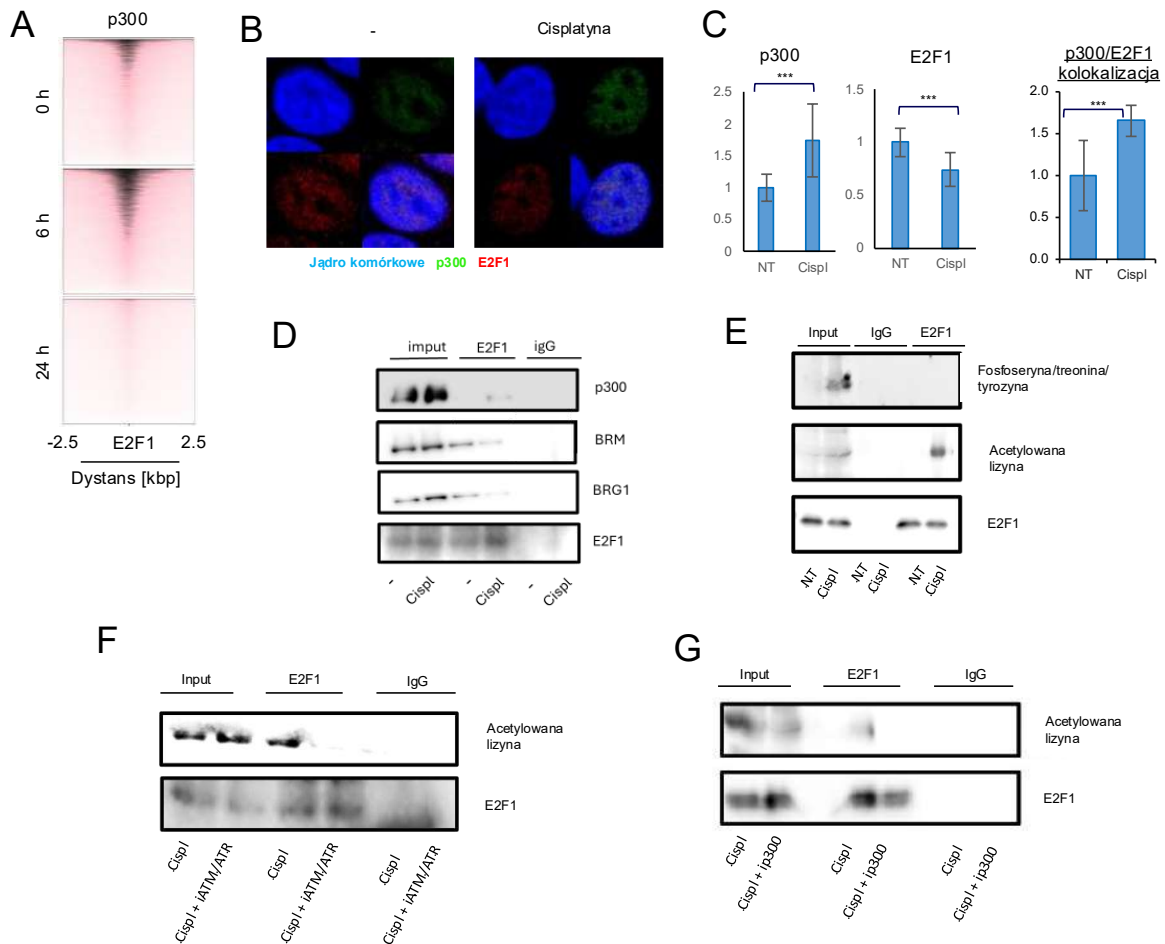


Ryc 30. Interakcja p300 z p53 jest znacznie niższa w komórkach leczonych cisplatyną. Na podstawie: Karolina Gronkowska, Kinga Kołacz-Milewska, Sylwia Michlewska, Agnieszka Robaszekiewicz „P53 supresses transcription of the p300-E2F1-dependent gene subset by maintaining KDM5B associated with gene promoters”[140]

(A) 3 typy pików p53: usunięte z chromatyny (występujące wyłącznie w komórkach nietraktowanych), pozostające bez względu na działanie leku i p53 związane *de novo* po cisplatynie. Dla tych 3 grup wyznaczono listę motywów dla potencjalnych czynników transkrypcyjnych (według tabeli UCSC wgEncodeRegTfbsClusteredV3), które następnie zliczono i TOP20 najczęściej pojawiających się czynników transkrypcyjnych porównano dla 3 typów pików p53 za pomocą diagramu Venna. (B) Frakcja p53 usuwana z chromatyny pod wpływem cisplatyny występuje częściej na motywach dla p300. (C) Analiza miejsc wiązania TF wskazuje, że motywy p300 częściej współwystępują z E2F i enzymami modyfikującymi, takimi jak HDAC1 i KDM5B, na pikach p53, które są usuwane po cisplatynie. Różnicę w częstości występowania motywów na motywach p300 porównano między pikami p53, które są: usunięte z chromatyny, pozostają na chromatynie i są *de novo* związane z chromatyną po cisplatynie. (D-E) Kolokalizacja jądrowa białek oraz intensywność fluorescencji została p300 i p53 spada po leczeniu komórek cisplatyną. (D) Obrazy konfokalne pokazują rozkład jądrowy p300 (zielony – AlexaFluor488) i p53 (czerwony – PE). DNA (niebieski) jest barwione DAPI. (E) Intensywność fluorescencji oraz kolokalizacja między rozpatrywanymi białkami, została zmierzona w jednostkach arbitralnych (a.u.) za pomocą oprogramowania Leica Application Suite X. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono za pomocą testu t-Studenta lub testu Manna-Whitneya, a różnice istotne statystycznie oznaczono * dla $p < 0,05$, ** dla $p < 0,01$, *** dla $p < 0,001$.

Biorąc pod uwagę opisaną wcześniej interakcję p300 z p53 oraz częstość występowania p53 na motywach dla E2F w komórkach proliferujących, analiza wiązania p300 przed i po cisplatynie została wykonana właśnie dla regionów rozciągających się wokół motywów dla czynnika E2F1 (ryc. 31A). Stwierdzono wyższy poziom p300 związanego z chromatyną już po 6 godzinach działania cisplatyny. Aczkolwiek dłuższa inkubacja z komórek z cisplatyną powodowała usunięcie znacznej części p300 z

chromatyny. Bezpośrednią interakcję białek E2F1 i p300 potwierdziłam następnie za pomocą mikroskopii konfokalnej (Ryc 31B-C), oraz koimmunoprecypitacji białek (ryc. 31 D).

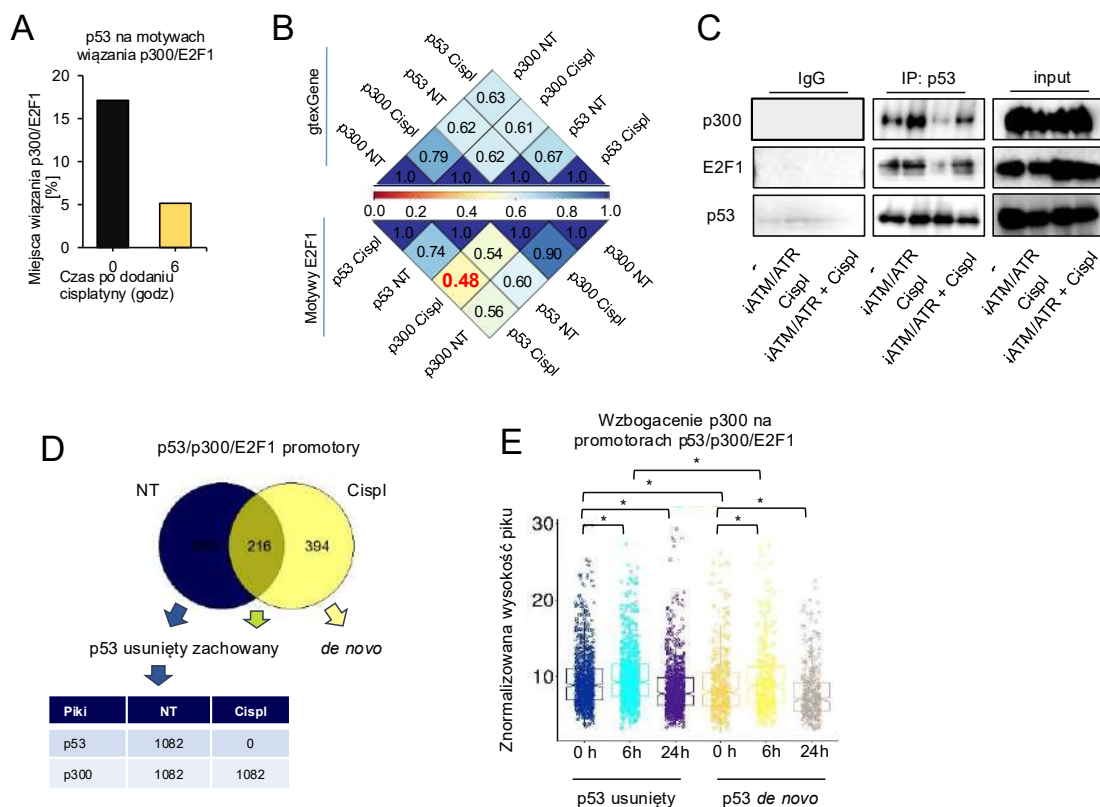


Ryc 31. Cisplatyna powoduje tymczasową rekrutację p300 do chromatyny, gdzie p300 wchodzi w interakcje z E2F1. Na podstawie: Karolina Gronkowska, Kinga Kolacz-Milewska, Sylwia Michlewska, Agnieszka Robaszekiewicz „P53 supresses transcription of the p300-E2F1-dependent gene subset by maintaining KDM5B associated with gene promoters”[140] + dane dodatkowe

(A) Ilość p300 związanego z chromatyną wokół motywów dla E2F1 rośnie 6 h po zastosowaniu cisplatyny, ale ulega znacznemu zmniejszeniu po kolejnych 18 h. Mapę cieplną rozkładu p300 sporządzono z macierzy motywów E2F1 (odfiltrowanej z tabeli UCSC wgEncodeRegTfbsClusteredV3 \pm 2,5 kbp) i wartości bigwig pików p300 po analizie w MACS2. ChIP-Seq dla p300 wykonano po 0, 6 i 24 godzinach leczenia komórek cisplatyną. (B-C) Asocjacja p300 i E2F1 z chromatyną po leczeniu cisplatyną (5 μ M). Immunobarwienie białek związanych z chromatyną uwidoczniło za pomocą mikroskopii konfokalnej (B). (C) Kolokalizację i intensywność fluorescencji określono ilościowo w jednostkach arbitralnych (a.u.) za pomocą oprogramowania Leica Application Suite X. (D) Analiza interakcji E2F1 z p300, BRM i BRG1 bez i po traktowaniu komórek cisplatyną za pomocą immunoprecypitacji E2F1 i detekcji metodą Western Blot. (E) Wykrywanie modyfikacji E2F1 metodą immunoprecypitacji z detekcją za pomocą Western Blot. (F) Wpływ inhibicji szlaku ATM/ATR na poziom acetylacji E2F1 pod wpływem cisplatyny. Wpływ wstępnego leczenia iATM/ATR (KU-60019, 5 μ M, 2 godz. przed cisplatyną) na stopień acetylacji E2F1 analizowano za pomocą koimmunoprecypitacji białek z detekcją Western Blot. (G) Wpływ p300 na stopień acetylacji E2F1. Wpływ wstępnego leczenia iEP300 (C646, 5 μ M, 2 godz. przed cisplatyną) na stopień acetylacji E2F1 pod wpływem cisplatyny analizowano za pomocą koimmunoprecypitacji białek z detekcją Western Blot.

Cisplatyna zwiększała interakcję E2F1 z p300, ale zmniejszała z ATPazami kompleksu SWI/SNF – BRG1 i BRM. Następnie, za pomocą koimmunoprecypitacji białek wykazałam, że aktywowanie cisplatyną ścieżki ATM/ATR-Chek1/2-p53 powoduje acetylację E2F1 przez p300 (ryc. 31 E-G).

Jednakże, cisplatyna spowodowała znaczny spadek odsetka motywów dla p300-E2F1, na których występowało białko p53 w komórkach proliferujących (Ryc.32 A). Jest to zgodnie w wynikami kolokalizacji p53 i p300 (Ryc. 30 D-E) oraz rozkładu p53 na motywach p300 (Ryc. 30 B) i sugeruje, że badany lek powoduje usuwanie znaczniej frakcji p53 z promotorów charakteryzujących się jednocześnie motywami dla p300 i E2F1. Co więcej, rekrutacja p53 *de novo* do chromatyny w odpowiedzi na cisplatynę może nie być związana z korekrutacją p300 lub zachodzić na innych miejscach w genomie, które nie charakteryzują się motywami dla p300 i E2F1. Współczynnik korelacji Pearsona między p53 i p300 w promotorach genów w genomie był podobny, niezależnie od leczenia cisplatyną (ryc. 32 B). Co istotne, współczynnik ten spadał istotnie dla promotorów z motywami dla E2F. Koimmunoprecypitacja p53 wskazywała na obecność kompleksu p53, p300 i E2F1 w komórkach nietraktowanych cisplatyną, który ulegał rozpadowi pod wpływem leku. Potwierdza to zaobserwowany wcześniej spadek współwystępowania p53-p300 w promotorach genów z motywami E2F1 po cisplatynie. Hamowanie ATM/ATR nasiliło interakcję p53-p300-E2F1 i zapobiegło rozpadowi kompleksu sugerując, że to odpowiedź na uszkodzenia DNA powoduje usuwanie p53 z chromatyny i spadek jego interakcji z p300 i E2F1 (Ryc. 32 C). Liczba promotorów charakteryzujących się jednocześnie motywami dla E2F1 i obecnością p53-p300 była zdecydowanie wyższa w komórkach nietraktowanych (Ryc. 32 D), a *de novo* powstałe miejsca formowania p53-p300 na motywach E2F1 stanowiły <50% liczby kompleksów w komórkach nietraktowanych. Co istotne, po odłączeniu p53 od promotorów p53-p300-E2F1, p300 pozostało związane z DNA. Kwantyfikacja p300 w promotorach z usuniętym i *de novo* przyłączonym p53 wykazała wzrost ilości p300 na chromatynie po 6 godzinach inkubacji komórek z cisplatyną. Ponadto, wzrost ten był istotnie wyższy na promotorach, z których usunięte zostało białko p53 (Ryc. 32 E). Zatem usunięciu p53 z wcześniej istniejących kompleksów p53-p300-E2F1 towarzyszy rekrutacja p300 do przynajmniej części promotorów.

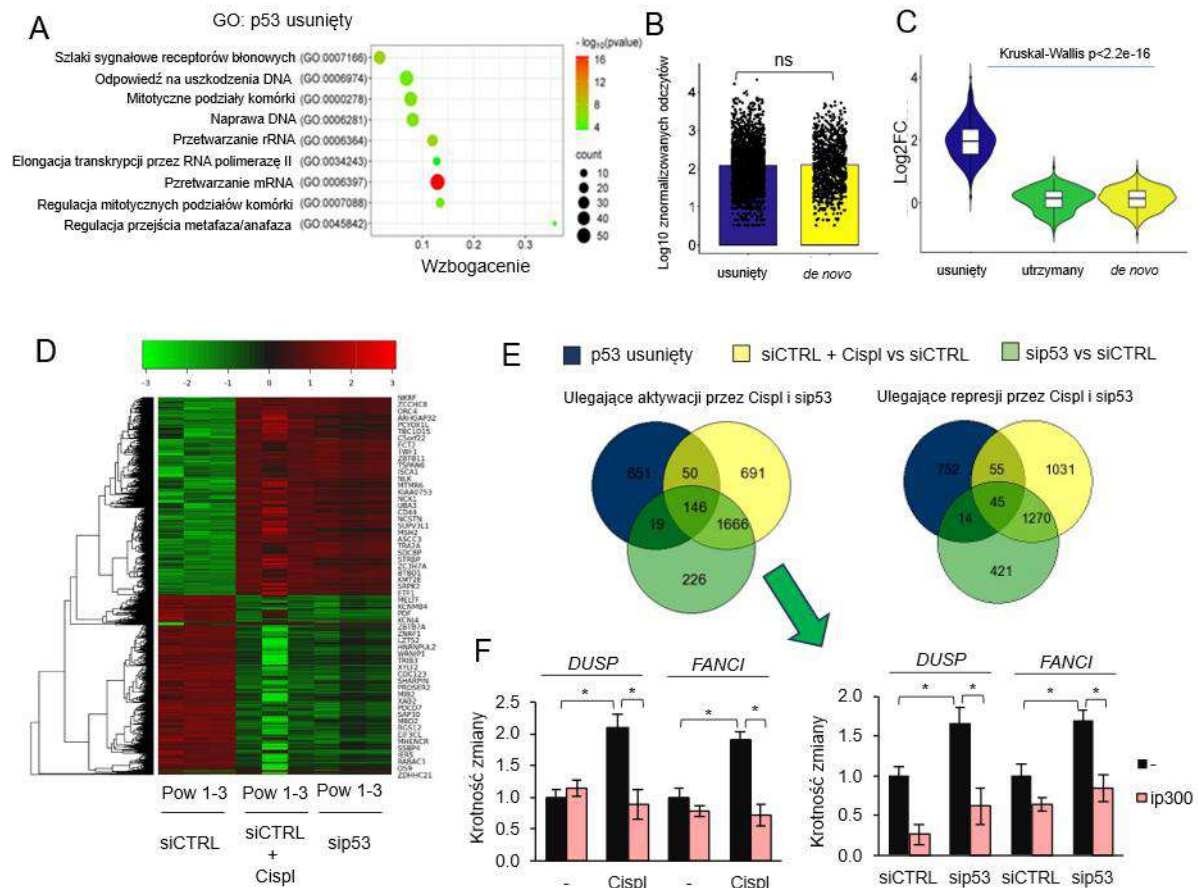


Ryc 32. Cisplatyna powoduje oddzielenie p53 z wcześniej istniejących kompleksów p53-p300-E2F1 oraz promuje większą asocjacje p300 z chromatyną w obrębie badanych promotorów. Na podstawie: Karolina Gronkowska, Kinga Kołacz-Milewska, Sylwia Michlewska, Agnieszka Robaszekiewicz „P53 suppresses transcription of the p300-E2F1-dependent gene subset by maintaining KDM5B associated with gene promoters”[140]

(A) Białko p53 jest usuwane z motywów p300/E2F1 po 6 godzinach traktowania komórek cisplatyną. (B) Wykres korelacji przedstawia spadek jednoczesnego występowania p53 i p300 na promotorach z motywami E2F1 po cisplatynie. Metodycznie, motywy E2F1 i promotory genów (± 2 kbp wokół TSS z tabeli *gtexGene*) posłużyły jako regiony genomowe, natomiast pliki *bigwig* p53 i p300 zostały użyte do oceny poziomu tych białek w badanych miejscach genomu. (C) P53 tworzy kompleksy z p300 i E2F1, które rozpadają się po cisplatynie. Inhibitor ATM/ATR (KU-60019, 5 μ M) zapobiega indukowanemu cisplatyną rozkładowi p53-p300-E2F1. P53 poddano koimmunoprecypitacji z przeciwciałem pierwotnym i kulkami magnetycznymi, natomiast białka wykryto metodą Western Blot. (D) p300 pozostaje związane z promotorami p53-p300-E2F1 po indukowanym cisplatyną odłączeniu p53. Dystrybucję genomową p53-p300 w motywach E2F1 porównano na diagramie Venna między komórkami nieleczonymi a komórkami leczonymi cisplatyną. Tabela przedstawia liczbę pików p300 nakładających się na miejsca p53-E2F1 w 3 typach promotorów (z usuwaniem, niezmiennym i de novo rekrutowanym p53). (E) Poziom p300 rośnie na promotorach p53-p300-E2F1 już po 6 godzinach leczenia komórek cisplatyną. Profil zmian poziomu p300 w czasie obserwowano dla dwóch typów promotorów: z usuwaniem i rekrutowanym *de novo* p53.

Analiza funkcjonalna genów charakteryzujących się promotorami z p53-p300-E2F1 i odłączeniem p53 w odpowiedzi na cisplatynę wykazała ich udział w kluczowych procesach wewnątrzkomórkowych, związanych z odpowiedzią komórkową na czynniki genotoksyczne (Ryc. 33A). Co więcej, były one zbliżone do procesów regulowanych przez p300 i związane z aktywacją szlaku ATM/ATR przez cisplatynę (Ryc.29 E). Obejmowały one między innymi odpowiedź na uszkodzenia DNA, naprawę DNA oraz

regulację mitotycznego podziału komórek. Sugeruje to, że ekstruzja p53 może przyczyniać się do ochrony komórek przed stresem genotoksycznym. Próbując określić podstawowy poziom transkrypcji i transkrypcyjną odpowiedź genu na ekstruzję p53, porównano transkryptomy (RNA-Seq) komórek nieleczonych i leczonych cisplatyną (Ryc. 33 B-D). Znormalizowany poziom mRNA genów charakteryzujących się usuwaniem i rekrutacją p53 nie różnił się istotnie (Ryc. 33 B), ale transkrypcja genów tracących p53 znacznie wzrosła po leczeniu komórek cisplatyną (Ryc. 33C). Co istotne, różnicowa ekspresja genów wskazywała na niemal całkowite nakładanie się, zarówno pod względem kierunku, jak i intensywności, obserwowanych zmian w profilu transkrypcji genów po cisplatinie i po wyciszeniu p53 (Ryc. 33D). Porównywalna liczba genów ulegała wzmocnieniu lub wyciszeniu w próbach uzyskanych z komórek traktowanych cisplatyną lub z wyciszonym p53 (*sip53*) ($\text{Log}_2\text{FC} > 2$, skorygowane $p < 0,05$). Po porównaniu danych z różnicowej ekspresji genów i danych z ChIP-Seq dotyczących redystrybucji p53 na promotorach p53-p300-E2F1, zidentyfikowano podzbiór genów odpowiadających na cisplatinę utratą p53 z promotora i charakteryzujących się zwiększoną (146) i zmniejszoną (45) transkrypcją (Ryc. 33 E). Do dalszych badań mechanistycznych z puli genów ulegających istotnemu wzmocnieniu po indukowanym cisplatiną odłączeniu p53 wybrałam 2 geny jako przykładowe: *DUSP12* i *FANCI*. Geny te są funkcjonalnie powiązane odpowiednio z sygnalizacją i naprawą DNA, a ich udział w oporności na chemioterapię został wcześniej opisany w literaturze [129,141]. Mając na uwadze, że po usunięciu p53 nastąpiło wzbogacenie p300, przetestowałam wpływ farmakologicznego hamowania p300/CBP na transkrypcję genów aktywowanych przez cisplatinę i przejściowe wyciszenie p53. W obu przypadkach ip300/CBP (5 μM C464) całkowicie zahamowało wzrost transkrypcji genu, wskazując tym samym na rolę p300/CBP w obserwowanej aktywacji genu (Ryc. 33F). Sugeruje to, że wzbogacenie p300 w promotorach p53-p300-E2F1 po ekstruzji p53 odwróciło supresję genu powodowaną obecnością p53. Chociaż p300 występowało na promotorach przed odłączeniem p53 to jego obecność była niewystarczająca do uzyskania wysokiej wydajności transkrypcji.

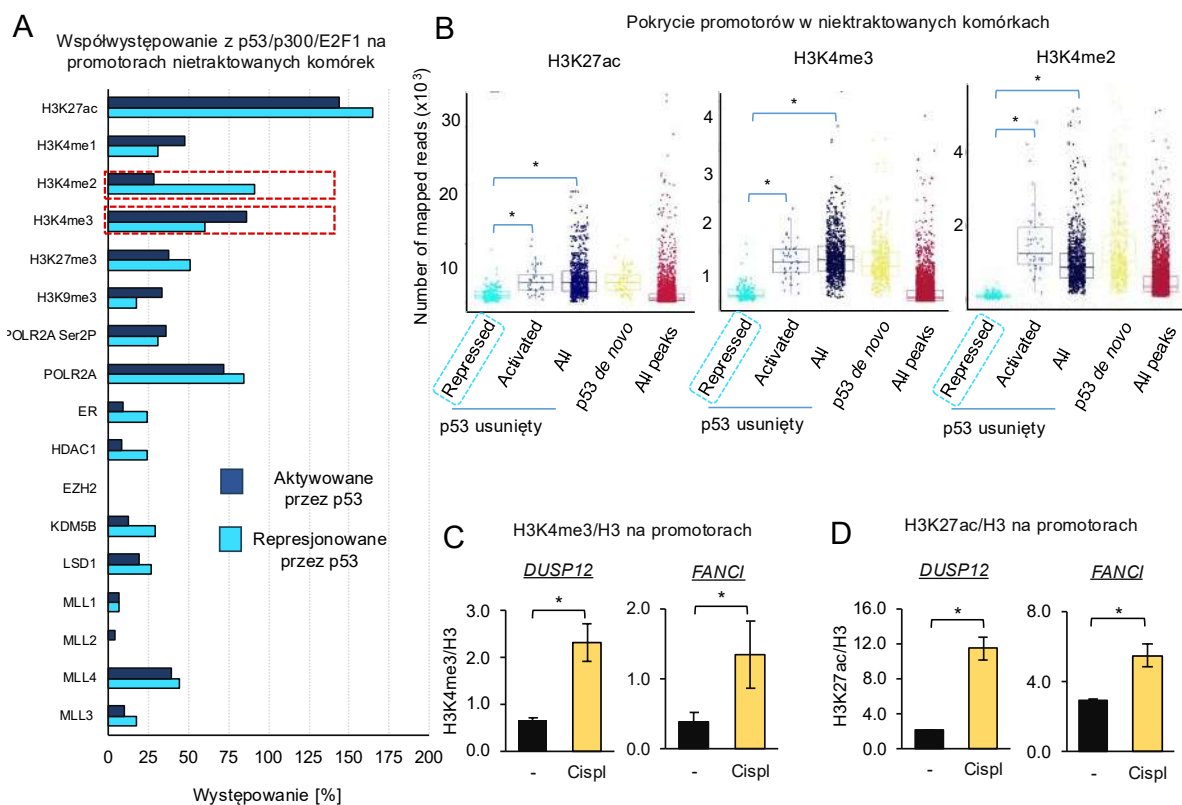


Ryc 33. Odlączenie p53 z podzbioru promotorów związanych z p300 zwiększa zależną od p300 transkrypcję genów. Na podstawie: Karolina Gronkowska, Kinga Kolacz-Milewska, Sylwia Michlewska, Agnieszka Robaszkiewicz „P53 supresses transcription of the p300-E2F1-dependent gene subset by maintaining KDM5B associated with gene promoters”[140]

(A) P53 jest pod wpływem cisplatyny usuwany z promotorów p53-p300-E2F1, które kontrolują transkrypcję genów funkcjonalnie powiązanych z odpowiedzią na uszkodzenia DNA i naprawą, podziałami mitotycznymi i transkrypcją genów. (B) Transkrypcja genów podległych promotorom z usuwanym lub rekrutowanym p53 jest porównywalna w komórkach proliferujących. Do wykreślenia i analizy statystycznej wykorzystano znormalizowane wartości log10 (liczba zliczeń na milion) (test t, ns dla $p > 0,05$). (C) Średnia wartość transkrypcji genów kontrolowanych przez promotory p300-E2F1, z których p53 jest usuwany, wzrasta w odpowiedzi na cisplatynę. Różnicową ekspresję genów między komórkami nieleczonymi i leczonymi cisplatyną (24 h) analizowano za pomocą Limma-Voom. Geny podzielono na 3 grupy według schematu odpowiedzi p53 w ich promotorach na działanie cisplatyny. Analizę statystyczną wykonano testem Kruskala-Wallisa (D) Cisplatyna i przejściowe wyciszenie p53 w podobny sposób wpływają na ekspresję genów. Różnicową ekspresję genów przeprowadzono za pomocą Limma-Voom. Porównano komórki transfekowane siCTRL, siCTRL leczone cisplatyną przez 24 h oraz komórki transfekowane sip53 przez 48 h. Mapa cieplna przedstawia geny, dla których $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1$ i wartość $p < 0,05$. (E) 146 genów o podwyższonej ekspresji i 45 genów wyciszonych charakteryzuje się usuwaniem p53 z promotorów p53-p300-E2F1 po cisplatynie. Promotory p53-p300-E2F1, które reagują na cisplatynę utratą p53, porównano z genami regulowanymi w górę i w dół na diagramie Venna. (F) p300 odpowiada za wzrost transkrypcji *DUSP* i *FANCI* wywołany przez cisplatynę i sip53. Inhibitor p300 (C646, 5 μM) dodano na 2 godziny przed cisplatyną lub 24 godziny po transfekcji komórek sip53, natomiast transkrypcję genu określono ilościowo za pomocą PCR w czasie rzeczywistym. Poziom transkrypcji znormalizowano do genów referencyjnych, a dla próbki kontrolnej przyjęto wartość 1. Różnice między grupami sprawdzono za pomocą testu ANOVA, a różnice statystycznie istotne oznaczono *, gdy $p < 0,05$.

Aby zidentyfikować specyficzne cechy promotorów, w których p53 jest represorem transkrypcji, wykorzystaliśmy publicznie dostępne zbiory danych z wynikami ChIP-Seq dla różnych modyfikacji potranslacyjnych histonów lub białek. W pierwszym etapie porównaliśmy liczbę nakładających się pików wybranych modyfikacji histonowych i białek z promotorami genów, w których p53 pełni funkcję represora lub aktywatora (ryc. 34A). Największą różnicę zaobserwowaliśmy we wzorze metylacji H3K4, szczególnie w stosunku H3K4me2 do H3K4me3. Około 90% promotorów, w których p53 pełniło funkcję represora, charakteryzowało się jednocześnie obecnością H3K4me2 i nieznacznie wyższym poziomem POL2R, co sugerowało zatrzymanie tego enzymu na promotorach, szczególnie gdy marker elongacji transkrypcji reprezentowany przez fosforylowaną serynę 2 POLR2A pozostawał stosunkowo niski i porównywalny między dwoma podziorami promotorów. Natomiast promotory, na których p53 pełnił rolę aktywatora transkrypcji, charakteryzowały się wyższą częstością występowania H3K4me3. Ponadto, enzymy remodelujące chromatynę takie jak KDM5B i HDAC1 występowały nieznacznie częściej w promotorach ulegających aktywacji po odłączeniu się od nich p53. Chociaż acetylację H3K27 zaobserwowano we wszystkich rozpatrywanych typach promotorów, jej stopień był znacząco niższy w promotorach wyciszanych przez p53 (Ryc.34 B). Podobną sytuację zaobserwowano w przypadku di- i trójmetylowanego H3K4. Co ciekawe, stopień H3K4me2 był stosunkowo wysoki na promotorach, dla których p53 pełnił rolę aktywatora lub wzmacniacza transkrypcji, sugerując, że ten typ modyfikacji może pełnić funkcję markera dla promotorów aktywowanych przez p53. Ta hipoteza wymaga jednak dalszej weryfikacji i nie była przedmiotem moich dotychczasowych badań.

Potranslacyjne modyfikacje histonów, takie jak H3K27ac i H3K4me3, które charakteryzują promotory aktywne transkrypcyjnie znacząco wzrosły w promotorach *DUSP12* i *FANCI* po traktowaniu komórek cisplatyną (Ryc. 34 C-D). Wyniki te sugerują, że odłączeniu p53 w wyniku działania cisplatyny towarzyszy wzbogacenie nukleosomów w znaczniki histonowe promujące transkrypcję.

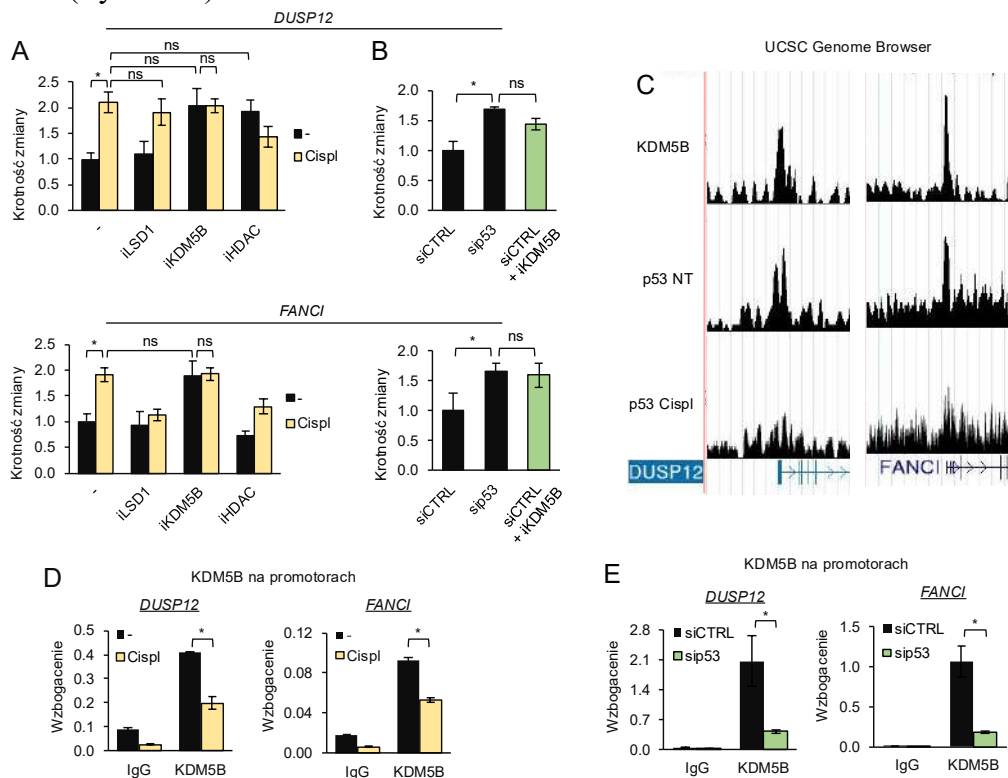


Ryc. 34 Podzbiór promotorów, w których p53 pełni funkcję represora charakteryzuje się stosunkowo niskim poziomem acetytacji H3K27 i trimetylacji H3K4. Na podstawie: Karolina Gronkowska, Kinga Kołacz-Milewska, Sylwia Michlewska, Agnieszka Robaszkiewicz „P53 suppresses transcription of the p300-E2F1-dependent gene subset by maintaining KDM5B associated with gene promoters”[140]

(A) Geny kontrolowane przez promotory p53-p300-E2F1, które ulegają aktywacji lub represjonowane po odłączeniu p53, charakteryzują się wyraźnie odmiennym profilem znaczników histonowych i białek związanych z promotorami. Na wykresie wyniki z interwałów uzyskanych z MACS2 dla rozważanych znaczników histonowych i białek (dane ChIP-Seq pobrane z SRA), nałożone na promotory p53-p300-E2F1 z p53 usuwanym w odpowiedzi na cisplatynę. Czerwone ramki wskazują znaczniki metylacji różnicujące promotory aktywowane i wyciszane przez p53 w komórkach proliferujących. (B) Promotory genów represjonowanych przez p53 w nietraktowanych komórkach wykazują stosunkowo niski poziom znaczników histonowych promujących transkrypcję. Pokrycie podzbiorów pików p53 przez zmapowane odczyty H3K27ac, H3K4me2 i H3K4me3 zostało obliczone za pomocą narzędzia Bedtools MultiCovBed i porównane ze średnim pokryciem wszystkich pików znaczników histonowych. * oznacza różnicę statystyczną dla $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis). (C-D) Cisplatyna powoduje zwiększoną acetytację H3K27 (C) i trimetylację H3K4 (D) w miejscach wiązania p53 w promotorach *DUSP12* i *FANCI*, co zostało zmierzone metodą ChIP-qPCR. Surowe wartości ChIP znormalizowano do odpowiadających im kontroli IgG oraz histonu H3. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono testem t-Studenta, a różnice statystycznie istotne oznaczono * dla $p < 0,05$.

Mając na uwadze, że status metylacji i acetytacji H3 promotorów zmienia się po usunięciu p53, a enzymy remodelujące chromatynę, takie jak HDAC1, LSD1 i KDM5B, występują częściej na promotorach, w których p53 pełni funkcję represora, zbadałam wpływ tych białek na transkrypcję *DUSP12* i *FANCI*. Wykorzystałam do tego celu specyficzne inhibitory wymienionych wyżej enzymów (Ryc. 35A-B). Spośród

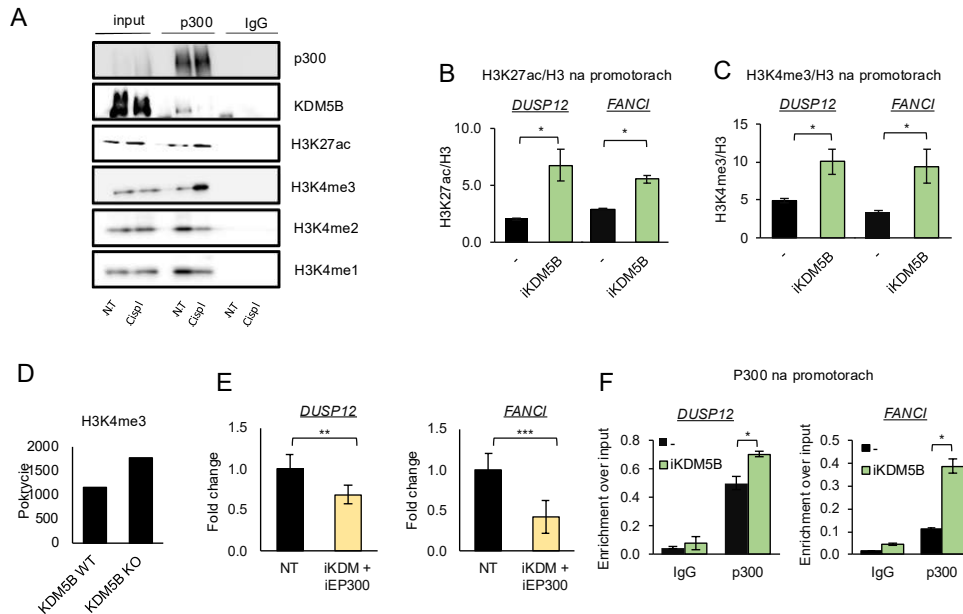
testowanych inhibitorów jedynie iKDM5B wywoływał efekt identyczny do cisplatyny i wyciszenia p53, powodując wzrost transkrypcji dwóch badanych genów. Dodanie cisplatyny nie powodowało dalszego wzrostu transkrypcji co sugerowało, że KDM5B może być mediatorem działania p53. W nietraktowanych komórkach, obecność KDM5B nakładała się na obecność p53 w promotorach *DUSP12* i *FANCI* (Ryc. 35C). Cisplatyna powodowała usunięcie znacznej puli KDM5B z promotorów dwóch badanych genów, co potwierdziłam za pomocą CHIP-qPCR (Ryc. 35 D). Podobny wpływ miało wyciszenie p53, które spowodowało silny spadek poziomu KDM5B na promotorach *DUSP12* i *FANCI* (Ryc. 35 E).



Ryc. 35 Cisplatyna indukuje odłączenie KDM5B od promotorów charakteryzujących się represyjnym działaniem p53, co umożliwia nadekspresję *DUSP* i *FANCI*. Na podstawie: Karolina Gronkowska, Kinga Kolacz-Milewska, Sylwia Michlewska, Agnieszka Robaszekiewicz „P53 suppresses transcription of the p300-E2F1-dependent gene subset by maintaining KDM5B associated with gene promoters”[140]

(A-B) Hamowanie KDM5B odpowiada ilościowo zwiększeniu ekspresji *DUSP* i *FANCI* wywołanej przez cisplatynę (A) i sip53 (B). iLSD1 (GSK-LSD1, 0,1 μ M), iKDM5B (PBIT, 5 μ M), iHDAC (maślan sodu, 100 μ M) dodano na 2 godziny przed cisplatyną i 24 godziny po transfekcji komórek za pomocą siCTRL. Transkrypcję genu mierzono metodą PCR w czasie rzeczywistym. Poziom transkrypcji znormalizowano do genów referencyjnych, a dla próbki kontrolnej przyjęto wartość 1. Różnice między grupami sprawdzono za pomocą testu ANOVA, a różnice statystycznie istotne oznaczono *, gdy $p < 0,05$. (C) Występowanie pików KDM5B i p53 (bigwig) uwidocznił na promotorach *DUSP12* i *FANCI*. (D) Cisplatyna istotnie zmniejsza poziom KDM5B w miejscu wiązania p53 w promotorach *DUSP* i *FANCI*. Obecność KDM5B badano metodą CHIP-qPCR. * oznacza istotne zmiany dla $p < 0,05$ (test t). (E) Wyciszenie p53 powoduje oddysocjowanie KDM5B z promotorów badanych genów. Poziom KDM5B w miejscach wiązania p53 w promotorach *DUSP* i *FANCI* został porównany metodą CHIP-qPCR po 48h transfekcji komórek siCTRL i sip53. * oznacza istotne zmiany dla $p < 0,05$ (test t).

Aby potwierdzić molekularny związek między wywołanym cisplatyną spadkiem poziomu p53 i KDM5B na promotorach badanych genów, rekrutacją p300 i transkrypcją genu, wykonałam koimmunoprecypitację p300. Potwierdziła ona istnienie kompleksu p53-p300-KDM5B w komórkach nietraktowanych, który rozpadał się po podaniu cisplatyny.



Ryc. 36 Indukowane cisplatyną odłączenie KDM5B z promotorów charakteryzujących się represyjnym działaniem p53 umożliwia nadekspresję *DUSP* i *FANCI* poprzez zwiększenie poziomu p300. Na podstawie: Karolina Gronkowska, Kinga Kołacz-Milewska, Sylwia Michlewska, Agnieszka Robaszekiewicz „P53 supresses transcription of the p300-E2F1-dependent gene subset by maintaining KDM5B associated with gene promoters” [140]

(A) Cisplatyna powoduje rozpad kompleksu p300-KDM5B i zwiększa występowanie p300 w towarzystwie modyfikacji H3K27ac oraz H3K4me3, co wykazano metodą immunoprecypitacji p300 z detekcją KDM5B, H3K4me1, H3K4me2 i H3K4me3 techniką Western Blot. (B-C) Hamowanie KDM5B znacząco zwiększa poziom markerów histonowych promujących transkrypcję w promotorach *DUSP* i *FANCI*. Acetylacja H3K27 (B) i trimetylacja H3K4 (C) zostały porównane metodą CHIP-qPCR w komórkach nietraktowanych i traktowanych iKDM5B (PBIT, 5 μ M) przez 6 godzin. * oznacza istotne zmiany dla $p < 0,05$ (test t). (D) Pokrycie H3K4me3 na promotorach p53-p300-E2F1, w których p53 ma charakter represora, zostało skwantyfikowane przy użyciu narzędzia Bedtools MultiCovBed dla MCF7 z dzikim typem (SRR7686907) i wyciszonym KDM5B (KO; SRR7686919). (E) Hamowanie p300 zapobiega wzrostowi transkrypcji *DUSP* i *FANCI* wywołanym przez iKDM5B. Kombinację inhibitorów p300 i KDM5B (odpowiednio C646, 5 μ M; PBIT, 5 μ M) dodano do komórek na 24 godziny, a transkrypcję genu określono ilościowo metodą PCR w czasie rzeczywistym. Poziom transkrypcji znormalizowano do genów referencyjnych, a dla próbek kontrolnej przyjęto wartość 1. Różnice między grupami sprawdzono za pomocą testu t, a różnice statystycznie istotne oznaczono * dla $p < 0,05$, ** dla $p < 0,01$, *** dla $p < 0,001$. (F) Hamowanie KDM5B nasila wiązanie p300 z promotorami *DUSP* i *FANCI*. Poziom p300 związanego z chromatyną porównano między komórkami nietraktowanymi i traktowanymi iKDM5B (PBIT 5 μ M; 6-godzinna inkubacja) metodą CHIP-qPCR. * oznacza istotne zmiany dla $p < 0,05$ (test t).

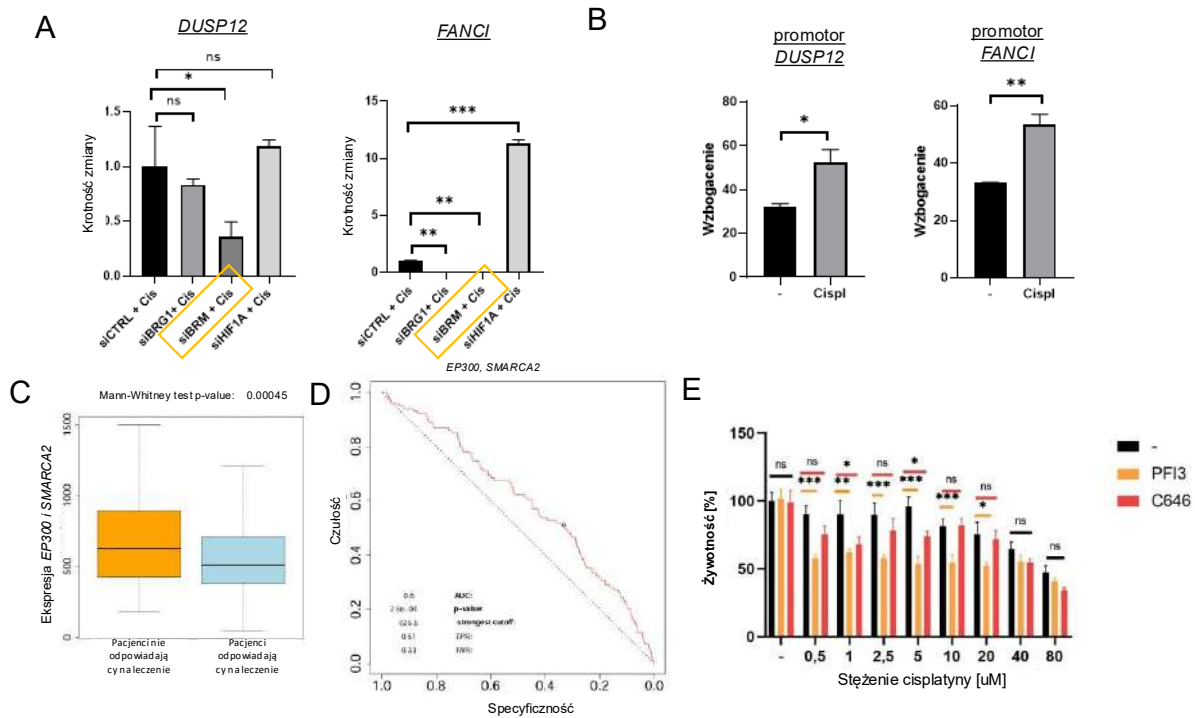
Co istotne, cisplatyna spowodowała widoczny spadek poziomu H3K4me1 i H3K4me2 przy jednoczesnym wzroście ekspresji H3K4me3 w immunoprecypitatach

p300 (Ryc. 36A). Hamowanie KDM5B zwiększało poziom H3K4me3 i H3K27ac na promotorach *DUSP12* i *FANCI* podobnie jak cisplatyna (Ryc. 36 B-C). Sugeruje to, że działanie demetylazy jest nadrzędne w stosunku do p300. Analiza danych zdeponowanych w Sequence Read Archive (SRA) uzyskanych przez Hinoharę K. i in. [142], wykazała, że wyciszenie KDM5B prowadzi do zwiększenia znacznika aktywnej transkrypcji H3K4me3 w promotorach genów wyciszanych przez p53 w badanych przez nas komórkach (Ryc. 36D). Hamowanie p300 odwróciło indukowany przez iKDM5B wzrost transkrypcji genów (Ryc. 36 E), co wskazało na funkcjonalne połączenie między tymi dwoma enzymami. Co więcej, inhibicja KDM5B znacząco zwiększyła poziom p300 na promotorach genów *DUSP12* i *FANCI* (Ryc. 36 F).

Opierając się na uzyskanych wynikach można przedstawić badane zależności jako następujący ciąg funkcjonalny: cisplatyna – uszkodzenie DNA – ATM/ATR – Chk1/2 – p53 – KDM5B – p300 – *DUSP12*/*FANCI*.

Ostatni etap miał na celu sprawdzenie czy ATPazy kompleksu SWI/SNF oraz koregulator p300 i BRG1 – HIF1A są zaangażowane w regulowanie ekspresji genów represjonowanych przez p53 (Ryc. 37 A). Jedynie BRM okazał się zaangażowany w regulację transkrypcji obu rozważanych genów. Wyciszenie BRM odwracało nadekspresję *DUSP12* i *FANCI* indukowaną cisplatyną. Aczkolwiek, w przypadku genu *FANCI* zaobserwowaliśmy również spadek transkrypcji genu po wyciszeniu BRG1. Niedobór HIF1A z kolei nasilał transkrypcję wyłącznie *FANCI*. Następnie za pomocą koimmunoprecypitacji chromatyny potwierdziłam, że BRM reguluje ekspresję wyżej wymienionych genów (Ryc. 37 B). Korzystając z dostępnego online narzędzia ROCplot.org, przeanalizowałam związek między poziomem mRNA *EP300* i *SMARCA2* a 6-miesięcznym przeżyciem bez nawrotu u pacjentek z rakiem jajnika leczonych związkami platyny (Ryc. 37C). Pozytywną odpowiedź na terapię i dłuższe przeżycie bez nawrotu zaobserwowano w kohorcie charakteryzującej się niższą ekspresją *EP300* i *SMARCA2*. Przeprowadzona analiza ROC sugeruje, że współekspresję tych genów można uznać za biomarker odpowiedzi na chemioterapię opartą na związkach platyny (Ryc. 37D). Wiedząc już, że kompleks SWI/SNF i EP300 reguluje ekspresję genów aktywowanych cisplatyną, zbadalam czy zastosowanie inhibitora ATPazy SWI/SNF – PFI3 oraz inhibitora p300 - C646 będzie uwrażliwiać komórki nowotworowe na działanie cisplatyny. Oba inhibitory uwrażliwiały komórki na niskie stężenia cisplatyny do 5 uM, które to stężenie nie wpływało na żywotność i przebieg cyklu komórkowego, ale

wzmocnieniu ulegała transkrypcja genów represjonowane przez p53 jak *DUSP12* i *FANCI* (Ryc. 37 E).



Ryc. 37 SWI/SNF aktywuje ekspresję *DUSP12* i *FANCI* w odpowiedzi na cisplatynę, co może przyczynić się do powstawania oporności na cisplatynę. Celowanie w SWI/SNF oraz p300 uwrażliwia komórki nowotworowe na działanie niskich stężeń cisplatyny. Dane dodatkowe

(A) Wyciszenie BRM zapobiega wzrostowi transkrypcji *DUSP* i *FANCI* wywołanemu przez cisplatynę. Cisplatynę dodano do komórek na 24 godziny po 48 godzinach transfekcji komórek siRNA kontrolnym, siBRG1, siBRM i siHIF1A. Poziom mRNA genów określono ilościowo metodą PCR w czasie rzeczywistym. Poziom transkrypcji znormalizowano do genów referencyjnych, a dla próbki kontrolnej przyjęto wartość 1. Różnice między grupami sprawdzono za pomocą testu t, a różnice statystycznie istotne oznaczono * dla $p < 0,05$, ** dla $p < 0,01$, *** dla $p < 0,001$. (B) Cisplatyna powoduje zwiększoną rekrutację BRM w miejscach wiązania p53 w promotorach *DUSP* i *FANCI*, co zostało zmierzone metodą ChIP-qPCR. Surowe wartości ChIP znormalizowano do odpowiadających im kontroli IgG. Różnicę między dwiema średnimi sprawdzono testem t-Studenta, a różnice statystycznie istotne oznaczono * dla $p < 0,05$. (C) Zależność odpowiedzi pacjentów klinicznych na terapię związkami platyny od transkrypcji *EP300* i *SMARCA2* oszacowano przy użyciu ROC Plotter. (D) Krzywa ROC opisująca odpowiedź na chemioterapię związkami platyny w grupie pacjentów charakteryzujących się jednocześnie wysoką transkrypcją *EP300* i *SMARCA2* (E) Aktywność metaboliczną komórek, służącą do określenia żywotności komórek, mierzono za pomocą testu z rezazuryną. Inhibitor p300 (C646; 5 μ M) i SWI/SNF (PFI3; 5 μ M) podano 2 godziny przed zastosowaniem cisplatyny, a cisplatynę podano do hodowli na 24 godziny. Żywotność komórek nietraktowanych cisplatyną przyjęto jako 100%.

6.3 Podsumowanie i wnioski

Podsumowanie:

1) Cisplatyna powoduje oddzielenie p53 z kompleksów p53-p300-E2F1 obecnych w komórkach proliferujących.

2) Odłączenie p53 z części promotorów charakteryzujących się obecnością p53-p300-E2F1 indukuje rekrutację p300 i zwiększa zależną od p300 transkrypcję genów

3) Odłączeniu p53 towarzyszy spadek KDM5B na promotorach dwóch badanych genów, który umożliwia rekrutację p300, uzyskanie struktury chromatyny umożliwiającej inicjację transkrypcji oraz podwyższenie transkrypcji genów wyciszanych przez p53

4) Inhibicja p300 oraz ATPaz kompleksu SWI/SNF obniża ekspresję badanych genów p53-zależnych aktywowanych cisplatyną oraz uwrażliwia komórki nowotworowe na działanie niskich stężeń cisplatyny

Wnioski:

Przy wykorzystaniu chemioterapii bazującej na lekach uszkadzających DNA takich jak cisplatyna warto zwrócić uwagę na ekspresję genów zaangażowanych w naprawę DNA oraz odpowiedź na uszkodzenia DNA. Aktywacja ekspresji tych genów następowała poprzez traktowanie komórek cisplatyną jak również po wyciszeniu p53 i inhibicji KDM5B. Warto rozważyć również obniżenie ekspresji oraz inaktywujące mutacje *TP53* oraz *KDM5B* jako biomarkery zwiększonej ekspresji tych genów, które mogą predysponować do występowania oporności na leki wywołujące uszkodzenia DNA. Jednakże wymaga to dalszych badań. Co ciekawe, zahamowanie szlaku ATM/ATR zapobiegało indukowanemu cisplatyną odłączeniu p53. Może to sugerować, że inhibitory ATM/ATR mogłyby posłużyć jako związki zapobiegające zwiększonej ekspresji genów w odpowiedzi na cisplatynę, o czym mogą zdecydować kolejne eksperymenty mające na celu potwierdzenie opisywanej interakcji ATM/ATR-p53/KDM5B/p300-DUSP12/FANCI. Wykazałam, że p300 oraz BRM uczestniczą w regulacji *DUSP12* i *FANCI* pod wpływem cisplatyny. Wysoka ekspresja tych białek związana jest z gorszą odpowiedzią na terapię związkami platyny u pacjentek, oraz może stanowić biomarker oporności na związki platyny. Zahamowanie aktywności jednego z nich mogłoby uwrażliwić pacjentów na działanie chemioterapii powodującej uszkodzenia DNA. Jednakże, aby móc zastosować takie podejście terapeutyczne konieczne są badania funkcjonalne, mające na celu dokładne sprawdzenie, w których mechanizmach uszkodzeń DNA oraz w odpowiedzi na które leki komórki rakowe mogą wykorzystywać aktywność DUSP12 i FANCI.

7. Dyskusja

W niniejszej pracy przedstawiłam dwa mechanizmy uruchamiane w odpowiedzi komórek rakowych na działanie leków przeciwnowotworowych. Pierwszy z nich promuje oporność komórek rakowych na chemioterapię opartą na wykorzystaniu paklitakselu: SWI/SNF-p300-HIF1A, a celując w kompleks SWI/SNF można uwrażliwić komórki nowotworowe na działanie chemioterapii. Zastosowałam w tym celu, komercyjnie dostępny inhibitor ATPaz kompleksu SWI/SNF BRG1 i BRM – PFI3, oraz PROTAC degrader wymienionych ATPaz. Celowanie w SWI/SNF obniżało proliferację i promowało śmierć raków hematologicznych [143,144], piersi [108,145], płuca [143,145,146], jajnika [147], prostaty [145,148,149] czerniaka [150] oraz wątroby i szyjki macicy [145]. Jednakże do tej pory żaden z inhibitorów nie został dopuszczony do leczenia. Drugi mechanizm aktywowany przez subletalne dawki cisplatyny wykorzystuje ścieżkę ATM/ATR-p53/p300/KDM5B do nasilenia transkrypcji genów funkcjonalnie powiązanych z odpowiedzią na uszkodzenia DNA. W tej części wykazałam, że zarówno celowanie w aktywność katalityczną p300 (C646) i kompleks SWI/SNF (PFI3) zapobiega indukowanej cisplatyną transkrypcji *DUSP12* i *FANCI*. Według wcześniejszych doniesień literaturowych inhibitory p300, w tym C646, hamują proliferację komórek nowotworowych w tym raka płuc [151], trzustki [152], żołądka [153], prostaty [154], przysadki mózgowej [155] i nowotworów hematologicznych [154,156–160]. Dwa inhibitory p300/CBP znajdują się na etapie badań klinicznych [161–164].

W pierwszej części pracy skupiłam się na problemie zwiększonej ekspresji transporterów ABC, które usuwając lub sekwestrując leki w organellach przyczyniają się do niepowodzenia terapii. Przedstawiłam dowody eksperymentalne na udział BRG1 i p300 w kontroli transkrypcyjnej genów *ABCC*, które ulegają nadekspresji w liniach komórkowych opornych na paklitaksel. W szczególności skupiłam się na wpływie enzymów remodelujących chromatynę na transkrypcję genów *ABCC3*, *ABCC5* i *ABCC10*, gdyż ich produkty są wzbogacane w lizosomach komórek opornych na paklitaksel. Analiza funkcjonalna tych trzech białek występujących w lizosomach ujawniła ich rolę w sekwestracji doksorubicyny i paklitakselu (OregonGreen), a zatem te transportery błonowe są zdolne do ograniczania cytotoksyczności przynajmniej niektórych leków stosowanych w chemioterapii. Aktywne promotory tych genów charakteryzują się trimetylacją H3K4 i występowaniem BRG1, p300 i ich koregulatora HIF1A. Wykazałam również, że hamowanie SWI/SNF za pomocą PFI3 lub degradacja

ATPaz SWI/SNF za pomocą PROTAC oraz inhibicja p300 za pomocą C646 istotnie zwiększa toksyczność leków poprzez jednoczesną redukcję kilku transporterów ABC w fenotypach opornych na paklitaksel. Transportery te w badanych, opornych komórkach raka płuc i piersi, przyczyniały się do sekwestracji leków w lizosomach i niewrażliwości na chemioterapię. Wcześniejsze badania wykazały, że zahamowanie aktywności BRG1 przy użyciu ADAADi (inhibitora domeny ATPazy A zależnej od DNA) zwiększa chemiowrażliwość komórek MDA-MB-231 na 5-fluorouracyl, cisplatynę, cyklofosfamid, doksorubicynę, gemtabicynę i paklitaksel poprzez zmniejszenie ekspresji transporterów ABC i zapobieganie ich nadmiernej ekspresji indukowanej pojedynczą dawką leków przeciwnowotworowych [108]. Podobnie w naszych wcześniejszych badaniach wykazaliśmy, że zahamowanie aktywności p300 przy wykorzystaniu inhibitora I-CBP112, zmniejszało ekspresję transporterów ABC w komórkach MDA-MB-231 oraz A549 i uwrażliwiało komórki nowotworowe na działanie doksorubicyny, daunorubicyny, bleomycyny, cisplatyny, metotreksatu i paklitakselu [105]. Co więcej, w mojej pracy wykorzystałam linie wykazujące oporność na paklitaksel, a zastosowanie wyżej wymienionych inhibitorów przywracało komórkom fenotyp wrażliwy.

W celu zwiększenia skuteczności chemioterapii podjęto dotychczas próby łączenia leków przeciwnowotworowych w terapię skojarzone z inhibitorami transporterów ABC. Opracowano 3 generacje inhibitorów: inhibitory pierwszej generacji reprezentowane przez werapamil, cyklosporynę i chininę; leki drugiej generacji - valspodar, biricodar i pochodną werapamilu; związki trzeciej generacji o wysokim powinowactwie do specyficznych transporterów obejmujące inhibitory ABCB1, takie jak tariquidar, zosuquidar i elacridar, 2 względnie specyficzne inhibitory ABCC1: fumaran dofequidaru i sulindak oraz 2 inhibitory ABCG2: fumitremorgin C i K0143. Na etapie badań klinicznych większość wymienionych związków nie wykazywała skuteczności, występowały natomiast działania niepożądane takie jak wysoka toksyczność wynikająca w konieczności stosowania tych związków w wysokich stężeniach i/lub z niekorzystnych interakcji z lekami przeciwnowotworowymi [165]. Alternatywą dla obniżania aktywności enzymatycznej transporterów jest hamowanie ich ekspresji za pomocą interferującego RNA wyciszającego bezpośrednio mRNA genów kodujących białka ABC lub inne białka odpowiedzialne za wysoki poziom transporterów w komórkach nowotworowych (m.in. β -katenina, FZD1, DVL1) [166]. Nowym podejściem może być także unieczynnienie

genów dla transporterów ABC przy wykorzystaniu techniki CRISPR [167]. Rozwiązania te jak dotąd nie wyszły poza fazy badań przedklinicznych.

Większość z obecnie proponowanych rozwiązań ukierunkowanych na transportery ABC wykazywała niską skuteczność i wysoką toksyczność w badaniach klinicznych. Brak klinicznego sukcesu zahamowania aktywności pojedynczego transportera może być spowodowany nadmierną ekspresją wielu różnych transporterów ABC w komórkach nowotworowych [168]. Ponadto, celowanie w poszczególne transportery utrudnia heterogenność guza oraz zmiany w profilu ekspresji białek ABC związane z progresją choroby i pod presją leczenia. Opracowanie terapii wykazującej szerokie spektrum działania hamującego transportery ABC może stanowić potencjalny środek odwracający lub obniżający oporność na chemioterapię. Rozwiązanie polegające na celowaniu w SWI/SNF może być przykładem takiego rozwiązania.

Moje badania wskazują ponadto na występowanie dodatkowego czynnika transkrypcyjnego – HIF1A, który wraz z p300 i BRG1 tworzy kompleks na chromatynie i uczestniczy w ekspresji transporterów ABC powodując występowanie oporności na paklitaksel w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc i raka piersi. Wcześniejsze dane literaturowe wskazywały również na udział HIF1a w ekspresji ABCB6 [169] oraz ABCB1 [170–173]. HIF1 jest kluczowym czynnikiem w regulacji transkrypcji różnych genów docelowych w odpowiedzi na niedotlenienie (hipoksję). Hipoksja jest ważną cechą ludzkich guzów litych ze względu na połączenie niekontrolowanego, szybkiego wzrostu komórek nowotworowych i niezdolności lokalnego układu naczyniowego do zasilania szybko proliferujących guzów. Takie warunki prowadzą do akumulacji HIF1, któremu w komórkach nowotworowych przypisuje się rolę promującą proliferację, przeżycie, angiogenezę i metastazę [174]. Nadekspresja i zwiększoną aktywność HIF1 występuje również w komórkach reagujących na ekspozycję na leki. W naszych badaniach terapia paklitakselem aktywowała HIF-zależną ekspresję transporterów z grupy ABC i zwiększoną akumulację leków w lizosomach komórek opornych. W opornych na doksorubicynę komórkach kostniakomięsaka, ten czynnik transkrypcyjny promował transport leku na zewnątrz komórki poprzez aktywację transkrypcji *ABCB1*. Jednak komórki odporne na doksorubicynę, które były utrzymywane przez 2 miesiące w ciągłej hodowli w pożywce wolnej od leku, utraciły swoją lekooporność, a efekt ten był związany ze zmniejszeniem ekspresji *HIF1A* [175]. Ponieważ HIF1A jest klasyfikowany jako czynnik transkrypcyjny, logiczny ciąg zdarzeń obejmowałby jego wiązanie do DNA,

a następnie rekrutację p300 i BRG1. Jednakże, jak pokazują dane z eksperymentu ChIP-Seq dla p300 i BRG1 w linii MDA-MB-231 te dwa enzymy występują w promotorach genów *ABCC3* i *ABCC5* przez traktowaniem komórek paklitakselem, natomiast poziom HIF1A jest znacznie zwiększony w komórkach opornych na paklitaksel w pobliżu pików BRG1 na promotorach rozważanych genów. Przetestowałam wpływ wyciszenia HIF1A na występowanie p300 i BRG1 związanych z chromatyną. Niski poziom HIF1A znacząco zmniejszył kolokalizację pozostałych dwóch białek. Ponadto, zmniejszeniu uległy frakcje p300 i BRG1 w obszarze jądra komórkowego, co wskazuje, że HIF1A zwiększa rekrutację p300 i BRG1 do chromatyny w komórkach opornych na paklitaksel. Ponadto, współwystępowanie HIF1A i BRG1 na chromatynie w guzach utworzonych z opornych na paklitaksel komórek MDA-MB-231 jest znacznie wyższe w głębszych warstwach guza. Wskazuje to, że obecność i prawdopodobnie również aktywność p300 i BRG1 staje się zależna od HIF1A w trakcie nabywania przez komórki oporności na paklitaksel.

Ponadto, stan niedotlenienia wewnątrz guza może sprzyjać stabilizowaniu HIF1A, jego wiązaniu DNA i nadekspresji transporterów ABC wspieranej przez BRG1. W związku z tym liczba genów aktywowanych lub wzmacnianych transkrypcyjnie przez interakcję HIF1A-BRG1 może być różna w różnych częściach guza, a transkryptymy zależne od HIF1A mogą różnić się między wewnętrznymi i zewnętrznymi regionami guza. Nie zmienia to jednak faktu, że w komórkach poddanych leczeniu chemioterapeutykami w modelu naszym i innych modelach komórkowych HIF1A ulega nadekspresji, co zostało powiązane z opornością na chemioterapię u pacjentów [176]. Wskazuje to, że kompleks BRG1-p300-HIF1A może uczestniczyć także w oporności na inne powszechnie stosowane chemioterapeutyki. Ponadto przeprowadziłam eksperyment z inhibitorem proteasomu MG132, aby sprawdzić, czy podwyższony poziom HIF1A w komórkach opornych na paklitaksel może wynikać z zahamowania degradacji HIF1A przez proteasom. Zaobserwowałam, że inhibitor znacząco zwiększył poziom białka HIF1A tylko w liniach bazowych, ale nie w komórkach opornych na paklitaksel co wskazuje na zwiększoną ochronę przed degradacją HIF1A przez proteasom w fenotypie lekoopornym.

Od początku lat 90-tych XX wieku HIF jest wykorzystywany jako cel do tworzenia nowych terapii przeciwnowotworowych. Niektóre rodzaje inhibitorów bezpośrednio wpływają na poziom mRNA lub białka HIF-1 lub HIF-2, dimeryzację podjednostek α i β lub interakcję HIF i koaktywatorów. Jednak żaden z nich nie został

wprowadzony na rynek ze względu na obawy dotyczące bezpieczeństwa lub słabą skuteczność terapeutyczną [177]. Przykładowo, Ganetespib, został poddany licznym badaniom klinicznym w kombinacji z różnymi chemioterapeutykami pod kątem leczenia różnych typów nowotworów, a w przypadku kombinacji z docetakselem w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuca osiągnął aż III fazę badań klinicznych, która została przerwana ze względu na brak skuteczności [178]. Niska skuteczność terapeutyczna inhibitorów HIF może być związana z nieodpowiednim schematem leczenia. W przypadku badań klinicznych nad terapiami kombinowanymi z inhibitorami HIF, związki te stosowane były od 0.5 do 1 godziny przed podaniem leku. Biorąc pod uwagę, że HIF1A jest czynnikiem transkrypcyjnym uczestniczącym w ekspresji transporterów ABC, ten czas mógł być zbyt krótki by wywołać zmiany na poziomie białka uwrażliwiające komórki na działanie chemioterapii. Warto przeprowadzić badania *in vivo* nad zastosowaniem inhibitora HIF1A, w których inhibitor ten podawany byłby 48 i 72 godziny przed zastosowaniem chemioterapii.

Na podstawie danych zdeponowanych w bazach TCGA/GTEX dostarczyłam dowodów na to, że wysoka ekspresja *EP300*, *SMARCA4* i *HIF1A* może służyć jako marker prognostyczny odpowiedzi pacjentek z rakiem piersi na chemioterapię z udziałem taksanów. Jednocześnie wysoka transkrypcja *HIF1A*, *EP300* i *SMARCA4* może mieć znaczenie kliniczne i wpływać na wyniki leczenia. Dlatego ilościowa ocena profilu ich ekspresji może pomóc w podjęciu decyzji o schemacie leczenia, zastąpieniu chemioterapii lub skojarzeniu leków chemioterapeutycznych z inhibitorami ABCC lub inhibitorami BRG1, p300 czy HIF1A.

W kolejnej części pracy, skupiłam się na mechanizmie związanym z opornością na lek wywołujący uszkodzenia DNA - cisplatinę. Wykazałam, że aktywacja szlaku ATM/ATR-Chk1/Chk2-p53 przez cisplatinę nie wpływa znacząco na poziom p300 wewnątrz komórki, ale nasila interakcję p300 z chromatyną, szczególnie z promotorami genów kontrolowanych przez E2F1, w których p53 pełni funkcję represora transkrypcji. Promotory wyciszane przez p53 w komórkach proliferujących charakteryzowały się stosunkowo wysoką gęstością nukleosomów, niską acetylacją H3K27 i trimetylacją H3K4. Indukcja szlaku ATM/ATR-Chk1/2-p53 przez subletalne dawki cisplatiny powodowała uwolnienie p53 z promotorów opisywanych genów, któremu towarzyszyły również uwolnienie KDM5B, i wzrost acetylacji reszt histonowych umożliwiającą transkrypcję zależną od aktywności p300 i SWI/SNF. Do tych genów zaliczyć można

geny związane z odpowiedzią na uszkodzenia i naprawą DNA. Wcześniejsze dane wykazywały niezgodność odnośnie tego czy ATPazy SWI/SNF pełnią funkcję aktywatora [137] czy represora [138] p53-zależnych genów. W naszym eksperymencie ATPaza kompleksu SWI/SNF -BRM aktywowała ekspresję genów indukowanych cisplatyną. Wcześniejsze dane wykazują związek między ekspresją BRM, a opornością na cisplatynę w komórkach raka jajnika [179]. W naszych eksperymentach zarówno, inhibicja p300 za pomocą C646 oraz ATPaz kompleksu SWI/SNF za pomocą PFI3 obniżała ekspresję genów aktywowanych cisplatyną oraz uwrażliwiała komórki nowotworowe na działanie niskich stężeń cisplatyny. Dane literaturowe potwierdzają rolę tych enzymów w uwrażliwianiu komórek nowotworowych na chemioterapię lekami powodującymi uszkodzenia DNA. Wykazano, że zastosowanie C646 w komórkach raka trzustki zwiększało poziom uszkodzeń indukowanych gemcytabiną i tym samym wzmacniało toksyczność tego leku [180]. Co ciekawe, w innym badaniu C646 uwrażliwiał komórki nowotworowe raka jelita grubego na działanie doksorubicyny przy czym chronił komórki nienowotworowe przed zależną od p53- apoptozą [181]. Zastosowanie PFI3 oraz jego pochodnej uwrażliwiała komórki glejaka na uszkadzający DNA temozolomid [182], a pochodna PFI3 uwrażliwiała komórki glejaka na temozolomid i bleomycynę [183]. Inhibitor ten, uwrażliwiał również komórki raka płuc i jelita grubego na doksorubicynę i etopozyd [184]. Jednakże dane te wskazywały wyłącznie na zwiększony poziom uszkodzeń DNA oraz proapoptotyczne działanie kombinacji inhibitor-lek, które przypisywano aktywności p300 i BRG1 w rozluźnianiu struktury chromatyny w miejscu uszkodzeń. W niniejszej pracy wykazano po raz pierwszy mechanizm regulacji ekspresji genów zaangażowanych w odpowiedź na cisplatynę zależny od kompleksu SWI/SNF-p300.

W pracy doktorskiej przedstawiłam dowody molekularne i mechanistyczne na obecność kompleksu p300-p53 w podzbiorze promotorów genów w komórkach niepoddanych stresowi oraz na to, że występowanie p300 w obecności p53 było niewystarczające do aktywnej transkrypcji genów. Jednym z wyjaśnień mogłoby być współwystępowanie p300 i deacetylaz histonowych w tych regionach. Wykazano, że HDAC1 i p300 konkurują o wiązanie histonów, ponieważ te dwa przeciwstawnie działające enzymy mogą bezpośrednio oddziaływać z nakładającymi się regionami ogona histonu H3. Co więcej, wykazano, że p300 może acetylować HDAC1 i osłabiać jego aktywność deacetylazy [185]. Aczkolwiek nasz eksperyment mający na celu sprawdzenie

wpływu inhibitorów wybranych enzymów remodelujących chromatynę nie potwierdził udziału HDAC1 w zależnej od p53 represji *FANCI*, podczas gdy efekt ten zaobserwowano po zastosowaniu inhibitora KDM5B, zwracając uwagę na możliwą funkcjonalną interakcję pomiędzy p300 i KDM5B. Wcześniejsze doniesienia pokazały zależność pomiędzy acetylacją H3K27 w regionie promotorowym genów *ILIRN* i *GRM2* a H3K4me3 w okolicach TSS i aktywacją transkrypcji. Zablockowanie odczytu H3K27ac przez białka BRD zniosło indukowaną przez H3K27ac aktywację H3K4me3 i ekspresję genów. Z drugiej strony wykazano również, że H3K4me3 może występować w promotorze przed rozpoczęciem transkrypcji i rekrutować p300/CBP w celu acetylacji histonów [33]. Wykazałam, że promotory wyciszane przez p53 w komórkach proliferujących charakteryzowały się stosunkowo wysoką gęstością nukleosomów, niską acetylacją H3K27 i trimetylacją H3K4. Indukcja szlaku ATM/ATR-Chek1/2-p53 przez subletalne dawki cisplatyny powodowała uwolnienie p53 z promotorów opisywanych genów, któremu towarzyszyły również uwolnienie KDM5B i wzrost H3K4me3. Zatem odłączenie KDM5B może skutkować akumulacją znacznika H3K4me3, która może zwiększać rekrutację p300 do promotora i nasilać acetylację nukleosomów. Podczas gdy niskie dawki cisplatyny aktywowały transkrypcję genów poprzez odłączenie KDM5B i p53, wyższe dawki mogłyby hamować te geny poprzez transaktywację p21 przez p53, a następnie rekrutację represora transkrypcyjnego Rb do promotorów kontrolowanych przez E2F1. Hipoteza ta wymaga dalszej weryfikacji eksperymentalnej, jednak przesłanką mogą być tutaj wyniki moich badań które wykazały, że wyższe dawki cisplatyny prowadzą do zahamowania podziałów mitotycznych głównie w fazie G1. Jednakże biorąc pod uwagę, że średnie stężenie cisplatyny we krwi pacjentów wynosi 5,37 µg/ml [186], czyli ok. 18 µM, oraz fakt, że komórki nowotworowe mogą usuwać lub deaktywować cisplatynę przez mechanizmy oporności wewnętrznej wysoce prawdopodobna jest aktywacja *DUSP12* i *FANCI* u pacjentów onkologicznych i rolę opisaną przeze mnie interakcji ATM/ATR-p53/p300/KDM5B.

Indukcja szlaku ATM/ATR-Chek1/2-p53 przez subletalne dawki cisplatyny powodowała uwolnienie p53 z promotorów *DUSP12* i *FANCI*. Ciekawym był fakt, że inhibicja szlaku ATM/ATR zapobiegała rozpadowi kompleksu E2F1-p300-p53 po zastosowaniu cisplatyny. Sugeruje to, że inhibicja szlaku ATM/ATR może zapobiegać ekspresji genów zaangażowanych w odpowiedź na cisplatynę i uwrażliwiać komórki na leki powodujące uszkodzenia DNA. Jednakże wymaga to weryfikacji eksperymentalnej.

Odlączeniu p53 pod wpływem cisplatyny towarzyszyło również uwolnienie KDM5B i aktywacja ekspresji genów. KDM5B i p53 pełniły zatem funkcję represorów tych genów. KDM5B wykazuje nadekspresję w wielu typach nowotworów i jest rozważany jako onkogen, gdyż odgrywa kluczową rolę w rozwoju raka poprzez promowanie proliferacji, naprawy DNA, przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego i nabywania fenotypu komórek macierzystych raka, a podwyższony poziom tego białka wiąże się ze skróconym przeżyciem [187,188]. Jednakże utrata KDM5B także prowadzi do zwiększonej proliferacji i podwyższonej ekspresji markerów komórek macierzystych raka [188]. *KDM5B* często ulega amplifikacji oraz zwiększonej ekspresji w komórkach raka piersi ER+, co wiąże się ze złym rokowaniem u pacjentów z tym typem raka piersi i zwiększa ryzyko wystąpienia oporności na terapię. W przeciwieństwie do hormonozależnego nowotworu piersi, ekspresja KDM5B jest stosunkowo niska w TNBC. Co ważne, zwiększenie ekspresji KDM5B zmniejsza aktywność migracyjną i inwazyjną linii komórkowych TNBC, podczas gdy wyciszenie KDM5B zwiększa te aktywności [187]. Supresyjne działanie KDM5B zaobserwowano również w przypadku czerniaka i ostrej białaczki szpikowej [187]. p53 jest jednym z najważniejszych supresorów nowotworowych zaangażowanych w różnorodne nowotwory u ludzi. *TP53*, ulega mutacji lub zostaje utracony w ponad 50% nowotworów przyczyniając się do rozwoju nowotworów [189]. W mojej pracy doktorskiej wykazałam, że wyciszenie p53 zwiększa ekspresję genów zaangażowanych w odpowiedź na chemioterapię. Nowe badania wykazały, że komórki nowotworowe z niedoborem p53 hiperaktywują szlaki naprawy pęknięć dwuniciowych DNA, aby przezwyciężyć uszkodzenia chemioterapeutyczne [189]. Zatem, warto rozważyć również obniżenie ekspresji i inaktywujące mutacje *TP53* oraz *KDM5B* jako biomarkery zwiększonej ekspresji tych genów, które mogą predysponować do występowania oporności na leki wywołujące uszkodzenia DNA. Inaktywacja lub niska ekspresja tych białek może być przesłanką sugerującą wykorzystanie innego podejścia terapeutycznego niż zastosowanie terapii wywołującej uszkodzenia DNA lub wykorzystanie inhibitorów SWI/SNF lub p300 jako uwrażliwaczy na chemioterapię.

Wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy sugerują, że zastosowanie inhibitorów SWI/SNF może uwrażliwiać komórki na działanie chemioterapii jak również odwracać istniejący już fenotyp oporny poprzez regulowanie transkrypcji niektórych genów z rodziny ABC i genów związanych z odpowiedzią na uszkodzenia DNA. Stosowanie

kombinacji inhibitor + lek zwiększa cytotoksyczność leku umożliwiając stosowanie niższych dawek co potencjalnie może się wiązać ze zwiększeniem efektywności terapii i zmniejszeniem skutków ubocznych. Wymagane są jednak dalsze badania, które zweryfikują możliwości zastosowania takich terapii kombinowanych *in vivo*.

8. Literatura

- [1] F. Bray, M. Laversanne, H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, I. Soerjomataram, A. Jemal, Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J Clin* 74 (2024) 229–263. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.21834>.
- [2] M. Elmadani, P.O. Mokaya, A.A.A. Omer, E.K. Kiptulon, S. Klara, M. Orsolya, Cancer burden in Europe: a systematic analysis of the GLOBOCAN database (2022), *BMC Cancer* 25 (2025) 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12885-025-13862-1/PEER-REVIEW>.
- [3] S.U. Khan, K. Fatima, S. Aisha, F. Malik, Unveiling the mechanisms and challenges of cancer drug resistance, *Cell Communication and Signaling* 2024 22:1 22 (2024) 1–26. <https://doi.org/10.1186/S12964-023-01302-1>.
- [4] J.G. Hiller, N.J. Perry, G. Poulgiannis, B. Riedel, E.K. Sloan, Perioperative events influence cancer recurrence risk after surgery, *Nature Reviews Clinical Oncology* 2017 15:4 15 (2017) 205–218. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.194>.
- [5] S. Tohme, R.L. Simmons, A. Tsung, Surgery for Cancer: A Trigger for Metastases, *Cancer Res* 77 (2017) 1548–1552. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1536>.
- [6] S. Bin Kwak, S.J. Kim, J. Kim, Y.L. Kang, C.W. Ko, I. Kim, J.W. Park, Tumor regionalization after surgery: Roles of the tumor microenvironment and neutrophil extracellular traps, *Experimental & Molecular Medicine* 2022 54:6 54 (2022) 720–729. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00784-2>.
- [7] S. Ben-Eliyahu, Tumor excision as a metastatic Russian roulette: Perioperative interventions to improve long-term survival of cancer patients, *Trends Cancer* 6 (2020) 951. <https://doi.org/10.1016/J.TRECAN.2020.06.004>.
- [8] M. Alieva, J. van Rheenen, M.L.D. Broekman, Potential impact of invasive surgical procedures on primary tumor growth and metastasis, *Clin Exp Metastasis* 35 (2018) 319–331. <https://doi.org/10.1007/s10585-018-9896-8>.
- [9] S. Sekaran, V. Selvaraj, D. Ganapathy, S.K. Rajamani Sekar, Can surgery induce cancer recurrence or metastasis? Revisiting the relationship between anesthetic selection and outcomes in cancer surgery, *Int J Surg* 109 (2023) 2878. <https://doi.org/10.1097/JS9.0000000000000530>.
- [10] P. Forget, J.A. Aguirre, I. Bencic, A. Borgeat, A. Cama, C. Condrón, C. Eintrei, P. Eroles, A. Gupta, T.G. Hales, D. Ionescu, M. Johnson, P. Kabata, I. Kirac, D. Ma, Z. Mokini, J.L. Guerrero Orriach, M. Retsky, S. Sandrucci, W. Siekmann, L. Štefančić, G. Votta-Vellis, C. Connolly, D. Buggy, How Anesthetic, Analgesic and Other Non-Surgical Techniques During Cancer Surgery Might Affect Postoperative Oncologic Outcomes: A

Summary of Current State of Evidence, *Cancers (Basel)* 11 (2019) 592.
<https://doi.org/10.3390/cancers11050592>.

- [11] A.A. Akhunzianov, E. V. Rozhina, Y. V. Filina, A.A. Rizvanov, R.R. Miftakhova, Resistance to Radiotherapy in Cancer, *Diseases* 13 (2025) 22.
<https://doi.org/10.3390/DISEASES13010022>.
- [12] B. Ibáñez, A. Melero, A. Montoro, N. San Onofre, J.M. Soriano, Molecular Insights into Radiation Effects and Protective Mechanisms: A Focus on Cellular Damage and Radioprotectors, *Current Issues in Molecular Biology* 2024, Vol. 46, Pages 12718-12732 46 (2024) 12718–12732. <https://doi.org/10.3390/CIMB46110755>.
- [13] C.R. Arnold, J. Mangesius, I.-I. Skvortsova, U. Ganswindt, The Role of Cancer Stem Cells in Radiation Resistance , *Frontiers in Oncology* 10 (2020) 164.
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.00164>.
- [14] H. Kang, B. Kim, J. Park, H.S. Youn, B.H. Youn, The Warburg effect on radioresistance: Survival beyond growth, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1878 (2023) 188988. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2023.188988>.
- [15] M. Mollaei, Z.M. Hassan, F. Khorshidi, L. Langroudi, Chemotherapeutic drugs: Cell death- and resistance-related signaling pathways. Are they really as smart as the tumor cells?, *Transl Oncol* 14 (2021) 101056. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101056>.
- [16] U. Anand, A. Dey, A.K.S. Chandel, R. Sanyal, A. Mishra, D.K. Pandey, V. De Falco, A. Upadhyay, R. Kandimalla, A. Chaudhary, J.K. Dhanjal, S. Dewanjee, J. Vallamkondu, J.M. Pérez de la Lastra, Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics, *Genes Dis* 10 (2022) 1367. <https://doi.org/10.1016/J.GENDIS.2022.02.007>.
- [17] S.S. Bashraheel, A. Domling, S.K. Goda, Update on targeted cancer therapies, single or in combination, and their fine tuning for precision medicine, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 125 (2020) 110009.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110009>.
- [18] Y. Gu, R. Yang, Y. Zhang, M. Guo, K. Takehiro, M. Zhan, L. Yang, H. Wang, Molecular mechanisms and therapeutic strategies in overcoming chemotherapy resistance in cancer, *Molecular Biomedicine* 2025 6:1 6 (2025) 1–22. <https://doi.org/10.1186/S43556-024-00239-2>.
- [19] N.M. Abdelmaksoud, A.I. Abulsoud, A.S. Doghish, T.M. Abdelghany, From resistance to resilience: Uncovering chemotherapeutic resistance mechanisms; insights from established models, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1878 (2023) 188993. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2023.188993>.
- [20] L. Ponnusamy, P.K.S. Mahalingaiah, Y.W. Chang, K.P. Singh, Role of cellular reprogramming and epigenetic dysregulation in acquired chemoresistance in breast cancer, *Cancer Drug Resistance* 2 (2019) 297. <https://doi.org/10.20517/CDR.2018.11>.
- [21] A.M. Tsimberidou, E. Fountzilas, M. Nikanjam, R. Kurzrock, Review of precision cancer medicine: Evolution of the treatment paradigm., *Cancer Treat Rev* 86 (2020) 102019. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102019>.

- [22] R.M. Sylva, S.I. Ahmed, Targeted therapies in cancer, *Surgery (Oxford)* 42 (2024) 150–155. <https://doi.org/10.1016/J.MPSUR.2023.12.004>.
- [23] H.Y. Min, H.Y. Lee, Molecular targeted therapy for anticancer treatment, *Experimental & Molecular Medicine* 2022 54:10 54 (2022) 1670–1694. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00864-3>.
- [24] B. Liu, H. Zhou, L. Tan, K.T.H. Siu, X.Y. Guan, Exploring treatment options in cancer: tumor treatment strategies, *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2024 9:1 9 (2024) 1–44. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01856-7>.
- [25] E. Youssef, B. Fletcher, D. Palmer, Enhancing precision in cancer treatment: the role of gene therapy and immune modulation in oncology, *Front Med (Lausanne)* 11 (2024) 1527600. <https://doi.org/10.3389/FMED.2024.1527600/XML>.
- [26] N.M. Ayoub, Editorial: Novel Combination Therapies for the Treatment of Solid Cancers, *Front Oncol* 11 (2021) 708943. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.708943/BIBTEX>.
- [27] J. Boshuizen, D.S. Peeper, Rational Cancer Treatment Combinations: An Urgent Clinical Need, *Mol Cell* 78 (2020) 1002–1018. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2020.05.031>.
- [28] Y. Shlyakhtina, K.L. Moran, M.M. Portal, Genetic and Non-Genetic Mechanisms Underlying Cancer Evolution., *Cancers (Basel)* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/cancers13061380>.
- [29] X. Yu, H. Zhao, R. Wang, Y. Chen, X. Ouyang, W. Li, Y. Sun, A. Peng, Cancer epigenetics: from laboratory studies and clinical trials to precision medicine, *Cell Death Discovery* 2024 10:1 10 (2024) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41420-024-01803-z>.
- [30] Z. Sahafnejad, S. Ramazi, A. Allahverdi, An Update of Epigenetic Drugs for the Treatment of Cancers and Brain Diseases: A Comprehensive Review., *Genes (Basel)* 14 (2023). <https://doi.org/10.3390/genes14040873>.
- [31] V. Cavalieri, The Expanding Constellation of Histone Post-Translational Modifications in the Epigenetic Landscape., *Genes (Basel)* 12 (2021). <https://doi.org/10.3390/genes12101596>.
- [32] Y. Jing, X. Li, Z. Liu, X.D. Li, Roles of Negatively Charged Histone Lysine Acylations in Regulating Nucleosome Structure and Dynamics., *Front Mol Biosci* 9 (2022) 899013. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.899013>.
- [33] T. Zhang, S. Cooper, N. Brockdorff, The interplay of histone modifications - writers that read., *EMBO Rep* 16 (2015) 1467–1481. <https://doi.org/10.15252/embr.201540945>.
- [34] P.B. Talbert, S. Henikoff, The Yin and Yang of Histone Marks in Transcription., *Annu Rev Genomics Hum Genet* 22 (2021) 147–170. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-120220-085159>.
- [35] P.K. Rajan, U.-A. Udoh, J.D. Sanabria, M. Banerjee, G. Smith, M.S. Schade, J. Sanabria, K. Sodhi, S. Pierre, Z. Xie, J.I. Shapiro, J. Sanabria, The Role of Histone Acetylation-/Methylation-Mediated Apoptotic Gene Regulation in Hepatocellular Carcinoma., *Int J Mol Sci* 21 (2020). <https://doi.org/10.3390/ijms21238894>.

- [36] J.W. Hwang, Y. Cho, G.-U. Bae, S.-N. Kim, Y.K. Kim, Protein arginine methyltransferases: promising targets for cancer therapy, *Exp Mol Med* 53 (2021) 788–808. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00613-y>.
- [37] Q. Liao, J. Yang, S. Ge, P. Chai, J. Fan, R. Jia, Novel insights into histone lysine methyltransferases in cancer therapy: From epigenetic regulation to selective drugs, *J Pharm Anal* 13 (2023) 127–141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpha.2022.11.009>.
- [38] I. V Bure, M. V Nemtsova, E.B. Kuznetsova, Histone Modifications and Non-Coding RNAs: Mutual Epigenetic Regulation and Role in Pathogenesis, *Int J Mol Sci* 23 (2022). <https://doi.org/10.3390/ijms23105801>.
- [39] C. Chen, Z. Wang, Y. Ding, L. Wang, S. Wang, H. Wang, Y. Qin, DNA Methylation: From Cancer Biology to Clinical Perspectives., *Front Biosci (Landmark Ed)* 27 (2022) 326. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2712326>.
- [40] Z.Q. Wang, Z.C. Zhang, Y.Y. Wu, Y.N. Pi, S.H. Lou, T.B. Liu, G. Lou, C. Yang, Bromodomain and extraterminal (BET) proteins: biological functions, diseases and targeted therapy, *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2023 8:1 8 (2023) 1–26. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01647-6>.
- [41] R.A.P.K.L.M.M.A.K.N.S.P.S.R.C.M.G.M.Y.S. Chinchole Pratik, Epigenetics and Cancer: Understanding How Genetic Regulation Beyond DNA Sequencing Influences Tumor Growth, Metastasis, Drug Resistance, and Therapy Response in Precision Medicine, *International Journal of Pharmaceutical Sciences* 03 (2025). <https://doi.org/10.5281/ZENODO.15167218>.
- [42] K. Gronkowska, A. Robaszkiewicz, Genetic dysregulation of EP300 in cancers in light of cancer epigenome control – perspectives of specific targeting of p300 proficient and deficient cancers, *Molecular Therapy: Oncology* 32 (2024) 200871. <https://doi.org/10.1016/J.OMTON.2024.200871/ASSET/FC0F14FC-216D-4F53-882F-A32A42F56E24/MAIN.ASSETS/GR5.JPG>.
- [43] J.E. Audia, R.M. Campbell, Histone Modifications and Cancer., *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8 (2016) a019521. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019521>.
- [44] J. Song, P. Yang, C. Chen, W. Ding, O. Tillement, H. Bai, S. Zhang, Targeting epigenetic regulators as a promising avenue to overcome cancer therapy resistance, *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2025 10:1 10 (2025) 1–56. <https://doi.org/10.1038/s41392-025-02266-z>.
- [45] R.R. Walker, Z. Rentia, K.B. Chiappinelli, Epigenetically programmed resistance to chemo- and immuno-therapies, *Adv Cancer Res* 158 (2023) 41. <https://doi.org/10.1016/BS.ACR.2022.12.001>.
- [46] L. Tao, Y. Zhou, Y. Luo, J. Qiu, Y. Xiao, J. Zou, Y. Zhang, X. Liu, X. Yang, K. Gou, J. Xu, X. Guan, X. Cen, Y. Zhao, Epigenetic regulation in cancer therapy: From mechanisms to clinical advances, *MedComm - Oncology* 3 (2024) e59. <https://doi.org/10.1002/MOG2.59;SUBPAGE:STRING:FULL>.

- [47] R. Vatapalli, A.P. Rossi, H.M. Chan, J. Zhang, Cancer epigenetic therapy: recent advances, challenges, and emerging opportunities, *Epigenomics* 17 (2024) 59. <https://doi.org/10.1080/17501911.2024.2430169>.
- [48] Q. Babar, A. Saeed, T.A. Tabish, S. Pricl, H. Townley, N. Thorat, Novel epigenetic therapeutic strategies and targets in cancer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1868 (2022) 166552. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2022.166552>.
- [49] F. Faiola, X. Liu, S. Lo, S. Pan, K. Zhang, E. Lyman, A. Farina, E. Martinez, Dual regulation of c-Myc by p300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover and coactivation of Myc-induced transcription., *Mol Cell Biol* 25 (2005) 10220–10234. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.23.10220-10234.2005>.
- [50] D.R. Pattabiraman, C. McGirr, K. Shakhbazov, V. Barbier, K. Krishnan, P. Mukhopadhyay, P. Hawthorne, A. Trezise, J. Ding, S.M. Grimmond, P. Papanthanasou, W.S. Alexander, A.C. Perkins, J.-P. Levesque, I.G. Winkler, T.J. Gonda, Interaction of c-Myb with p300 is required for the induction of acute myeloid leukemia (AML) by human AML oncogenes., *Blood* 123 (2014) 2682–2690. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-413187>.
- [51] X. Geng, C. Wang, X. Gao, P. Chowdhury, J. Weiss, J.A. Villegas, B. Saed, T. Perera, Y. Hu, J. Reneau, M. Sverdlow, A. Wolfe, N. Brown, P. Harms, N.G. Bailey, K. Inamdar, A.C. Hristov, T. Tejasvi, J. Montes, C. Barrionuevo, L. Taxa, S. Casavilca, J.L.A. de Pádua Covas Lage, H.F. Culler, J. Pereira, J.S. Runge, T. Qin, L.C. Tsoi, H.S. Hong, L. Zhang, C.A. Lyssiotis, R. Ohe, T. Toubai, A. Zevallos-Morales, C. Murga-Zamalloa, R.A. Wilcox, GATA-3 is a proto-oncogene in T-cell lymphoproliferative neoplasms., *Blood Cancer J* 12 (2022) 149. <https://doi.org/10.1038/s41408-022-00745-y>.
- [52] A. Ito, C.H. Lai, X. Zhao, S. Saito, M.H. Hamilton, E. Appella, T.P. Yao, p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2., *EMBO J* 20 (2001) 1331–1340. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.6.1331>.
- [53] S. Kannan, A.W. Partridge, D.P. Lane, C.S. Verma, The Dual Interactions of p53 with MDM2 and p300: Implications for the Design of MDM2 Inhibitors., *Int J Mol Sci* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20235996>.
- [54] J.-R. Choi, S.-Y. Lee, K.S. Shin, C.Y. Choi, S.J. Kang, p300-mediated acetylation increased the protein stability of HIPK2 and enhanced its tumor suppressor function, *Sci Rep* 7 (2017) 16136. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16489-w>.
- [55] M. Shiota, A. Yokomizo, E. Kashiwagi, Y. Tada, J. Inokuchi, K. Tatsugami, K. Kuroiwa, T. Uchiumi, N. Seki, S. Naito, Foxo3a expression and acetylation regulate cancer cell growth and sensitivity to cisplatin., *Cancer Sci* 101 (2010) 1177–1185. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01503.x>.
- [56] Z. Mahmud, A.R. Gomes, H.J. Lee, S. Aimjongjun, Y. Jiramongkol, S. Yao, S. Zona, G. Alasiri, G. Gong, E. Yagüe, E.W.-F. Lam, EP300 and SIRT1/6 Co-Regulate Lapatinib Sensitivity Via Modulating FOXO3-Acetylation and Activity in Breast Cancer., *Cancers (Basel)* 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/cancers11081067>.

- [57] L. Galbiati, R. Mendoza-Maldonado, M.I. Gutierrez, M. Giacca, Regulation of E2F-1 after DNA damage by p300-mediated acetylation and ubiquitination., *Cell Cycle* 4 (2005) 930–939. <https://doi.org/10.4161/cc.4.7.1784>.
- [58] S. Manickavinayaham, R. Vélez-Cruz, A.K. Biswas, E. Bedford, B.J. Klein, T.G. Kutateladze, B. Liu, M.T. Bedford, D.G. Johnson, E2F1 acetylation directs p300/CBP-mediated histone acetylation at DNA double-strand breaks to facilitate repair, *Nat Commun* 10 (2019) 4951. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12861-8>.
- [59] P.O. Hassa, S.S. Haenni, C. Buerki, N.I. Meier, W.S. Lane, H. Owen, M. Gersbach, R. Imhof, M.O. Hottiger, Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription., *J Biol Chem* 280 (2005) 40450–40464. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507553200>.
- [60] M.K.P. Jayatunga, S. Thompson, T.C. McKee, M.C. Chan, K.M. Reece, A.P. Hardy, R. Sekimik, P.T. Seden, K.M. Cook, J.B. McMahan, W.D. Figg, C.J. Schofield, A.D. Hamilton, Inhibition of the HIF1 α -p300 interaction by quinone- and indandione-mediated ejection of structural Zn(II)., *Eur J Med Chem* 94 (2015) 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.06.006>.
- [61] L. Jin, J. Garcia, E. Chan, C. de la Cruz, E. Segal, M. Merchant, S. Kharbanda, R. Raisner, P.M. Haverty, Z. Modrusan, J. Ly, E. Choo, S. Kaufman, M.H. Beresini, F.A. Romero, S. Magnuson, K.E. Gascoigne, Therapeutic Targeting of the CBP/p300 Bromodomain Blocks the Growth of Castration-Resistant Prostate Cancer, *Cancer Res* 77 (2017) 5564–5575. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0314>.
- [62] A. Bommi-Reddy, S. Park-Chouinard, D.N. Mayhew, E. Terzo, A. Hingway, M.J. Steinbaugh, J.E. Wilson, R.J. 3rd Sims, A.R. Conery, CREBBP/EP300 acetyltransferase inhibition disrupts FOXA1-bound enhancers to inhibit the proliferation of ER+ breast cancer cells., *PLoS One* 17 (2022) e0262378. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262378>.
- [63] M. Sobczak, M. Strachowska, K. Gronkowska, A. Robaszkiewicz, Activation of ABCC Genes by Cisplatin Depends on the CoREST Occurrence at Their Promoters in A549 and MDA-MB-231 Cell Lines, *Cancers (Basel)* 14 (2022) 894. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14040894/S1>.
- [64] H. Ono, M.D. Basson, H. Ito, P300 inhibition enhances gemcitabine-induced apoptosis of pancreatic cancer., *Oncotarget* 7 (2016) 51301–51310. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10117>.
- [65] N. Chatterjee, D. Sinha, M. Lemma-Dechassa, S. Tan, M.A. Shogren-Knaak, B. Bartholomew, Histone H3 tail acetylation modulates ATP-dependent remodeling through multiple mechanisms, *Nucleic Acids Res* 39 (2011) 8378. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKR535>.
- [66] F. Hao, Y. Zhang, J. Hou, B. Zhao, Chromatin remodeling and cancer: the critical influence of the SWI/SNF complex, *Epigenetics & Chromatin* 2025 18:1 18 (2025) 1–17. <https://doi.org/10.1186/S13072-025-00590-W>.
- [67] H.E. Marei, Epigenetic regulators in cancer therapy and progression, *Npj Precision Oncology* 2025 9:1 9 (2025) 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41698-025-01003-7>.

- [68] K.A. Orlando, V. Nguyen, J.R. Raab, T. Walhart, B.E. Weissman, Remodeling the cancer epigenome: mutations in the SWI/SNF complex offer new therapeutic opportunities, *Expert Rev Anticancer Ther* 19 (2019) 375. <https://doi.org/10.1080/14737140.2019.1605905>.
- [69] L. Wang, J. Tang, SWI/SNF complexes and cancers, *Gene* 870 (2023) 147420. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2023.147420>.
- [70] J.B. Santamarina, C. Astier, M. Garrido, L. Colmet Daage, T.I. Roumeliotis, E. Anthony, M. Pardo, M. Chasseriaud, P. Gestraud, C. Ngo, D. Morel, R. Chabanon, J. Choudhary, E. Del Nery, S. Postel-Vinay, A. Ballesta, G. Roussy, Integrated multiomic profiling reveals SWI/SNF subunit-specific pathway alterations and targetable vulnerabilities, *BioRxiv* (2024) 2024.07.16.603530. <https://doi.org/10.1101/2024.07.16.603530>.
- [71] P. Mittal, C.W.M. Roberts, The SWI/SNF complex in cancer — biology, biomarkers and therapy, *Nat Rev Clin Oncol* 17 (2020) 435. <https://doi.org/10.1038/S41571-020-0357-3>.
- [72] B. Kearns, A. McKell, I. Steveson, P. Worley, B. Barton, J. Bennett, D.L. Anderson, J. Harris, J. Christensen, J.J. Barrott, ARID1A and Its Impact Across the Hallmarks of Cancer, *Int J Mol Sci* 26 (2025) 4644. <https://doi.org/10.3390/IJMS26104644>.
- [73] Y. Chen, M. Zhao, L. Zhang, D. Shen, X. Xu, Q. Yi, L. Tang, SNF5, a core subunit of SWI/SNF complex, regulates melanoma cancer cell growth, metastasis, and immune escape in response to matrix stiffness, *Transl Oncol* 17 (2022) 101335. <https://doi.org/10.1016/J.TRANON.2021.101335>.
- [74] S.F. Faraj, A. Chaux, N. Gonzalez-Roibon, E. Munari, C. Ellis, T. Driscoll, M.P. Schoenberg, T.J. Bivalacqua, I.M. Shih, G.J. Netto, ARID1A immunohistochemistry improves outcome prediction in invasive urothelial carcinoma of urinary bladder, *Hum Pathol* 45 (2014) 2233–2239. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.07.003>.
- [75] Z. Zhang, F. Wang, C. Du, H. Guo, L. Ma, X. Liu, M. Kornmann, X. Tian, Y. Yang, BRM/SMARCA2 promotes the proliferation and chemoresistance of pancreatic cancer cells by targeting JAK2/STAT3 signaling, *Cancer Lett* 402 (2017) 213–224. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2017.05.006>.
- [76] B. Kaufmann, B. Wang, S. Zhong, M. Laschinger, P. Patil, M. Lu, V. Assfalg, Z. Cheng, H. Friess, N. Hüser, G. von Figura, D. Hartmann, BRG1 promotes hepatocarcinogenesis by regulating proliferation and invasiveness, *PLoS One* 12 (2017) e0180225. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0180225>.
- [77] F.J. de Miguel, C. Gentile, W.W. Feng, S.J. Silva, A. Sankar, F. Exposito, W.L. Cai, M.A. Melnick, C. Robles-Oteiza, M.M. Hinkley, J.A. Tsai, A.V. Hartley, J. Wei, A. Wurtz, F. Li, M.I. Toki, D.L. Rimm, R. Homer, C.B. Wilen, A.Z. Xiao, J. Qi, Q. Yan, D.X. Nguyen, P.A. Jänne, C. Kadoch, K.A. Politi, Mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes promote tyrosine kinase inhibitor resistance in EGFR-mutant lung cancer, *Cancer Cell* 41 (2023) 1516-1534.e9. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2023.07.005>.
- [78] B. Gokbayrak, U.B. Altintas, S. Lingadahalli, T. Morova, C.C.F. Huang, B. Ersoy Fazlioglu, I. Pak Lok Yu, B.M. Kalkan, P. Cejas, S.H.Y. Kung, L. Fazli, A. Kawamura, H.W. Long, C. Acilan, T.T. Onder, T. Bagci-Onder, J.T. Lynch, N.A. Lack, Identification

- of selective SWI/SNF dependencies in enzalutamide-resistant prostate cancer, *Communications Biology* 2025 8:1 8 (2025) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-07413-w>.
- [79] I. Jancewicz, J.A. Siedlecki, T.J. Sarnowski, E. Sarnowska, BRM: the core ATPase subunit of SWI/SNF chromatin-remodelling complex—a tumour suppressor or tumour-promoting factor?, *Epigenetics & Chromatin* 2019 12:1 12 (2019) 1–17. <https://doi.org/10.1186/S13072-019-0315-4>.
- [80] R. Dubey, A.M. Lebensohn, Z. Bahrami-Nejad, C. Marceau, M. Champion, O. Gevaert, B.I. Sikic, J.E. Carette, R. Rohatgi, Chromatin-remodeling complex SWI/SNF controls multidrug resistance by transcriptionally regulating the drug efflux pump ABCB1, *Cancer Res* 76 (2016) 5810–5821. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0716/652429/AM/CHROMATIN-REMODELING-COMPLEX-SWI-SNF-CONTROLS>.
- [81] N.C. Kampan, M.T. Madondo, O.M. McNally, M. Quinn, M. Plebanski, Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer, *Biomed Res Int* 2015 (2015) 413076. <https://doi.org/10.1155/2015/413076>.
- [82] F. Zang, Y. Rao, X. Zhu, Z. Wu, H. Jiang, Shikonin suppresses NEAT1 and Akt signaling in treating paclitaxel-resistant non-small cell of lung cancer., *Mol Med* 26 (2020) 28. <https://doi.org/10.1186/s10020-020-00152-8>.
- [83] J. Pu, J. Shen, Z. Zhong, M. Yanling, J. Gao, KANK1 regulates paclitaxel resistance in lung adenocarcinoma A549 cells., *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 48 (2020) 639–647. <https://doi.org/10.1080/21691401.2020.1728287>.
- [84] J. Ge, W. Zuo, Y. Chen, Z. Shao, K. Yu, The advance of adjuvant treatment for triple-negative breast cancer., *Cancer Biol Med* 19 (2021) 187–201. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0752>.
- [85] S.M. Maloney, C.A. Hoover, L. V Morejon-Lasso, J.R. Prospero, Mechanisms of Taxane Resistance., *Cancers (Basel)* 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/cancers12113323>.
- [86] J. Škubník, V. Pavlíčková, T. Ruml, S. Rimpelová, Current Perspectives on Taxanes: Focus on Their Bioactivity, Delivery and Combination Therapy., *Plants (Basel)* 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/plants10030569>.
- [87] Z. Li, Y. ting Zhu, M. Xiang, J. lan Qiu, S. qing Luo, F. Lin, Enhanced lysosomal function is critical for paclitaxel resistance in cancer cells: reversed by artesunate, *Acta Pharmacol Sin* 42 (2020) 624. <https://doi.org/10.1038/S41401-020-0445-Z>.
- [88] K.O. Alfarouk, C.M. Stock, S. Taylor, M. Walsh, A.K. Muddathir, D. Verduzco, A.H.H. Bashir, O.Y. Mohammed, G.O. Elhassan, S. Harguindey, S.J. Reshkin, M.E. Ibrahim, C. Rauch, Resistance to cancer chemotherapy: Failure in drug response from ADME to P-gp, *Cancer Cell Int* 15 (2015) 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12935-015-0221-1/FIGURES/3>.
- [89] M. Shimomura, T. Yaoi, K. Itoh, D. Kato, K. Terauchi, J. Shimada, S. Fushiki, Drug resistance to paclitaxel is not only associated with ABCB1 mRNA expression but also with drug accumulation in intracellular compartments in human lung cancer cell lines, *Int J Oncol* 40 (2012) 995–1004. <https://doi.org/10.3892/ijco.2011.1297>.

- [90] P. Liu-Kreyche, H. Shen, A.M. Marino, R.A. Iyer, W.G. Humphreys, Y. Lai, Lysosomal P-gp-MDR1 Confers Drug Resistance of Brentuximab Vedotin and Its Cytotoxic Payload Monomethyl Auristatin E in Tumor Cells., *Front Pharmacol* 10 (2019) 749. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00749>.
- [91] J.M. Moore, E.L. Bell, R.O. Hughes, A.S. Garfield, ABC transporters: human disease and pharmacotherapeutic potential, *Trends Mol Med* 29 (2023) 152–172. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2022.11.001/ASSET/F42C795B-8C54-48C6-97A8-585DC06F99F2/MAIN.ASSETS/GR1.JPG>.
- [92] Q. ZHANG, Y. SONG, X. CHENG, Z. XU, O.A. MATTHEW, J.I.A. WANG, Z. SUN, X. ZHANG, Apatinib Reverses Paclitaxel-resistant Lung Cancer Cells (A549) Through Blocking the Function of ABCB1 Transporter, *Anticancer Res* 39 (2019) 5461 LP – 5471. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13739>.
- [93] T. Oguri, H. Ozasa, T. Uemura, Y. Bessho, M. Miyazaki, K. Maeno, H. Maeda, S. Sato, R. Ueda, MRP7/ABCC10 expression is a predictive biomarker for the resistance to paclitaxel in non-small cell lung cancer., *Mol Cancer Ther* 7 (2008) 1150–1155. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-2088>.
- [94] C. Melguizo, J. Prados, R. Luque, R. Ortiz, O. Caba, P.J. Alvarez, B. Gonzalez, A. Aranega, Modulation of MDR1 and MRP3 gene expression in lung cancer cells after paclitaxel and carboplatin exposure., *International Journal of Molecular Sciences* file:///C:/Users/Karolina/Downloads/34347777.Nbib 13 (2012) 16624–16635. <https://doi.org/10.3390/ijms131216624>.
- [95] A.A. SPROUSE, B.-S. HERBERT, Resveratrol Augments Paclitaxel Treatment in MDA-MB-231 and Paclitaxel-resistant MDA-MB-231 Breast Cancer Cells, *Anticancer Res* 34 (2014) 5363 LP – 5374.
- [96] V. Němcová-Fürstová, D. Kopperová, K. Balušíková, M. Ehrlichová, V. Brynychová, R. Václavíková, P. Daniel, P. Souček, J. Kovář, Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporters, *Toxicol Appl Pharmacol* 310 (2016) 215–228. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2016.09.020>.
- [97] J.R. McCorkle, J.W. Gorski, J. Liu, M.B. Riggs, A.B. McDowell, N. Lin, C. Wang, F.R. Ueland, J.M. Kolesar, Lapatinib and poziotinib overcome ABCB1-mediated paclitaxel resistance in ovarian cancer., *PLoS One* 16 (2021) e0254205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254205>.
- [98] X. Si, Z. Gao, F. Xu, Y. Zheng, SOX2 upregulates side population cells and enhances their chemoresistant ability by transactivating ABCC1 expression contributing to intrinsic resistance to paclitaxel in melanoma, *Mol Carcinog* 59 (2020) 257–264. <https://doi.org/10.1002/MC.23148>.
- [99] Y. Hou, Q. Zhu, Z. Li, Y. Peng, X. Yu, B. Yuan, Y. Liu, Y. Liu, L. Yin, Y. Peng, Z. Jiang, J. Li, B. Xie, Y. Duan, G. Tan, K. Gulina, Z. Gong, L. Sun, X. Fan, X. Li, The FOXM1–ABCC5 axis contributes to paclitaxel resistance in nasopharyngeal carcinoma cells, *Cell Death Dis* 8 (2017) e2659–e2659. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.53>.

- [100] Y. Hou, Z. Dong, W. Zhong, L. Yin, X. Li, G. Kuerban, H. Huang, FOXM1 Promotes Drug Resistance in Cervical Cancer Cells by Regulating ABCC5 Gene Transcription., *Biomed Res Int* 2022 (2022) 3032590. <https://doi.org/10.1155/2022/3032590>.
- [101] C. Huang, X. Zhang, L. Jiang, L. Zhang, M. Xiang, H. Ren, FoxM1 Induced Paclitaxel Resistance via Activation of the FoxM1/PHB1/RAF-MEK-ERK Pathway and Enhancement of the ABCA2 Transporter, *Mol Ther Oncolytics* 14 (2019) 196–212. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.omto.2019.05.005>.
- [102] Y. Li, J. Sun, S. Gao, H. Hu, P. Xie, HOXB4 knockdown enhances the cytotoxic effect of paclitaxel and cisplatin by downregulating ABC transporters in ovarian cancer cells, *Gene* 663 (2018) 9–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.033>.
- [103] P. Mukherjee, A. Gupta, D. Chattopadhyay, U. Chatterji, Modulation of SOX2 expression delineates an end-point for paclitaxel-effectiveness in breast cancer stem cells, *Sci Rep* 7 (2017) 9170. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08971-2>.
- [104] A. Kohli, S.-L. Huang, T.-C. Chang, C.C.-K. Chao, N.-K. Sun, H1.0 induces paclitaxel-resistance genes expression in ovarian cancer cells by recruiting GCN5 and androgen receptor, *Cancer Sci* 113 (2022) 2616–2626. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/cas.15448>.
- [105] M. Strachowska, K. Gronkowska, S. Michlewska, A. Robaszekiewicz, CBP/p300 Bromodomain Inhibitor-I-CBP112 Declines Transcription of the Key ABC Transporters and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapy Drugs, *Cancers (Basel)* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/CANCERS13184614>.
- [106] J. Pietrzak, T. Płoszaj, Ł. Pułaski, A. Robaszekiewicz, EP300-HDAC1-SWI/SNF functional unit defines transcription of some DNA repair enzymes during differentiation of human macrophages, *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 1862 (2019) 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.10.019>.
- [107] M. Sobczak, J. Pietrzak, P. Tomasz, A. Robaszekiewicz, BRG1 Activates Proliferation and Transcription of Cell Cycle-Dependent Genes in Breast Cancer Cells, *Cancers (Basel)* 12 (2020) 1–18. <https://doi.org/10.3390/cancers12020349>.
- [108] Q. Wu, S. Sharma, H. Cui, S.E. LeBlanc, H. Zhang, R. Muthuswami, J.A. Nickerson, A.N. Imbalzano, Targeting the chromatin remodeling enzyme BRG1 increases the efficacy of chemotherapy drugs in breast cancer cells, *Oncotarget* 7 (2016) 27158–27175. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8384>.
- [109] T.B. Stage, T.K. Bergmann, D.L. Kroetz, Clinical Pharmacokinetics of Paclitaxel Monotherapy: An Updated Literature Review., *Clin Pharmacokinet* 57 (2018) 7–19. <https://doi.org/10.1007/s40262-017-0563-z>.
- [110] J.F. Díaz, I. Barasoain, A.A. Souto, F. Amat-Guerri, J.M. Andreu, Macromolecular accessibility of fluorescent taxoids bound at a paclitaxel binding site in the microtubule surface, *Journal of Biological Chemistry* 280 (2005) 3928–3937. <https://doi.org/10.1074/JBC.M407816200/ASSET/95894BA3-FEDF-4532-AB04-13DE97A28AD9/MAIN.ASSETS/GR8.JPG>.
- [111] K. Gronkowska, S. Michlewska, A. Robaszekiewicz, Activity of Lysosomal ABCC3, ABCC5 and ABCC10 is Responsible for Lysosomal Sequestration of Doxorubicin and

- Paclitaxel-Oregongreen488 in Paclitaxel-Resistant Cancer Cell Lines., *Cell Physiol Biochem* 57 (2023) 360–378. <https://doi.org/10.33594/000000663>.
- [112] K. Howe, G.G. Gibson, T. Coleman, N. Plant, In silico and in vitro modeling of hepatocyte drug transport processes: importance of ABCC2 expression levels in the disposition of carboxydichlorofluorescein., *Drug Metab Dispos* 37 (2009) 391–399. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.022921>.
- [113] K. Gronkowska, S. Michlewska, T. Płoszaj, M. Strachowska, A. Stępień, M. Borowiec, A. Bednarek, A. Robaszkiewicz, BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel, *BioRxiv* (2025) 2025.05.01.651609. <https://doi.org/10.1101/2025.05.01.651609>.
- [114] K. Gronkowska, K. Kołacz-Milewska, S. Michlewska, T. Płoszaj, M. Borowiec, A. Robaszkiewicz, Interaction of HIF1A with BRG1 and p300 confers paclitaxel-induced drug resistance by enabling the overexpression of ABCC genes, *Molecular Therapy Oncology* (2025) 201049. <https://doi.org/10.1016/J.OMTON.2025.201049>.
- [115] N. Raj, L.D. Attardi, The Transactivation Domains of the p53 Protein, *Cold Spring Harb Perspect Med* 7 (2017) a026047. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A026047>.
- [116] Y.C. Liu, P.Y. Chang, C.C.K. Chao, CITED2 silencing sensitizes cancer cells to cisplatin by inhibiting p53 trans-activation and chromatin relaxation on the ERCC1 DNA repair gene, *Nucleic Acids Res* 43 (2015) 10760. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV934>.
- [117] C.R.R. Rocha, M.M. Silva, A. Quinet, J.B. Cabral-Neto, C.F.M. Menck, DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship, *Clinics* 73 (2018) e478s. <https://doi.org/10.6061/CLINICS/2018/E478S>.
- [118] L. Friedel, A. Loewer, The guardian's choice: how p53 enables context-specific decision-making in individual cells, *FEBS J* 289 (2022) 40–52. <https://doi.org/10.1111/FEBS.15767>.
- [119] A. Hafner, M.L. Bulyk, A. Jambhekar, G. Lahav, The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2019 20:4 20 (2019) 199–210. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0110-x>.
- [120] S. Peugeot, G. Selivanova, p53-Dependent Repression: DREAM or Reality?, *Cancers (Basel)* 13 (2021) 4850. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13194850>.
- [121] K.D. Sullivan, M.D. Galbraith, Z. Andrysiak, J.M. Espinosa, Mechanisms of transcriptional regulation by p53, *Cell Death & Differentiation* 2018 25:1 25 (2017) 133–143. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.174>.
- [122] K. Nesic, P. Parker, E.M. Swisher, J.J. Kraiss, DNA repair and the contribution to chemotherapy resistance, *Genome Medicine* 2025 17:1 17 (2025) 1–30. <https://doi.org/10.1186/S13073-025-01488-8>.
- [123] C.R.R. Rocha, M.M. Silva, A. Quinet, J.B. Cabral-Neto, C.F.M. Menck, DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship, *Clinics* 73 (2018) e478s. <https://doi.org/10.6061/CLINICS/2018/E478S>.

- [124] E. Abad, D. Graifer, A. Lyakhovich, DNA damage response and resistance of cancer stem cells, *Cancer Lett* 474 (2020) 106–117. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2020.01.008>.
- [125] Y. Zhao, Q. Li, J. Li, Y.F. Cui, Z. Lu, Expression and clinical significance of FANCI gene in pan-cancer: a comprehensive analysis based on multi-omics data, *Front Genet* 16 (2025) 1542888. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2025.1542888/BIBTEX>.
- [126] J. Shan, X. Wang, J. Zhao, XRCC2 reduced the sensitivity of NSCLC to radio-chemotherapy by arresting the cell cycle, *Am J Transl Res* 14 (2022) 3783. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9274602/> (accessed August 19, 2025).
- [127] Z. Wu, X. Miao, Y. Zhang, D. Li, Q. Zou, Y. Yuan, R. Liu, Z. Yang, XRCC1 Is a Promising Predictive Biomarker and Facilitates Chemo-Resistance in Gallbladder Cancer, *Front Mol Biosci* 7 (2020) 536266. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2020.00070/BIBTEX>.
- [128] J.A.F. Hannay, J. Liu, Q.S. Zhu, S. V. Bolshakov, L. Li, P.W.T. Pisters, A.J.F. Lazar, D. Yu, R.E. Pollock, D. Lev, Rad51 overexpression contributes to chemoresistance in human soft tissue sarcoma cells: a role for p53/activator protein 2 transcriptional regulation, *Mol Cancer Ther* 6 (2007) 1650–1660. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0636>.
- [129] M. Abdusamad, X. Guo, I. Ramirez, E.F. Velasquez, W. Cohn, A.A. Gholkar, J.P. Whitelegge, J.Z. Torres, C.E. Young, DUSP12 promotes cell cycle progression and protects cells from cell death by regulating ZPR9, (n.d.). <https://doi.org/10.1101/2025.01.13.632830>.
- [130] F. Zhou, L. Wang, K. Jin, Y. Wu, RecQ-like helicase 4 (RECQL4) exacerbates resistance to oxaliplatin in colon adenocarcinoma via activation of the PI3K/AKT signaling pathway, (2021). <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1964156>.
- [131] X. Yang, J. Wang, Y. Zhou, Y. Wang, S. Wang, W. Zhang, Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells, *Cancer Lett* 321 (2012) 137–143. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2012.01.030>.
- [132] M. Fischer, M.A. Sammons, Determinants of p53 DNA binding, gene regulation, and cell fate decisions, *Cell Death Differ* 31 (2024) 836–843. <https://doi.org/10.1038/S41418-024-01326-1>;TECHMETA=13,38,39;SUBJMETA=1244,200,208,631,67;KWRD=GENE+REGULATION,TUMOUR-SUPPRESSOR+PROTEINS.
- [133] M.A. Allen, Z. Andrysik, V.L. Dengler, H.S. Mellert, A. Guarnieri, J.A. Freeman, K.D. Sullivan, M.D. Galbraith, X. Luo, W. Lee Kraus, R.D. Dowell, J.M. Espinosa, Global analysis of p53-regulated transcription identifies its direct targets and unexpected regulatory mechanisms, *Elife* 2014 (2014). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.02200.001>.
- [134] T. Tan, G. Chu, p53 Binds and Activates the Xeroderma Pigmentosum DDB2 Gene in Humans but Not Mice, *Mol Cell Biol* 22 (2002) 3247. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.10.3247-3254.2002>.

- [135] I. Rodriguez-Pastrana, E. Birli, A.S. Coutts, p53-dependent DNA repair during the DNA damage response requires actin nucleation by JMY, *Cell Death & Differentiation* 2023 30:7 30 (2023) 1636–1647. <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01170-9>.
- [136] K. Wu, S.W. Jiang, F.J. Couch, p53 mediates repression of the BRCA2 promoter and down-regulation of BRCA2 mRNA and protein levels in response to DNA damage, *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003) 15652–15660. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211297200>.
- [137] Y. Xu, J. Zhang, X. Chen, The activity of p53 is differentially regulated by Brm- and Brg1-containing SWI/SNF chromatin remodeling complexes, *Journal of Biological Chemistry* 282 (2007) 37429–37435. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706039200>.
- [138] S.R. Naidu, I.M. Love, A.N. Imbalzano, S.R. Grossman, E.J. Androphy, The SWI/SNF chromatin remodeling subunit BRG1 is a critical regulator of p53 necessary for proliferation of malignant cells, *Oncogene* 28 (2009) 2492–2501. <https://doi.org/10.1038/ONC.2009.121>.
- [139] S. Fan, M.L. Smith, D.J.R. Ii, D. Duba, Q. Zhan, K.W. Kohn, A.J. Fornace, P.M. O’connor2, Disruption of p53 Function Sensitizes Breast Cancer MCF-7 Cells to Cisplatin and Pentoxifylline, *Cancer Res* 55 (1995) 1649–1654. <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/55/8/1649/2460342/cr0550081649.pdf> (accessed June 24, 2025).
- [140] K. Gronkowska, K. Kołacz-Milewska, S. Michlewska, A. Robaszkiewicz, P53 supresses transcription of the p300-E2F1-dependent gene subset by maintaining KDM5B associated with gene promoters, *BioRxiv* (2025) 2025.08.25.672089. <https://doi.org/10.1101/2025.08.25.672089>.
- [141] H. Kaljunen, S. Taavitsainen, R. Kaarijärvi, E. Takala, V. Paakinaho, M. Nykter, G.S. Bova, K. Ketola, Fanconi anemia pathway regulation by FANCI in prostate cancer, *Front Oncol* 13 (2023) 1260826. <https://doi.org/10.3389/FONC.2023.1260826/BIBTEX>.
- [142] K. Hinohara, H.J. Wu, S. Vigneau, T.O. McDonald, K.J. Igarashi, K.N. Yamamoto, T. Madsen, A. Fassl, S.B. Egri, M. Papanastasiou, L. Ding, G. Peluffo, O. Cohen, S.C. Kales, M. Lal-Nag, G. Rai, D.J. Maloney, A. Jadhav, A. Simeonov, N. Wagle, M. Brown, A. Meissner, P. Sicinski, J.D. Jaffe, R. Jeselsohn, A.A. Gimelbrant, F. Michor, K. Polyak, KDM5 histone demethylase activity links cellular transcriptomic heterogeneity to therapeutic resistance, *Cancer Cell* 34 (2018) 939. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2018.10.014>.
- [143] T. He, L. Xiao, Y. Qiao, O. Klingbeil, E. Young, X.S. Wu, R. Mannan, S. Mahapatra, E. Redin, H. Cho, Y. Bao, M. Kandarpa, J. Ching-Yi Tien, X. Wang, S. Eyunni, Y. Zheng, N.H. Kim, H. Zheng, S. Hou, F. Su, S.J. Miner, R. Mehra, X. Cao, C. Abbineni, S. Samajdar, M. Ramachandra, S.M. Dhanasekaran, M. Talpaz, A. Parolia, C.M. Rudin, C.R. Vakoc, A.M. Chinnaiyan, Targeting the mSWI/SNF complex in POU2F-POU2AF transcription factor-driven malignancies, *Cancer Cell* 42 (2024) 1336-1351.e9. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2024.06.006>.
- [144] P.S.Y. Chong, J.Y. Chooi, J.S.L. Lim, S.H.M. Toh, T.Z. Tan, W.J. Chng, SMARCA2 is a novel interactor of NSD2 and regulates prometastatic PTP4A3 through chromatin remodeling in t(4;14) multiple myeloma, *Cancer Res* 81 (2021) 2332–2344.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2946/654315/AM/SMARCA2-IS-A-NOVEL-INTERACTOR-OF-NSD2-AND>.

- [145] R. Rakesh, U.B. Chanana, S. Hussain, S. Sharma, K. Goel, D. Bisht, K. Patne, P.B. Swer, J.W. Hockensmith, R. Muthuswami, Altering mammalian transcription networking with ADAADi: An inhibitor of ATP-dependent chromatin remodeling, *PLoS One* 16 (2021) e0251354. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0251354>.
- [146] L. Duplaquet, K. So, A.W. Ying, S. Pal Choudhuri, X. Li, G.D. Xu, Y. Li, X. Qiu, R. Li, S. Singh, X.S. Wu, S. Hamilton, V.D. Chien, Q. Liu, J. Qi, T.D.D. Somerville, H.M. Heiling, E. Mazzola, Y. Lee, T. Zoller, C.R. Vakoc, J.G. Doench, W.C. Forrester, T. Abrams, H.W. Long, M.J. Niederst, B.J. Drapkin, C. Kadoch, M.G. Oser, Mammalian SWI/SNF complex activity regulates POU2F3 and constitutes a targetable dependency in small cell lung cancer, *Cancer Cell* 42 (2024) 1352-1369.e13. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2024.06.012/ASSET/0916D163-589A-499F-AB4A-36F455C19C32/MAIN.ASSETS/FX1.JPG>.
- [147] V. Reen, M. D'Ambrosio, P.P. Søgaard, K. Tyson, B.J. Leeke, I. Clément, I.C.A. Dye, J. Pombo, A. Kuba, Y. Lan, J. Burr, I.C. Bomann, M. Kalyva, J. Birch, S. Khadayate, G. Young, D. Provencher, A.M. Mes-Masson, S. Vernia, N. McGranahan, H.J.M. Brady, F. Rodier, R. Nativio, M. Percharde, I.A. McNeish, J. Gil, SMARCA4 regulates the NK-mediated killing of senescent cells, *Science Advances* 11 (2025). https://doi.org/10.1126/SCIADV.ADN2811/SUPPL_FILE/SCIADV.ADN2811_TABLES_S1_TO_S3_AND_S11.ZIP.
- [148] L. Xiao, A. Parolia, Y. Qiao, P. Bawa, S. Eyunni, R. Mannan, S.E. Carson, Y. Chang, X. Wang, Y. Zhang, J.N. Vo, S. Kregel, S.A. Simko, A.D. Delekta, M. Jaber, H. Zheng, I.J. Apel, L. McMurry, F. Su, R. Wang, S. Zelenka-Wang, S. Sasmal, L. Khare, S. Mukherjee, C. Abbineni, K. Aithal, M.S. Bhakta, J. Ghurye, X. Cao, N.M. Navone, A.I. Nesvizhskii, R. Mehra, U. Vaishampayan, M. Blanchette, Y. Wang, S. Samajdar, M. Ramachandra, A.M. Chinnaiyan, Targeting SWI/SNF ATPases in enhancer-addicted prostate cancer, *Nature* 2021 601:7893 601 (2021) 434–439. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04246-z>.
- [149] R. Muthuswami, L.A. Bailey, R. Rakesh, A.N. Imbalzano, J.A. Nickerson, J.W. Hockensmith, BRG1 is a prognostic indicator and a potential therapeutic target for prostate cancer, *J Cell Physiol* 234 (2019) 15194–15205. <https://doi.org/10.1002/JCP.28161;SUBPAGE:STRING:FULL>.
- [150] W. Farnaby, M. Koegl, M.J. Roy, C. Whitworth, E. Diers, N. Trainor, D. Zollman, S. Steurer, J. Karolyi-Oezguer, C. Riedmueller, T. Gmaschitz, J. Wachter, C. Dank, M. Galant, B. Sharps, K. Rumpel, E. Traxler, T. Gerstberger, R. Schnitzer, O. Petermann, P. Greb, H. Weinstabl, G. Bader, A. Zoephel, A. Weiss-Puxbaum, K. Ehrenhöfer-Wölfer, S. Wöhrle, G. Boehmelt, J. Rinnenthal, H. Arnhof, N. Wiechens, M.-Y. Wu, T. Owen-Hughes, P. Ettmayer, M. Pearson, D.B. McConnell, A. Ciulli, BAF complex vulnerabilities in cancer demonstrated via structure-based PROTAC design., *Nat Chem Biol* 15 (2019) 672–680. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0294-6>.
- [151] M.S.Z. Ansari, V. Stagni, A. Iuzzolino, D. Rotili, A. Mai, D. Del Bufalo, P. Lavia, F. Degrassi, D. Trisciuglio, Pharmacological targeting of CBP/p300 drives a redox/autophagy axis leading to senescence-induced growth arrest in non-small cell lung

- cancer cells, *Cancer Gene Ther* 30 (2023) 124–136. <https://doi.org/10.1038/S41417-022-00524-8>;TECHMETA=1,14,35,38,63,82;SUBJMETA=1612,631,67,80;KWRD=CELL+BIOLOGY,LUNG+CANCER.
- [152] H. Ono, T. Kato, Y. Murase, Y. Nakamura, Y. Ishikawa, S. Watanabe, K. Akahoshi, T. Ogura, K. Ogawa, D. Ban, A. Kudo, Y. Akiyama, S. Tanaka, H. Ito, M. Tanabe, C646 inhibits G2/M cell cycle-related proteins and potentiates anti-tumor effects in pancreatic cancer, *Sci Rep* 11 (2021) 10078. <https://doi.org/10.1038/S41598-021-89530-8>.
- [153] Y.-M. Wang, M.-L. Gu, F.-S. Meng, W.-R. Jiao, X.-X. Zhou, H.-P. Yao, F. Ji, Histone acetyltransferase p300/CBP inhibitor C646 blocks the survival and invasion pathways of gastric cancer cell lines., *Int J Oncol* 51 (2017) 1860–1868. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4176>.
- [154] L.M. Lasko, C.G. Jakob, R.P. Edalji, W. Qiu, D. Montgomery, E.L. Digiammarino, T.M. Hansen, R.M. Risi, R. Frey, V. Manaves, B. Shaw, M. Algire, P. Hessler, L.T. Lam, T. Uziel, E. Faivre, D. Ferguson, F.G. Buchanan, R.L. Martin, M. Torrent, G.G. Chiang, K. Karukurichi, J.W. Langston, B.T. Weinert, C. Choudhary, P. De Vries, J.H. Van Drie, D. McElligott, E. Kesicki, R. Marmorstein, C. Sun, P.A. Cole, S.H. Rosenberg, M.R. Michaelides, A. Lai, K.D. Bromberg, Discovery of a selective catalytic p300/CBP inhibitor that targets lineage-specific tumours, *Nature* 2017 550:7674 550 (2017) 128–132. <https://doi.org/10.1038/nature24028>.
- [155] C. Ji, W. Xu, H. Ding, Z. Chen, C. Shi, J. Han, L. Yu, N. Qiao, Y. Zhang, X. Cao, X. Zhou, H. Cheng, H. Feng, C. Luo, Z. Li, B. Zhou, Z. Ye, Y. Zhao, The p300 Inhibitor A-485 Exerts Antitumor Activity in Growth Hormone Pituitary Adenoma, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 107 (2022) E2291–E2300. <https://doi.org/10.1210/CLINEM/DGAC128>.
- [156] X.N. Gao, J. Lin, Q.Y. Ning, L. Gao, Y.S. Yao, J.H. Zhou, Y.H. Li, L.L. Wang, L. Yu, A Histone Acetyltransferase p300 Inhibitor C646 Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis Selectively in AML1-ETO-Positive AML Cells, *PLoS One* 8 (2013) e55481. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0055481>.
- [157] S. Picaud, O. Fedorov, A. Thanasopoulou, K. Leonards, K. Jones, J. Meier, H. Olzscha, O. Monteiro, S. Martin, M. Philpott, A. Tumber, P. Filippakopoulos, C. Yapp, C. Wells, K.H. Che, A. Bannister, S. Robson, U. Kumar, N. Parr, K. Lee, D. Lugo, P. Jeffrey, S. Taylor, M.L. Vecellio, C. Bountra, P.E. Brennan, A. O'Mahony, S. Velichko, S. Muller, D. Hay, D.L. Daniels, M. Urh, N.B. La Thangue, T. Kouzarides, R. Prinjha, J. Schwaller, S. Knapp, Generation of a selective small molecule inhibitor of the CBP/p300 bromodomain for Leukemia therapy, *Cancer Res* 75 (2015) 5106–5119. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0236/651879/AM/GENERATION-OF-A-SELECTIVE-SMALL-MOLECULE-INHIBITOR>.
- [158] F.A. Romero, J. Murray, K.W. Lai, V. Tsui, B.K. Albrecht, L. An, M.H. Beresini, G. De Leon Boenig, S.M. Bronner, E.W. Chan, K.X. Chen, Z. Chen, E.F. Choo, K. Clagg, K. Clark, T.D. Crawford, P. Cyr, D. De Almeida Nagata, K.E. Gascoigne, J.L. Grogan, G. Hatzivassiliou, W. Huang, T.L. Hunsaker, S. Kaufman, S.G. Koenig, R. Li, Y. Li, X. Liang, J. Liao, W. Liu, J. Ly, J. Maher, C. Masui, M. Merchant, Y. Ran, A.M. Taylor, J. Wai, F. Wang, X. Wei, D. Yu, B.Y. Zhu, X. Zhu, S. Magnuson, GNE-781, A Highly

Advanced Potent and Selective Bromodomain Inhibitor of Cyclic Adenosine Monophosphate Response Element Binding Protein, Binding Protein (CBP), *J Med Chem* 60 (2017) 9162–9183.
https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.7B00796/SUPPL_FILE/JM7B00796_SI_002.CSV.

- [159] L. Nicosia, G.J. Spencer, N. Brooks, F.M.R. Amaral, N.J. Basma, J.A. Chadwick, B. Revell, B. Wingelhofer, A. Maiques-Diaz, O. Sinclair, F. Camera, F. Ciceri, D.H. Wiseman, N. Pegg, W. West, T. Knurowski, K. Frese, K. Clegg, V.L. Campbell, J. Cavet, M. Copland, E. Searle, T.C.P. Somerville, Therapeutic targeting of EP300/CBP by bromodomain inhibition in hematologic malignancies, *Cancer Cell* 41 (2023) 2136-2153.e13. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2023.11.001/ATTACHMENT/0057F4DA-14CE-4A0D-B049-8C808F98C71C/MMC5.PDF>.
- [160] A.R. Conery, R.C. Centore, A. Neiss, P.J. Keller, S. Joshi, K.L. Spillane, P. Sandy, C. Hatton, E. Pardo, L. Zawadzke, A. Bommi-Reddy, K.E. Gascoigne, B.M. Bryant, J.A. Mertz, R.J. Sims, Bromodomain inhibition of the transcriptional coactivators CBP/EP300 as a therapeutic strategy to target the IRF4 network in multiple myeloma, *Elife* 5 (2016) e10483. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.10483>.
- [161] Study Details | FHD-286 as Monotherapy or Combination Therapy in Subjects With Advanced Hematologic Malignancies | [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov), (n.d.).
<https://clinicaltrials.gov/study/NCT04891757?cond=cancer&intr=FHD-286&rank=2> (accessed August 23, 2025).
- [162] Study Details | Dual BET and CBP/p300 Inhibitor in Patients With Targeted Advanced Solid Tumors and Hematological Malignancies | [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov), (n.d.).
<https://clinicaltrials.gov/study/NCT05488548?cond=Cancer&intr=p300%20inhibitor&rank=1> (accessed August 23, 2025).
- [163] Study Details | Open-Label Study of Pöcenbrodib Alone and in Combination With Abiraterone Acetate, Olaparib, or 177Lu-PSMA-617 | [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov), (n.d.).
<https://clinicaltrials.gov/study/NCT06785636?cond=Cancer&intr=p300%20inhibitor&rank=2> (accessed August 23, 2025).
- [164] Study Details | Study to Evaluate CCS1477 (Inobrodib) in Haematological Malignancies | [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov), (n.d.).
<https://clinicaltrials.gov/study/NCT04068597?cond=cancer&intr=Inobrodib&rank=2> (accessed August 23, 2025).
- [165] B. M. F. Gonçalves, D. S. P. Cardoso, M.-J. U. Ferreira, Overcoming Multidrug Resistance: Flavonoid and Terpenoid Nitrogen-Containing Derivatives as ABC Transporter Modulators, *Molecules* 25 (2020).
<https://doi.org/10.3390/molecules25153364>.
- [166] Z. Chen, T. Shi, L. Zhang, P. Zhu, M. Deng, C. Huang, T. Hu, L. Jiang, J. Li, Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade., *Cancer Lett* 370 (2016) 153–164.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.010>.

- [167] H.-H. Zhang, J. Xiang, B.-C. Yin, B.-C. Ye, Overcoming Multidrug Resistance by Base-Editing-Induced Codon Mutation, *ACS Pharmacol Transl Sci* 6 (2023) 812–819. <https://doi.org/10.1021/acspsci.3c00037>.
- [168] Y. Garcia-Mayea, C. Mir, F. Masson, R. Paciucci, M.E. LLeonart, Insights into new mechanisms and models of cancer stem cell multidrug resistance., *Semin Cancer Biol* 60 (2020) 166–180. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.022>.
- [169] L. Xiang, Y. Wang, J. Lan, F. Na, S. Wu, Y. Gong, H. Du, B. Shao, G. Xie, HIF-1-dependent heme synthesis promotes gemcitabine resistance in human non-small cell lung cancers via enhanced ABCB6 expression., *Cell Mol Life Sci* 79 (2022) 343. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04360-9>.
- [170] J. Xie, D.-W. Li, X.-W. Chen, F. Wang, P. Dong, Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 α and MDR1/P-glycoprotein in laryngeal carcinoma tissue and hypoxic Hep-2 cells., *Oncol Lett* 6 (2013) 232–238. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1321>.
- [171] J. Chen, Z. Ding, Y. Peng, F. Pan, J. Li, L. Zou, Y. Zhang, H. Liang, HIF-1 α Inhibition Reverses Multidrug Resistance in Colon Cancer Cells via Downregulation of MDR1/P-Glycoprotein, *PLoS One* 9 (2014) e98882.
- [172] Y. Lv, S. Zhao, J. Han, L. Zheng, Z. Yang, L. Zhao, Hypoxia-inducible factor-1 α induces multidrug resistance protein in colon cancer., *Onco Targets Ther* 8 (2015) 1941–1948. <https://doi.org/10.2147/OTT.S82835>.
- [173] S. Doublier, D.C. Belisario, M. Polimeni, L. Annaratone, C. Riganti, E. Allia, D. Ghigo, A. Bosia, A. Sapino, HIF-1 activation induces doxorubicin resistance in MCF7 3-D spheroids via P-glycoprotein expression: a potential model of the chemo-resistance of invasive micropapillary carcinoma of the breast, *BMC Cancer* 12 (2012) 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-4>.
- [174] B.P. Bui, P.L. Nguyen, K. Lee, J. Cho, Hypoxia-Inducible Factor-1: A Novel Therapeutic Target for the Management of Cancer, Drug Resistance, and Cancer-Related Pain., *Cancers (Basel)* 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/cancers14246054>.
- [175] L. Roncuzzi, F. Pancotti, N. Baldini, Involvement of HIF-1 α activation in the doxorubicin resistance of human osteosarcoma cells., *Oncol Rep* 32 (2014) 389–394. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3181>.
- [176] S.D. Nath, M.T. Hossain Tanim, M.M.H. Akash, M. Golam Mostafa, A.A. Sajib, Co-expression of HIF1A with multi-drug transporters (P-GP, MRP1, and BCRP) in chemoresistant breast, colorectal, and ovarian cancer cells, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 23 (2025) 100496. <https://doi.org/10.1016/J.JGEB.2025.100496>.
- [177] R.A. Qannita, A.I. Alalami, A.A. Harb, S.M. Aleidi, J. Taneera, E. Abu-Gharbieh, W. El-Huneidi, M.A. Saleh, K.H. Alzoubi, M.H. Semreen, M. Hudaib, Y. Bustanji, Targeting Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) in Cancer: Emerging Therapeutic Strategies and Pathway Regulation, *Pharmaceuticals* 17 (2024). <https://doi.org/10.3390/ph17020195>.

- [178] Study Details | A Phase 3 Study of Ganetespib in Combination With Docetaxel Versus Docetaxel Alone in Patients With Advanced NSCLC | ClinicalTrials.gov, (n.d.). <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01798485> (accessed August 26, 2025).
- [179] H. Ono, M.D. Basson, H. Ito, P300 inhibition enhances gemcitabine-induced apoptosis of pancreatic cancer., *Oncotarget* 7 (2016) 51301–51310. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10117>.
- [180] S. Zheng, X.Y. Koh, H.C. Goh, S.A.B. Rahmat, L.A. Hwang, D.P. Lane, Inhibiting p53 acetylation reduces cancer chemotoxicity, *Cancer Res* 77 (2017) 4342–4354. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0424/652818/AM/INHIBITING-P53-ACETYLATION-REDUCES-CANCER>.
- [181] C. Yang, Y. Wang, M.M. Sims, Y. He, D.D. Miller, L.M. Pfeffer, Targeting the Bromodomain of BRG-1/BRM Subunit of the SWI/SNF Complex Increases the Anticancer Activity of Temozolomide in Glioblastoma, *Pharmaceuticals* 2021, Vol. 14, Page 904 14 (2021) 904. <https://doi.org/10.3390/PH14090904>.
- [182] C. Yang, Y. He, Y. Wang, P.J. McKinnon, V. Shahani, D.D. Miller, L.M. Pfeffer, Next-generation bromodomain inhibitors of the SWI/SNF complex enhance DNA damage and cell death in glioblastoma, *J Cell Mol Med* 27 (2023) 2770–2781. <https://doi.org/10.1111/JCMM.17907>.
- [183] D. Lee, D.Y. Lee, Y.S. Hwang, H.R. Seo, S.A. Lee, J. Kwon, The bromodomain inhibitor PFI-3 sensitizes cancer cells to DNA damage by targeting SWI/SNF, *Molecular Cancer Research* 19 (2021) 900–912. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-20-0289/81750/AM/THE-BROMODOMAIN-INHIBITOR-PFI-3-SENSITIZES-CANCER>.
- [184] X. Li, H. Yang, S. Huang, Y. Qiu, Histone deacetylase 1 and p300 can directly associate with chromatin and compete for binding in a mutually exclusive manner., *PLoS One* 9 (2014) e94523. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094523>.
- [185] P. Rajkumar, B.S. Mathew, S. Das, R. Isaiah, S. John, R. Prabha, D.H. Fleming, Cisplatin Concentrations in Long and Short Duration Infusion: Implications for the Optimal Time of Radiation Delivery, *J Clin Diagn Res* 10 (2016) XC01. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/18181.8126>.
- [186] Y. Ohguchi, H. Ohguchi, Diverse Functions of KDM5 in Cancer: Transcriptional Repressor or Activator?, *Cancers (Basel)* 14 (2022) 3270. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14133270>.
- [187] R. He, B. Xhabija, L.K. Gopi, J.T. Kurup, Z. Xu, Z. Liu, B.L. Kidder, H3K4 demethylase KDM5B regulates cancer cell identity and epigenetic plasticity, *Oncogene* 41 (2022) 2958–2972. <https://doi.org/10.1038/S41388-022-02311-Z>;TECHMETA=13,15,31,45,91;SUBJMETA=103,631,67,69,80;KWRD=CANCER+GENOMICS,CHROMOSOMES.
- [188] R. Dsouza, M. Jain, E. Khattar, p53-deficient cancer cells hyperactivate DNA double-strand break repair pathways to overcome chemotherapeutic damage and augment survival, *Mol Biol Rep* 52 (2025) 1–15. <https://doi.org/10.1007/S11033-025-10434-1/FIGURES/6>.

Streszczenie pracy doktorskiej w języku polskim

Tytuł pracy: „Rola kompleksu SWI/SNF-EP300 w powstawaniu oporności komórek nowotworowych na chemioterapię”

Nowotwory stanowią poważny problem zdrowia publicznego na całym świecie. Zgodnie z najnowszymi danymi projektu GLOBOCAN, zachorowalność na raka wyniosła około 20 milionów w 2022 r., a śmiertelność z powodu raka 9,7 miliona, klasyfikując nowotwory jako drugą najczęstszą przyczyną zgonów na świecie. Ponadto, statystyki przewidują wzrost zachorowalności na raka w nadchodzących dziesięcioleciach. Szacuje się, że w 2045 r. zdiagnozowanych zostanie 32,6 miliona nowych przypadków.

Znaczna część nowotworów charakteryzuje się wysoką śmiertelnością pomimo dostępności różnorodnych metod leczenia, takich jak chirurgia, radioterapia, chemioterapia i terapie celowane. Terapie kombinowane stanowią standard obecnych terapii przeciwnowotworowych i dotyczą wszystkich schematów leczenia. Połączenie terapii jest atrakcyjne z klinicznego punktu widzenia z kilku powodów: terapia skojarzona poprawia wyniki leczenia i zapewnia lepsze efekty terapeutyczne, zwłaszcza gdy osiąga się synergiczne działanie przeciwnowotworowe; podejście skojarzone pozwala przezwyciężyć heterogenność klonalną, co dodatkowo wiąże się z poprawą wskaźników odpowiedzi; skojarzone schematy leczenia zmniejszają toksyczność terapii, ponieważ umożliwiają stosowanie poszczególnych leków w zmniejszonych dawkach przy zachowaniu skuteczności terapeutycznej; terapie skojarzone ograniczają występowanie oporności na leki poprzez eliminację mechanizmów komórkowych związanych z opornością adaptacyjną. Ponieważ oporności na terapie towarzyszą genetyczne i epigenetyczne zmiany w komórkach rakowych, zastosowanie terapii kombinowanych z udziałem regulatorów epigenetycznych wydaje się obiecującym rozwiązaniem. Modyfikacje epigenetyczne są elastyczne i dynamiczne, co czyni je atrakcyjnymi celami terapeutycznymi, które mogą pomóc uzyskać preferowany profil transkryptomu w komórkach rakowych.

Acetylotransferaza histonowa p300 (kodowana przez gen *EP300*) jest jedną z najczęściej zaburzonych acetylotransferaz w nowotworach. Aktywność tego białka jest ściśle związana z acetylacją H3K27 w miejscach wzmacniaczy. Wykazano związek pogorszenia ogólnego wskaźnika przeżycia u pacjentów z wysoką ekspresją *EP300*, co może mieć związek z obniżeniem skuteczności terapii u tych pacjentów. Coraz więcej dowodów eksperymentalnych wskazuje, że lekooporność nowotworów może być warunkowana aktywnością p300. Sekwencje promotorowe transporterów ABC, które ulegają nadekspresji w liniach komórkowych raka piersi i płuc opornych na cisplatynę i odpowiadają za usuwanie leków z tych komórek, charakteryzują się wyższym poziomem acetylacji nukleosomów, katalizowanej przez p300. p300 odgrywa też ważną rolę w naprawie DNA, ponieważ jest rekrutowane do miejsc pęknięć DNA, gdzie ułatwia naprawę uszkodzeń poprzez działanie jako kofaktor i moduł wiążący dla wielu białek biorących udział w szlakach naprawy DNA.

Acetylacja ogonów histonu H3, regulowana między innymi przez p300 zwiększa powinowactwo kompleksu SWI/SNF do nukleosomów. Kompleks SWI/SNF uczestniczy w mobilizacji nukleosomów, przez co promuje lub hamuje ekspresję określonych genów. Jako główne składniki kompleksu można wyróżnić ATPazy, BRG1 i BRM. Domeny ATPazy BRG1 i BRM pośredniczą w wiązaniu nukleosomów i umożliwiają ich przesuwanie, usuwanie i wstawianie poprzez hydrolizę ATP. Strukturalnie BRG1 i BRM są bardzo podobne, ale mogą wykazywać funkcje tkankowo-specyficzne. Zmiany w ekspresji określonych podjednostek SWI/SNF mogą być uznawane za markery prognostyczne przeżycia. Ponadto, związek niektórych elementów kompleksu SWI/SNF z opornością na chemioterapię i terapię celowaną został wykazany.

Celem badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej było poznanie roli kompleksu SWI/SNF- p300 w powstawaniu zjawiska oporności nowotworów związanego:

- 1) z nadekspresją frakcji transporterów ABC, która wzrasta w lizosomach, powodując zwiększoną akumulację leków w tych organellach
- 2) ze wzrostem ekspresji genów funkcjonalnie powiązanych z odpowiedzią na uszkodzenia DNA, wywołanym aktywacją ścieżki ATM/ATR-Chk1/Chk2-p53

W pierwszej części pracy skupiłam się na problemie zwiększonej ekspresji transporterów ABC, które usuwając lub sekwestrując leki w organellach przyczyniają się do niepowodzenia terapii. Przedstawiłam dowody eksperymentalne na udział BRG1 i p300 w kontroli transkrypcyjnej genów *ABCC*, które ulegają nadekspresji w liniach komórkowych opornych na paklitaksel. W szczególności skupiłam się na wpływie enzymów remodelujących chromatynę na transkrypcję genów *ABCC3*, *ABCC5* i *ABCC10*, gdyż ich produkty są wzbogacane w lizosomach komórek opornych na paklitaksel. Analiza funkcjonalna tych trzech białek występujących w lizosomach ujawniła ich rolę w sekwestracji doksorubicyny i paklitakselu (OregonGreen), a zatem te transportery błonowe są zdolne do ograniczania cytotoksyczności przynajmniej niektórych leków stosowanych w chemioterapii. Aktywne promotory tych genów charakteryzują się trimetylacją H3K4 i występowaniem BRG1, p300 i ich koregulatora HIF1A. Wykazałam również, że hamowanie SWI/SNF za pomocą PFI3 lub degradacja ATPaz SWI/SNF za pomocą PROTAC, inhibicja p300 za pomocą C646 oraz wyciszenie HIF1A istotnie zwiększa toksyczność leków poprzez jednoczesną redukcję kilku transporterów ABC w fenotypach opornych na paklitaksel. Na podstawie danych zdeponowanych w bazach TCGA/GTEX dostarczyłam dowodów na to, że wysoka ekspresja *EP300*, *SMARCA4* i *HIF1A* może służyć jako marker prognostyczny odpowiedzi pacjentek z rakiem piersi na chemioterapię z udziałem taksanów. Jednocześnie wysoka transkrypcja *HIF1A*, *EP300* i *SMARCA4* może mieć znaczenie kliniczne i wpływać na wyniki leczenia. Dlatego ilościowa ocena profilu ich ekspresji może pomóc w podjęciu decyzji o schemacie leczenia, zastąpieniu chemioterapii lub

skojarzeniu leków chemioterapeutycznych z inhibitorami ABCC lub inhibitorami BRG1, p300 czy HIF1A.

W kolejnej części pracy, skupiłam się na mechanizmie związanym z opornością na lek wywołujący uszkodzenia DNA - cisplatynę. Wykazałam, że aktywacja szlaku ATM/ATR-Chk1/Chk2-p53 przez cisplatynę nie wpływa znacząco na poziom p300 wewnątrz komórki, ale nasila interakcję p300 z chromatyną, szczególnie z promotorami genów kontrolowanych przez E2F1, w których p53 pełni funkcję represora transkrypcji. Promotory wyciszane przez p53 w komórkach proliferujących charakteryzowały się stosunkowo wysoką gęstością nukleosomów, niską acetylacją H3K27 i trimetylacją H3K4. Indukcja szlaku ATM/ATR-Chk1/2-p53 przez subletalne dawki cisplatyny powodowała uwolnienie p53 z promotorów opisywanych genów, któremu towarzyszyły również uwolnienie KDM5B, i wzrost acetylacji reszt histonowych umożliwiającą transkrypcję zależną od aktywności p300 i SWI/SNF. W naszych eksperymentach zarówno, inhibicja p300 za pomocą C646 oraz ATPaz kompleksu SWI/SNF za pomocą PFI3 obniżała ekspresję genów aktywowanych cisplatyną oraz uwrażliwiała komórki nowotworowe na działanie niskich stężeń cisplatyny. Odłączeniu p53 pod wpływem cisplatyny towarzyszyło również uwolnienie KDM5B i aktywacja ekspresji genów. KDM5B i p53 pełniły zatem funkcję represorów tych genów. Warto rozważyć również obniżenie ekspresji i inaktywujące mutacje *TP53* oraz *KDM5B* jako biomarkery zwiększonej ekspresji tych genów, które mogą predysponować do występowania oporności na leki wywołujące uszkodzenia DNA. Inaktywacja lub niska ekspresja tych białek może być przesłanką sugerującą wykorzystanie innego podejścia terapeutycznego niż zastosowanie terapii wywołującej uszkodzenia DNA lub wykorzystanie inhibitorów SWI/SNF lub p300 jako uwrażliwiaczy na chemioterapię.

Wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy sugerują, że zastosowanie inhibitorów SWI/SNF może uwrażliwiać komórki na działanie chemioterapii jak również odwracać istniejący już fenotyp oporny poprzez regulowanie transkrypcji niektórych genów z rodziny ABC i genów związanych z odpowiedzią na uszkodzenia DNA. Stosowanie kombinacji inhibitor + lek zwiększa cytotoksyczność leku umożliwiając stosowanie niższych dawek co potencjalnie może się wiązać ze zwiększeniem efektywności terapii i zmniejszeniem skutków ubocznych. Wymagane są jednak dalsze badania, które zweryfikują możliwości zastosowania takich terapii kombinowanych *in vivo*.

Streszczenie pracy doktorskiej w języku angielskim

Title of the thesis: The role of SWI/SNF-EP300 complex in the development of cancer cell resistance to chemotherapy

Cancer is a significant public health issue worldwide. According to the most recent data from the GLOBOCAN project, cancer incidence was approximately 20 million in 2022, with cancer mortality at 9.7 million, ranking cancer as the second leading cause of death globally. Furthermore, statistics predict an increase in cancer incidence in the coming decades. It is estimated that 32.6 million new cases will be diagnosed in 2045.

A significant proportion of cancers are characterised by high mortality rates despite the availability of various treatment methods, such as surgery, radiotherapy, chemotherapy and targeted therapies. Combination therapies are the standard of current cancer treatments and apply to all treatment regimens. The combination of therapies is attractive from a clinical point of view for several reasons: combination therapy improves treatment outcomes and provides better therapeutic effects, especially when synergistic anticancer effects are achieved; the combination approach overcomes clonal heterogeneity, which is further associated with improved response rates; combination treatment regimens reduce the toxicity of therapy, as they allow individual drugs to be used in reduced doses while maintaining therapeutic efficacy; combination therapies reduce the incidence of drug resistance by eliminating cellular mechanisms associated with adaptive resistance. Since resistance to therapies is accompanied by genetic and epigenetic changes in cancer cells, the use of combination therapies involving epigenetic regulators appears to be a promising solution. Epigenetic modifications are flexible and dynamic, making them attractive therapeutic targets that can help achieve the desired transcriptome profile in cancer cells.

Histone acetyltransferase p300 (encoded by the *EP300* gene) is one of the most frequently dysregulated acetyltransferases in cancer. The activity of this protein is closely related to H3K27 acetylation at enhancer sites. A correlation has been demonstrated between a decreased overall survival rate in patients with high EP300 expression, which may be related to reduced treatment efficacy in these patients. Increasing experimental evidence indicates that drug resistance in tumours may be determined by p300 activity. The promoter sequences of ABC transporters, which are overexpressed in cisplatin-resistant breast and lung cancer cell lines and are responsible for the removal of drugs from these cells, are characterised by higher levels of nucleosome acetylation catalysed by p300. p300 also plays an important role in DNA repair, as it is recruited to DNA break sites, where it facilitates damage repair by acting as a cofactor and binding module for many proteins involved in DNA repair pathways.

Acetylation of histone H3 tails, regulated among others by p300, increases the affinity of the SWI/SNF complex to nucleosomes. The SWI/SNF complex participates in the mobilisation of nucleosomes, thereby promoting or inhibiting the expression of specific genes. The main components of the complex include ATPases, BRG1 and BRM. The ATPase domains of BRG1 and BRM mediate the binding of nucleosomes and enable

their movement, removal and insertion through ATP hydrolysis. Structurally, BRG1 and BRM are very similar, but may exhibit tissue-specific functions. Changes in the expression of specific SWI/SNF subunits may be considered prognostic markers of survival. In addition, a link between certain components of the SWI/SNF complex and resistance to chemotherapy and targeted therapies has been demonstrated.

The aim of the research carried out as thesis project was to investigate the role of the SWI/SNF-p300 complex in the development of cancer resistance associated with:

- 1) overexpression of ABC transporter fractions, which increases in lysosomes, causing increased accumulation of drugs in these organelles
- 2) an increase in the expression of genes functionally related to the response to DNA damage, caused by the activation of the ATM/ATR-Chk1/Chk2-p53 pathway

In the first part of my thesis, I focused on the problem of increased expression of ABC transporters, which contribute to treatment failure by removing or sequestering drugs in organelles. I presented experimental evidence for the involvement of BRG1 and p300 in the transcriptional control of ABCC genes, which are overexpressed in paclitaxel-resistant cell lines. In particular, I focused on the influence of chromatin remodelling enzymes on the transcription of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 genes, as their products are enriched in the lysosomes of paclitaxel-resistant cells. Functional analysis of these three lysosomal proteins revealed their role in the sequestration of doxorubicin and paclitaxel (OregonGreen), and thus these membrane transporters are capable of reducing the cytotoxicity of at least some drugs used in chemotherapy. The active promoters of these genes are characterised by H3K4 trimethylation and the presence of BRG1, p300 and their co-regulator HIF1A. I also demonstrated that inhibition of SWI/SNF using PFI3 or degradation of SWI/SNF ATPases using PROTAC, inhibition of p300 using C646, and silencing of HIF1A significantly increase drug toxicity through the simultaneous reduction of several ABC transporters in paclitaxel-resistant phenotypes. Based on data deposited in the TCGA/GTEX databases, I provided evidence that high expression of EP300, SMARCA4, and HIF1A may serve as a prognostic marker of response to taxane-based chemotherapy in breast cancer patients. At the same time, high transcription of HIF1A, EP300 and SMARCA4 may be clinically relevant and affect treatment outcomes. Therefore, quantitative assessment of their expression profile may help in deciding on a treatment regimen, replacing chemotherapy or combining chemotherapeutic drugs with ABCC inhibitors or BRG1, p300 or HIF1A inhibitors.

In the second part of my work, I focused on the mechanism related to resistance to cisplatin, a drug that causes DNA damage. I demonstrated that the activation of the ATM/ATR-Chk1/Chk2-p53 pathway by cisplatin does not significantly affect the level of p300 inside the cell, but intensifies the interaction of p300 with chromatin, especially with the promoters of genes controlled by E2F1, in which p53 acts as a transcription repressor. Promoters silenced by p53 in proliferating cells were characterised by relatively high nucleosome density, low H3K27 acetylation and H3K4 trimethylation. Induction of the ATM/ATR-Chk1/2-p53 pathway by sublethal doses of cisplatin caused the release of

p53 from the promoters of the described genes, which was also accompanied by the release of KDM5B and an increase in histone acetylation, enabling p300- and SWI/SNF-dependent transcription. In our experiments, both inhibition of p300 with C646 and inhibition of SWI/SNF complex ATPase with PFI3 reduced the expression of cisplatin-activated genes and sensitised cancer cells to low concentrations of cisplatin. The disassociation of p53 under the influence of cisplatin was also accompanied by the release of KDM5B and the activation of gene expression. KDM5B and p53 therefore acted as repressors of these genes. It is worth considering the reduction in expression and inactivating mutations of TP53 and KDM5B as biomarkers of increased expression of these genes, which may predispose to resistance to DNA-damaging drugs. Inactivation or low expression of these proteins may be an indication for a therapeutic approach other than DNA-damaging therapy or the use of SWI/SNF or p300 inhibitors as chemotherapeutic sensitizers.

The results presented in this study suggest that the use of SWI/SNF inhibitors may sensitise cells to chemotherapy and reverse an existing resistant phenotype by regulating the transcription of certain ABC family genes and genes associated with the response to DNA damage. The use of an inhibitor + drug combination increases the cytotoxicity of the drug, allowing lower doses to be used, which could potentially increase the effectiveness of the therapy and reduce side effects. However, further studies are needed to verify the potential of such combination therapies *in vivo*.

Genetic dysregulation of EP300 in cancers in light of cancer epigenome control – targeting of p300-proficient and -deficient cancers

Karolina Gronkowska^{1,2} and Agnieszka Robaszekiewicz¹

¹Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland; ²Bio-Med-Chem Doctoral School of the University of Lodz and Lodz Institutes of the Polish Academy of Sciences, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland

Some cancer types including bladder, cervical, and uterine cancers are characterized by frequent mutations in EP300 that encode histone acetyltransferase p300. This enzyme can act both as a tumor suppressor and oncogene. In this review, we describe the role of p300 in cancer initiation and progression regarding EP300 aberrations that have been identified in TCGA Pan-Cancer Atlas studies and we also discuss possible anticancer strategies that target EP300 mutated cancers. Copy number alterations, truncating mutations, and abnormal EP300 transcriptions that affect p300 abundance and activity are associated with several pathological features such as tumor grading, metastases, and patient survival. Elevated EP300 correlates with a higher mRNA level of other epigenetic factors and chromatin remodeling enzymes that co-operate with p300 in creating permissive conditions for malignant transformation, tumor growth and metastases. The status of EP300 expression can be considered as a prognostic marker for anti-cancer immunotherapy efficacy, as EP300 mutations are followed by an increased expression of PDL-1. HAT activators such as CTB or YF2 can be applied for p300-deficient patients, whereas the natural and synthetic inhibitors of p300 activity, as well as dual HAT/bromodomain inhibitors and the PROTAC degradation of p300, may serve as strategies in the fight against p300-fueled cancers.

INTRODUCTION

Cancer is considered a complex disease, being a multistep process associated with the accumulation of genetic alterations. However, it is now widely accepted that non-genetic factors also contribute to cancer development and progression,¹ represented by *inter alia* epigenetic mechanisms that alter gene expression patterns without changing the DNA sequence. Epigenetic changes can be divided into three main categories: the modification of nucleic acids (such as DNA methylation), post-translational modifications (PTMs) of histone tails, and the alteration of gene expression by non-coding RNAs (e.g., microRNAs [miRNAs] and long non-coding RNAs [lncRNAs]).² The first two groups represent the covalent modifications of nucleotides and amino acid residues, usually working together to integrate regulatory inputs and leading to coordinated alteration in chromatin structure and function. This defines the cell

transcriptomes at the earliest step of RNA synthesis. The existence of many combinations of modifications that are either more likely to occur together, or mutually exclusive, suggest a functional crosstalk between some epigenetic marks. This can occur between modified DNA and histones, distinct modifications on the same histone tail, on neighboring histones within the same nucleosome, or on neighboring nucleosomes in a chromatin domain. Well-described modifications include acetylation, methylation, phosphorylation, ADP-ribosylation, ubiquitination, citrullination, and SUMOylation,³ which regulate the nucleosome structure and dynamics by directly altering histone-histone or DNA-histone interactions and by recruiting chromatin remodeling enzymes resulting in positive and negative feedback loops.^{4,5} Various histone modifications that are altered by aberrantly expressed modifier enzymes contribute to tumor development, progression, and metastasis. Among them, altered histone acetylation is most frequently referred to.⁶ This modification usually marks active transcription, as it neutralizes the positive charge on the histone lysine residues, thereby facilitating nucleosome disassembly and increases the chromatin accessibility for RNA polymerase and transcription factors, initiating or enhancing ongoing transcription.^{4,7} Histone tail acetylation level is dynamically adjusted in different physiological conditions, with the required balance being controlled by the action of two enzyme families: histone acetyl transferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs). HATs catalyze the transfer of an acetyl group from acetyl-CoA molecules to the lysine ϵ -amino groups in the N-terminal tails of histones, whereas the HDACs remove the acetyl groups, thus working as repressors of gene expression.⁸ H3/H4 acetylation is mediated by other PTMs, such as active chromatin methylation marks—H3K4me3 and H3K4me1—which do not alter the histone charge but recruit HATs and other chromatin modifiers to specific chromatin sites^{5,9,10}; and, vice versa, H3K27ac in the promoter region may lead to H3K4me3 enrichment and transcriptional activation.¹¹ Active and repressive chromatin marks are summarized in [Figure 1](#).

<https://doi.org/10.1016/j.omton.2024.200871>

Correspondence: Agnieszka Robaszekiewicz, Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland.

E-mail: agnieszka.robaszekiewicz@biol.uni.lodz.pl



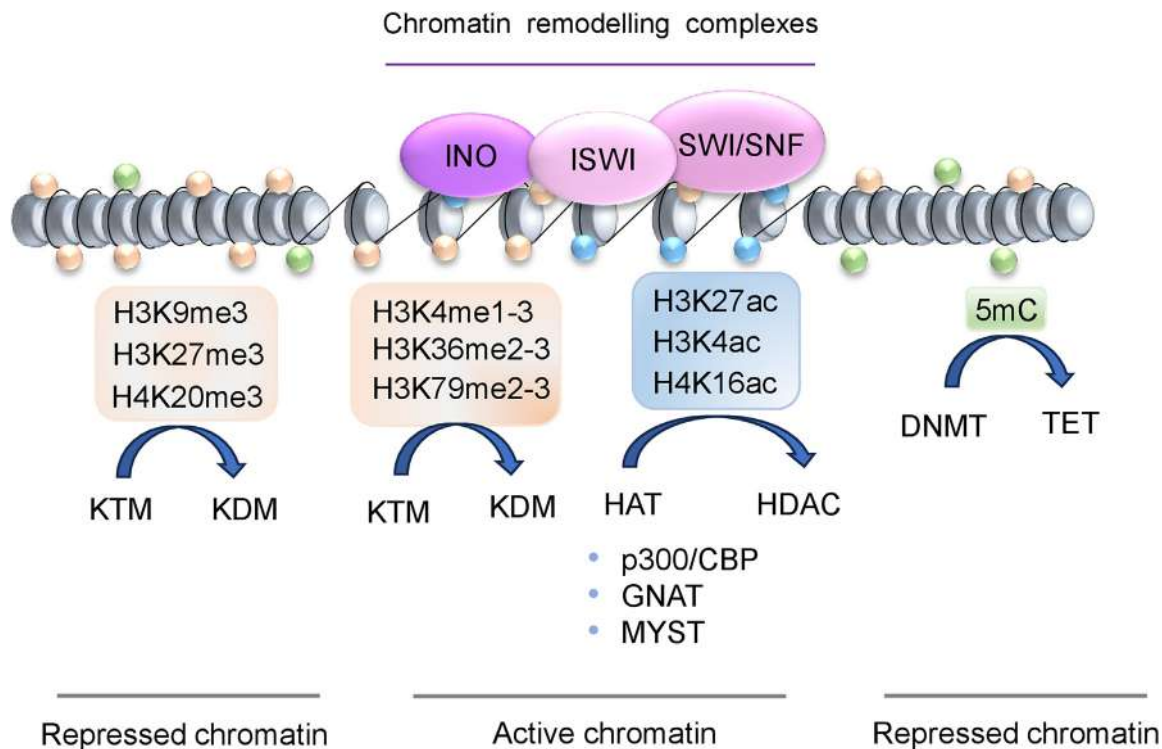


Figure 1. Coordinated insertion and deletion of post-translational modifications shape chromatin structure to allow transcription of cancer-promoting genes or to repress tumor suppressors

Histone acetylation by histone acetyltransferases (p300/CBP, GNAT, MYST) and deacetylation by the HDAC family of deacetylases cooperates with other histone and DNA-modifying enzymes. Histone methylation, which refers to the addition of either one, two, or three methyl groups by histone lysine methyltransferases (KMTs) or protein arginine N-methyltransferases (PRMTs), can both facilitate and repress transcription.^{12,13} KMT make use of S-5'-adenosyl-L-methionine (SAM) as a methyl donor to transfer of methyl groups to lysine's residues on histone H3 and H4 tails, whereas histone lysine demethylases (KDMs) remove the methylation marks.¹³ H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K36me2, and H3K36me3 are associated with a transcription-permissive environment, whereas H3K9me3, H3K27me3, and H4K20me3 are considered as repressive marks.¹⁴ As well as histone tail deacetylation, DNA methylation, which is strictly connected with HDAC activity, is mostly referred as a repressive mark present predominantly on CpG dinucleotides that prevents transcriptional activation of genic regions, which are meant to be silenced in a cell-type specific manner.¹⁵ DNA methylation is catalyzed by the DNA methyltransferase (DNMT) family, including DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B, which utilize SAM as a methyl donor to form 5-methylcytosine (5mC). Conversely, the 10-11 translocation (TET) family enzymes mediate DNA demethylation in an indirect manner through the oxidation of 5-methylcytosine.¹⁶ Histone lysine acetylation has been reported to recruit SWI/SNF chromatin remodelers that change the nucleosome structure.^{4,17} Several chromatin remodelers belonging to CHD and ISWI are known to read methylation marks and participate in the regulation of gene expression via PHD fingers.^{18,19}

Mammalian HATs, which are also named lysine acetyltransferases (KATs) because of their capacity to acetylate non-histone proteins, are grouped into three main families based on their structural homology and substrate binding: Gcn5-related N-acetyltransferases (GNAT), p300 and CREB-binding proteins (p300/CBP), and the MYST-family histone acetyltransferases.^{20,21} These families share a conserved central core region that contributes to the acetyl-CoA binding (KAT) domain but differ in the N- and C-terminal region flanking the core, which is responsible for substrate specificity. HDACs are often components of large protein complexes and are recruited to DNA methylation by methyl DNA-binding proteins.⁸

In addition to the direct effects on nucleosome structures, lysine acetylation has been reported to act as an epigenetic mark specifically recognized by bromodomain-containing transcription factors. These proteins recruit chromatin remodelers that change the nucleosome

structure.⁴ These essential epigenetic regulators utilize ATP hydrolysis to mobilize nucleosomes, thereby linking the chromatin structure with gene transcription. According to the homology in the catalytic ATPases and associated subunits, ATP-dependent chromatin-remodeling complexes can be divided into four subfamilies: switch/sucrose non-fermentable (SWI/SNF), imitation switch (ISWI), chromodomain helicase DNA-binding (CHD), and inositol 80 (INO80).¹⁷

Genomic studies have clearly implicated the dysregulation of chromatin modifiers for numerous cancer types and the recurrent mutations that occur in these enzyme genes. Intriguingly, the functionality of certain chromatin modifiers was elevated in some and declined in other cancers, therefore suggesting a dual role in malignancies.²² HATs may function as tumor suppressors, helping cells to control cellular proliferation and cell cycles, or act as oncogenes, activating malignant proteins via an abnormal acetylation.²³ The

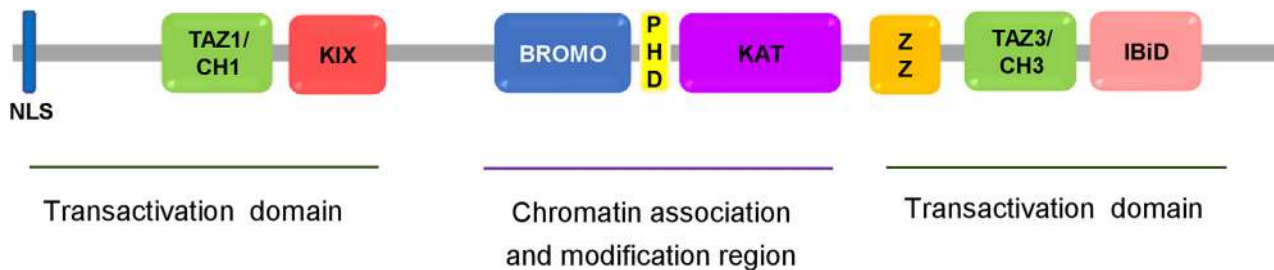


Figure 2. Schematic structure of p300 protein including its functional and structural domains and their localization

acetyltransferase E1A-binding protein P300 (EP300; also known as P300 or KAT2B) is one of the most frequently altered HATs in cancers, with altered expression in some tumors,^{24–27} but somatic mutations in *EP300* have been also identified in multiple cancers,^{28,29} This enzyme modifies histones within proximal and distal gene regulatory elements and its activity is closely linked to excessive H3K27 acetylation at the enhancer loci, which is massively deregulated in various cancer types.²⁹ P300 is closely related to CREB-binding protein (CREBBP, also known as CBP or KAT2A),³⁰ and increased acetylation levels caused specifically by CBP/p300 promotes cancer metastasis, immune evasion, and drug resistance.³¹

In this review, we present a comprehensive analysis of p300 dysregulation in cancer but focus in detail on the expression changes of this gene. Publicly available datasets allowed us to describe an abundance of EP300 alterations (mutations, copy number alterations, and expression changes) in various types of cancer and correlate the expression of EP300 with survival rate and clinicopathological features such as histological subtypes, tumor stages, and metastases. The relationship between p300 and the expression of other genes involved in gene expression regulation is reviewed and the expression status of p300 as prognostic mark and therapeutic target for anti-cancer approaches is discussed.

p300 structure and function

Transcriptional co-activator protein p300 is ubiquitously expressed in all mammals and other multicellular organisms. In humans, the *EP300* gene is located in chromosome 22 at the 22q13 locus. The gene is comprised of 31 coding exons, which span approximately 90 kb giving the product of the 300 kDa protein.³² Several protein-interacting domains of this large multidomain protein flank the central chromatin association and modification region. These consist of the KAT acetyltransferase activity domain and the bromodomain, as well as the RING and PHD, which regulate KAT domain activity in an acetylation-dependent manner. Due to the presence of both the KAT and bromodomain, this protein can act as both a "writer" and a "reader" of lysine acetylation.³³ Additional fragments, include the cysteine-histidine-rich region 1 (CH1), encompassing the transcriptional adapter zinc finger 1 (TAZ1) domain, the KIX domain, another cysteine-histidine-rich region (CH3) containing the transcriptional adapter zinc finger 2 (TAZ2) domain, a ZZ-type zinc finger domain, and the nuclear receptor co-activator binding domain, also known as

the interferon-binding domain (Figure 2). These TADs mediate the interactions with other DNA-binding transcription factors including other coactivators.³⁴ A new line of evidence suggests that TAZ2 inhibits the HAT activity by modulating p300 autoacetylation and that this autoinhibition is alleviated when TAZ2 binds to transcription factors, leading to an active acetylation of p300 substrates.³⁵

P300 and its homolog CBP share high sequence identity in several structured regions. Sequence alignments of these two enzymes revealed an ~90% homology in the KAT domain, and an ~93% homology in the bromodomain. However, the homology is substantially lower outside of these highly conserved domains. Accumulating evidence suggests that the two acetyltransferases have unique roles in cells. CBP and p300 acetylate multiple lysines on histone H3 and histone H4, but the functional difference between the two enzymes lies in their specificity and selectivity for the acetylated residues, and is dependent on whether histone or acetyl-CoA is limiting.³⁶ In mice, heterozygous inactivation of p300 leads to more severe abnormalities in heart, lung, and small intestine formation than inactivation of CBP.

Although P300/CBP belongs to the family of histone acetyltransferases, its enzymatic activity is not just limited to histones, but also regulates transcription through remodeling other chromatin-associated proteins and upstream signaling mediators, thereby playing an important role in cell proliferation and differentiation. P300 has been shown to acetylate all the acetylation sites of histones H2A and H2B, and K14, K18, K27, and K56 from H3, and K5 and K8 from H4 *in vitro*.³⁴ In addition, this KAT interacts with a wide spectrum of transcription factors including protooncogenes (MYC,³⁷ MYB,³⁸ and GATA-3³⁹), tumor suppressors (p53,^{40,41} HBP1,⁴² HIPK2,⁴³ and FOXO3^{44,45} and other transcription factors, which may affect cancerogenesis and cancer progression (E2F1,^{46,47} PARP1,⁴⁸ HIF1,⁴⁹ STAT-3,⁵⁰ and HSPA5).⁵¹ p300 acts as a coactivator for nuclear receptors such as the androgen receptor (AR)⁵² and estrogen receptor, facilitating the growth of hormone-dependent cancers.⁵³

EP300 mutations in cancers

Analysis of 32 TCGA Pan-Cancer Atlas studies (10,967 samples) using the cBioPortal for Cancer Genomics^{54,55} revealed *EP300* mutations with the approximate ratio of 10% in all cancer samples tested (1,083 samples). It increased to 23.2% in melanomas and genitourinary cancers (Figure 3A). Point mutations (37% of altered samples)

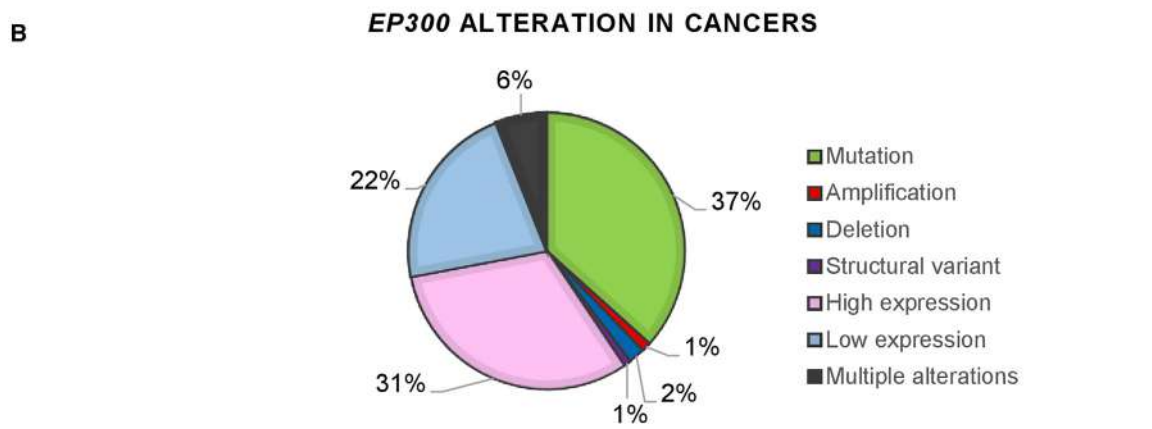
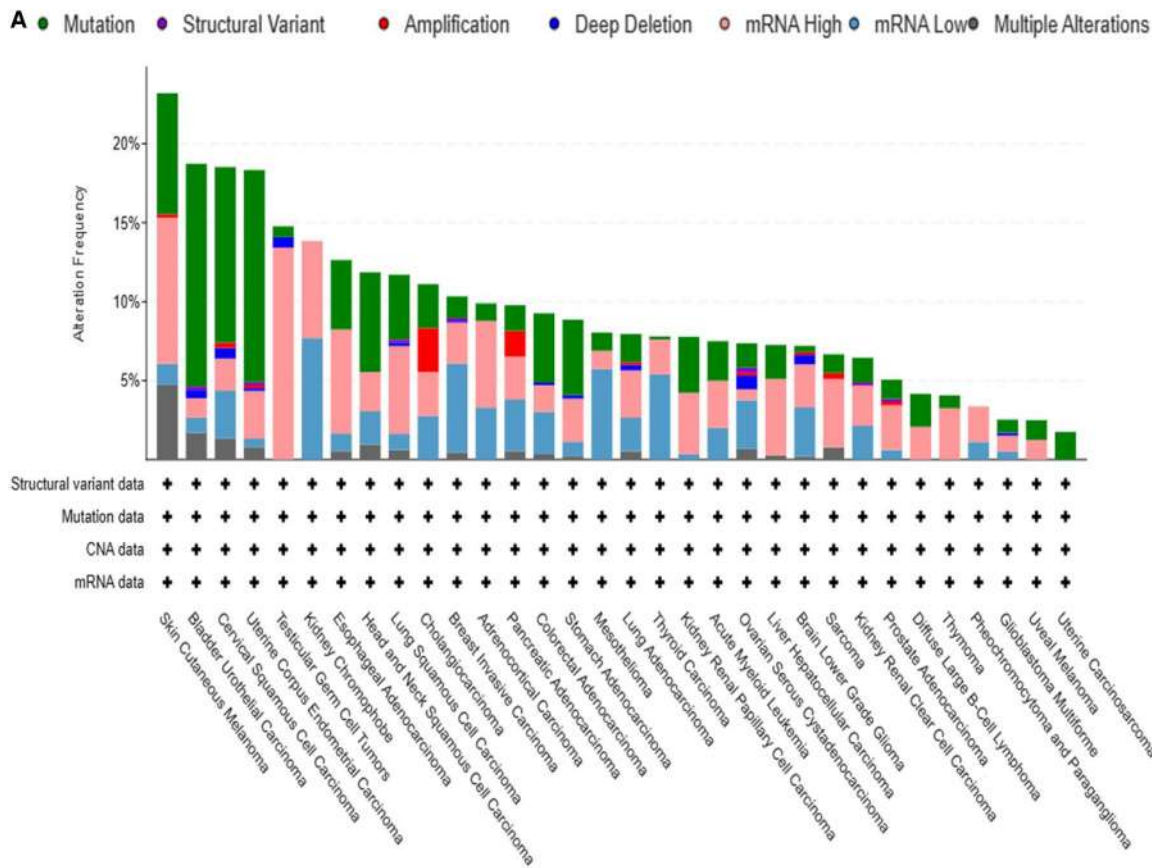


Figure 3. EP300 alterations in cancers

(A) EP300 changes across cancer types and (B) quantitative summary of EP300 changes in cancers was generated in cBioPortal based on the TCGA Pan-Cancer dataset.

and changes in gene expression without genetic alterations (high expression 31% and low expression 22%) represented the most frequently occurring cases (Figure 3B).

Missense and truncating mutations occur most often among the somatic mutations and account for approximately 93% of all detected

changes (Figure 4A). The majority of observed missense alterations that are spread along EP300 gene are assigned to passenger-type mutations (Figure 4B). These changes in cancer genomes are not considered significant in the initiation or progression of cancer since the selective growth advantage has not been observed.⁵⁶ On the contrary, the driver mutations that provide a cancer cell with beneficial

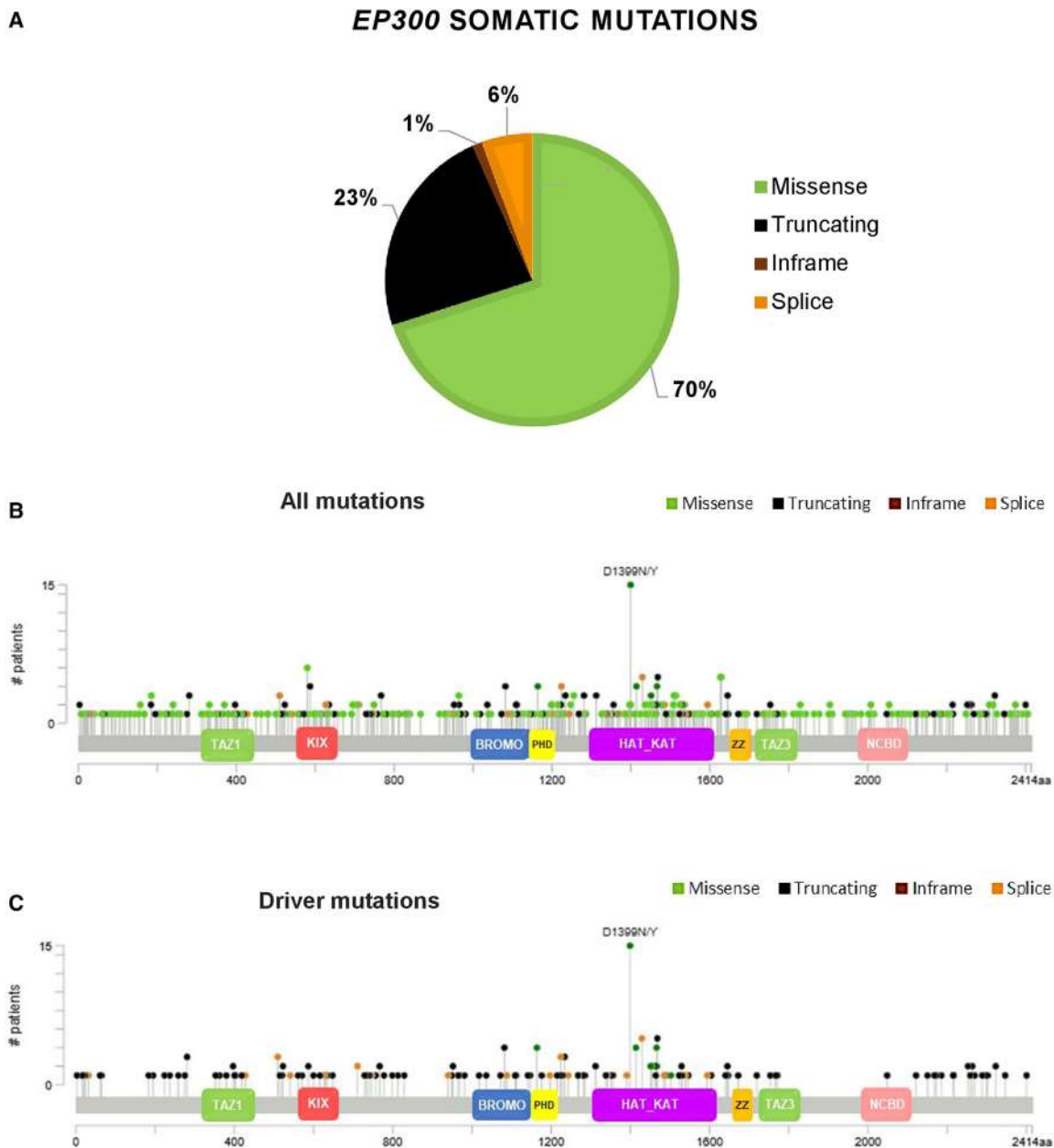


Figure 4. EP300 somatic mutations in cancers

(A) Frequency of EP300 somatic mutations in cancers, (B) localization of all somatic mutations in EP300 gene, and (C) localization of driver mutations in EP300 structure; (B) and (C) were generated in cBioPortal based on the TCGA Pan-Cancer dataset.

adaptive features, were mainly identified in the catalytic domain and bromodomain/PHD region (Figure 4C). Among them, the most frequent substitution D1399N/Y changed the conformation of histone acetyltransferase KAT domain in the p300 protein, thereby abolishing its autoacetylation activity that is essential for proper protein functioning.⁵⁷ Other mutations in the KAT domain (Y1414C/D, H1451L, and P1502L) similarly disrupted the acetyltransferase function.^{58,59} Deletions within the PHD finger that regulates p300 cata-

lytic activity, reduced the p300 efficacy in acetylating histones, but surprisingly retained the capability of the enzyme to acetylate non-histone proteins such as p53.³³ Protein-truncating variants led to a shortening or complete protein loss of p300.⁶⁰ However, truncated variants with an intact catalytic domain can still maintain their function. It has been shown that the TAZ2 domain cooperates with other HAT neighboring domains to maintain the HAT active site in a closed state. Truncating TAZ2 induces a conformational change

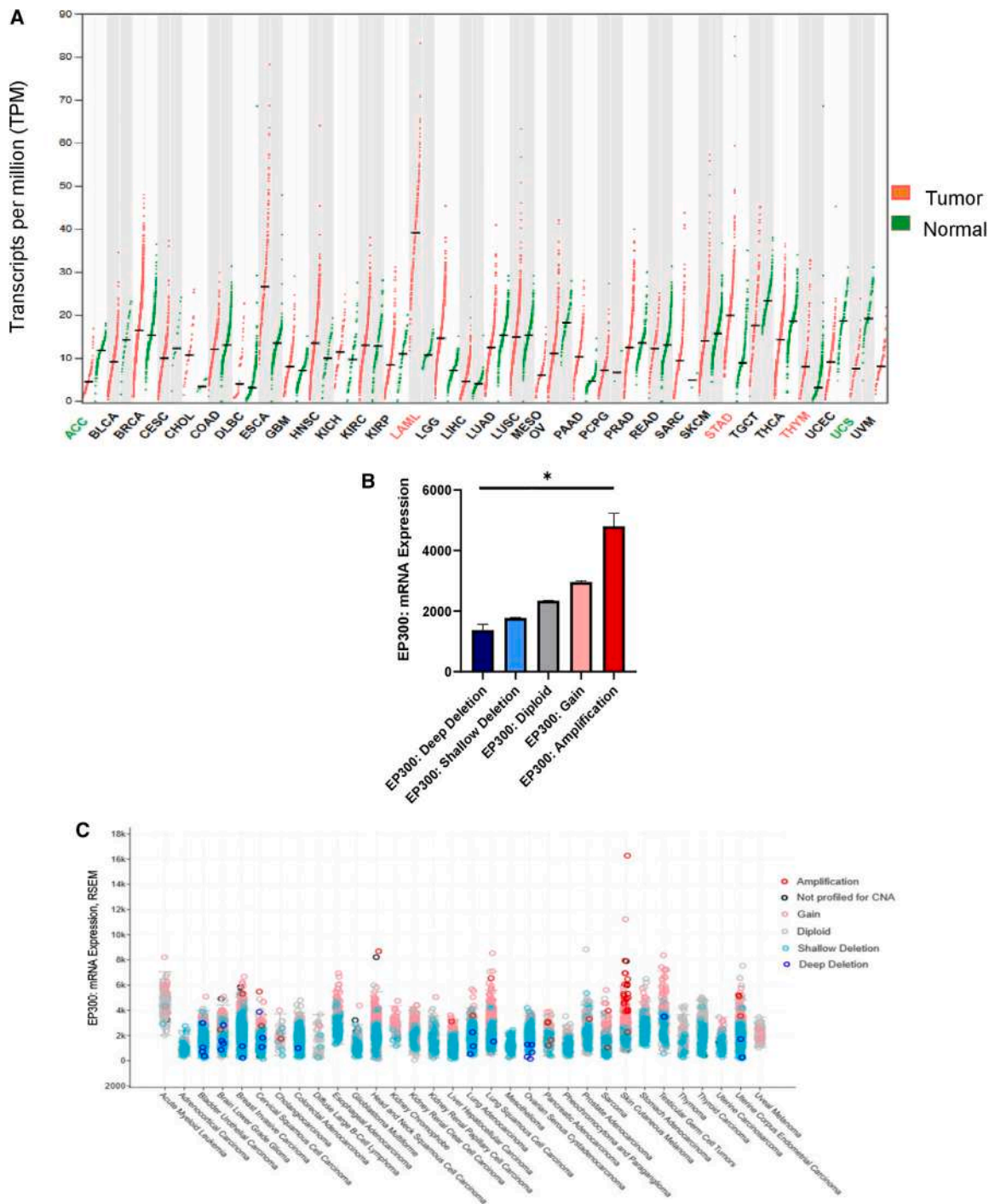


Figure 5. EP300 expression in cancers

(A) Comparison of *EP300* expression in cancers and normal tissues. ACC, adrenocortical cancer; BLCA, bladder urothelial carcinoma; BRCA, breast invasive carcinoma; CESC, cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma; CHOL, cholangiocarcinoma; COAD, colon adenocarcinoma; DLBC, lymphoid neoplasm diffuse large B cell lymphoma; ESCA, esophageal carcinoma; GBM, glioblastoma multiforme; HNSC, head and neck squamous cell carcinoma; KICH, kidney chromophobe; KIRC, kidney renal clear cell carcinoma; KIRP, kidney renal papillary cell carcinoma; LAML, acute myeloid leukemia; LGG, brain lower-grade glioma; LIHC, liver hepatocellular carcinoma; LUAD, lung adenocarcinoma; LUSC, lung squamous cell carcinoma; MESO, mesothelioma; OV, ovarian serous cystadenocarcinoma; PAAD, pancreatic adenocarcinoma; PCPG, pheochromocytoma and paraganglioma; PRAD, prostate adenocarcinoma; READ, rectum adenocarcinoma; SARC, sarcoma; SKCM, skin

(legend continued on next page)

that opens the active site for substrate acetylation and confers an over-activation of p300.³⁵ Interestingly, *EP300* mutations may co-exist with mutations in *CBP*. In the 32 studies analyzed, 329 cancer patients were characterized by simultaneous alteration in these two genes. Similarly to *EP300*, the mutations in *CBP* occurred most frequently in the KAT domain.

COPY NUMBER ALTERATION AND EXPRESSION CHANGES OF EP300 IN CANCERS CLINICAL OUTCOMES, PROGNOSIS, AND FEATURES

To compare the transcription status of *EP300* and to identify the possible expression changes of *EP300* in cancer, we compared selected features between the tumor and normal samples from the TCGA and GTEx databases using GEPIA 2.⁶¹ As shown in Figure 5A, the mRNA level of *EP300* varied in numerous normal and cancerous tissues. Among all the cancers that were considered, thymoma, stomach adenocarcinoma, and acute myeloid leukemia were characterized by a substantial increase in expression of *EP300*, whereas a decline was found in uterine carcinosarcoma and adenoid cystic carcinoma. The yield of the *EP300* transcript can be determined by the rate of RNA synthesis, but also by the alteration of gene copy numbers that were shown to affect the expression level of some specific genes in cancers, hence promoting the development and progression of the disease. The results of pan-cancer studies provided evidence for strong correlation and a positive linear influence of the copy number on the expression of the majority of genes considered.⁶² However, it was also noted that, due to transcriptional adaptive mechanisms, changes in the gene copy number at the genome level did not always translate proportionally into altered gene expression levels.⁶³ The causative interdependence between mRNA (mRNA expression Z scores relative to normal samples) and the copy number of *EP300* was also found in TCGA Pan-Cancer Atlas studies (10,967 samples) (Figures 5B and 5C), and suggest that genetic variation generated a direct effect on the gene transcriptional level.

The increase in the expression and copy number of *EP300* is associated with several clinicopathological features that specify tumor stages and prognosis such as grading, metastases, and patient survival in some cancer types. Cancer grading is used to predict the clinical behavior of malignancies and establish appropriate therapies.⁶⁴ The grade score (numerical: G1–G4) increases with decreasing cellular differentiation: G1, well differentiated; G2, moderately differentiated; G3, poorly differentiated; and G4, undifferentiated/anaplastic.⁶⁵ The degree of resemblance between the tumor and its tissue of origin is assessed based on morphological criteria. A high degree of differentiation meaning that the neoplasia is morphologically similar to the native organ and forms neoplastic organoid structures, whereas tumors in low stages of differentiation gradually lose the capacity for structural organization and start to display reduced cohesiveness.

The term anaplasia signifies tumor morphology where all similarity with the origin has been lost.⁶⁶ Malignant neoplasms range from well differentiated to undifferentiated. In general, increasingly undifferentiated tumors are usually more aggressive.⁶⁷ Evaluation of the *EP300* expression at different stages of tumor dedifferentiation shows that expression increases in the tumor cells that are not fully differentiated but decreases in undifferentiated tumors (Figure 6A). Since *EP300* regulates various key physiological functions, including cell proliferation, differentiation, and somatic cell reprogramming, higher *EP300* abundance and intracellular overall activity may facilitate tumor initiation and progression at an early stage.³⁰ P300 acetylates pluripotency-related transcription factors and enhances their transcription activity, thus promoting stemness acquisition. In cancer, *EP300* was considered as an oncogene capable of supporting tumor growth and metastatic potential and facilitating cancer stemness.⁶⁸ Deficiency of *EP300* abolished the cancer stem cell phenotype by reducing tumor sphere formation *in vitro* and in a xenograft mouse model *in vivo*,⁶⁹ meaning a higher activity of p300 may promote the initial malignant transformation. However, in line with the observed reinstatement of p300 levels in high-grade tumors, the decline of *EP300* directly suppresses *GATA6* expression, which interferes with the *GATA6*-regulated differentiation program and leads to a phenotypic transition from the classical subtype to the dedifferentiated basal-like/squamous subtype of pancreatic cancer.⁷⁰ Although a late decrease in p300 expression may look surprising, accumulating mutations and chromosome aberrations are likely to lead to the inactivation of numerous genes, including *EP300* and p300-fueled epigenetic reprogramming and the adaptation of cancer cells may be dispensable in advanced, high-grade tumors. One line of evidence suggests that strongly elevated miRNA targets mRNA of *EP300* in advanced cancers.⁷¹

Another internationally accepted criterion for cancer staging, the tumor-node-metastasis (TNM) system, includes tumor size and local growth (T), the extent of lymph node metastases (N), and the occurrence of distant metastases (M).⁶⁴ T is used to describe the size of the primary tumor and invasion into adjacent tissues. The higher the number after the T, the larger the tumor or the more it has grown into nearby tissues. N describes the regional lymph node involvement of the tumor. Lymph nodes function as biological filters with fluid from body tissues being absorbed into lymphatic capillaries and flowing to the lymph nodes. N0 indicates zero regional nodal spread, while N1–N3 indicates some degree of nodal spread, with a progressively distal spread from N1 to N3. M identifies the presence of distant metastases of the primary tumor. Metastasis is when the tumor spreads beyond the regional lymph nodes. A tumor is classified as M0 if there are no distant metastases present, whereas M1 is assigned to distant metastases.⁷² The increase in tumor size did not result in any considerable change in *EP300* expression (Figure 6B). This is in line with previously published

cutaneous melanoma; STAD, stomach adenocarcinoma; TGCT, testicular germ cell tumors; THYM, thymoma; THCA, thyroid carcinoma; UCS, uterine carcinosarcoma; UCEC, uterine corpus endometrial carcinoma; UVM, uveal melanoma. (B) Association of *EP300* expression with copy number alterations in cancers. (C) Expression of *EP300* across cancer types, generated in cBioPortal based on TCGA Pan-Cancer datasets. The comparison in (A) was generated using GEPIA 2. (B) TCGA-Pan Cancer datasets available in cBioPortal was analyzed using GraphPad Prism 8.

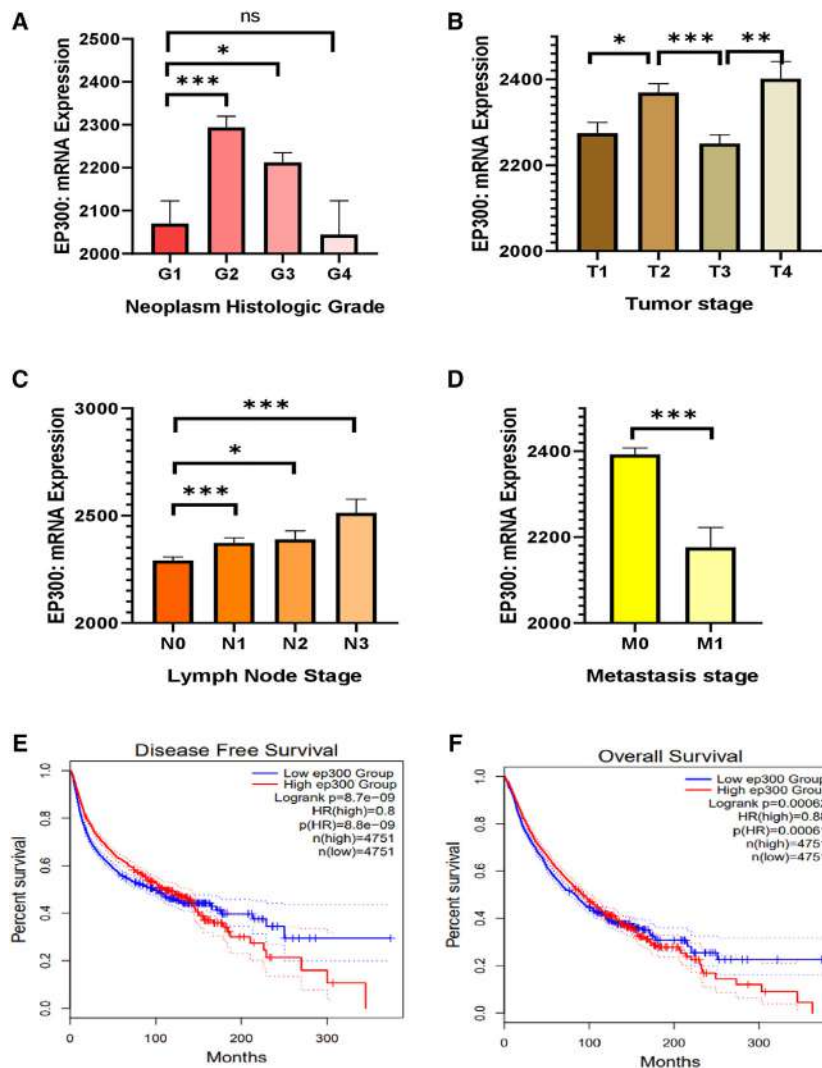


Figure 6. Association of EP300 expression with clinical parameters and outcomes

The link between EP300 expression and tumor histologic grade is shown in (A), with tumor stage in (B), lymph node stage in (C), and metastasis stage in (D). The disease-free survival and overall patient survival in relation to EP300 expression is shown in (E) and (F), respectively. TCGA-Pan Cancer datasets available in cBioPortal were analyzed using GraphPad Prism 8 (A–D), and generated using GEPIA 2 (E and F).

the primary tumor, with lymph node metastases exhibiting different genetic profiles compared with primary colorectal cancer and distant metastases.^{74,75} This suggests that tumor subclones, characterized by low p300 status, are more prone to form distant metastases, whereas high p300 cancer cells invade local lymph nodes. This also agrees with the observed interdependence between p300 expression and tumor grades, since high-grade, undifferentiated cells with lower p300 levels are likely to spread further to distal parts of the body. Moreover, the study comparing highly metastatic pancreatic ductal adenocarcinomas with liver metastases, nonmetastatic, or marginally metastatic cells, provided evidence for the elevated expression of miRNA targeting mRNA of EP300 in a highly metastatic group that was also associated with substantial decline of p300.⁷¹

Despite the fact that low expression of acetyltransferase appears to promote the formation of distant metastases, higher expression of this protein also led to a poorer disease-free survival (Figure 6E) and overall survival rate of cancer patients (Figure 6F). Some studies documented the beneficial effect of high p300 expression, and were limited to

observations where no significant correlation was detected between p300 expression and age, sex, tumor location, or depth of invasion.⁷³ However, the mRNA level of EP300 does correlate with the number of lymph node metastases (Figure 6C). In colorectal cancer, the p300 abundance in tumors was significantly associated with histological grade and lymph node involvement.⁷³ The enhanced migration potential was previously reported in the breast cancer cell line HS578T-overexpressing EP300, where extensive protein acetylation led to upregulation of mesenchymal markers and increased invasion, anchorage-independent growth, and drug resistance.⁷¹ In an esophageal cancer study, increased p300 expression correlated to a higher histologic grade, T category, and N category.²⁶ Although a high expression of EP300 appears to promote a change in tumor phenotype and increase tumor invasiveness into lymph nodes, the opposite relationship has been observed for the formation of distant metastases, as metastatic tumors were characterized by lower p300 expression (Figure 6D). Lymph nodes and distant metastases can arise from independent subclones of

non-small cell lung cancer, melanoma,⁷⁶ and glioblastoma.⁷⁷ More literature data showed that high expression of p300 is associated with poor overall survival in hepatocellular carcinoma, esophageal squamous cell carcinoma, nasopharyngeal cancer, breast cancer, cutaneous squamous cell carcinoma, and small cell lung cancer,⁷⁶ as well as non-small cell lung cancer.⁷⁸ A similar result was observed in disease-free survival. High expression of the considered gene correlates with poor prognosis in breast cancer, cutaneous squamous cell carcinoma,⁷⁶ esophageal squamous cell carcinoma,²⁶ and non-small cell lung cancer.⁷⁸ The missing piece of information in the diagnosis stage, treatment scheme, or its lack in each of the above studies can be crucial when linking EP300 expression with patient outcomes and survival.

EP300 IRREGULARITIES IN CANCER

Pro-oncogenic role of EP300 overexpression

Despite the well-described examples of the tumor-suppressive role of p300, the histone acetyltransferase can also foster cancer progression,

as suggested by the enhanced EP300 expression in early, low-differentiated tumors and in lymph node metastases.

p300 may function as a coactivator of the Myc oncogene and facilitate the initiation of cancerogenesis. Myc-dependent transcription is stimulated in a HAT domain-dependent manner at the Myc target gene promoters.³⁷ p300 was shown to be an essential coactivator and context-dependent corepressor in the intrinsic transforming ability of c-Myb. The interaction between c-Myb and p300 is essential for the transforming and leukemogenic capabilities of AML1-ETO and MLL fusion oncoproteins, which are products of two of the most frequently occurring chromosomal translocations in human acute myeloid leukemia.³⁸ Furthermore, p300 binds and acetylates GATA-3, a master regulator of the growth and proliferation of T cells, with possibly GATA-3 acetylation being required for optimal transcriptional regulation of the target genes in T cell neoplasms.³⁹

In addition to oncogenes, p300 regulates the activity of nuclear receptors that are involved in cancer cell proliferation. P300 acts as a component of the estrogen receptor (ER) transcriptional complex with its acetyltransferase activity being crucial for ER signaling. Within the complex, HAT directly acetylates ER to enhance the receptor binding to DNA and its transactivation, thereby stimulating mitotic divisions of ER+ breast cancer cells.⁵³ Interestingly, the histone acetyltransferase activity of p300 supports the expansion of ER-independent triple-negative breast cancer via a functional interaction with the AR. Treatment of triple-negative breast cancer cells^{79,80} as well as prostate cancer cells^{80,81} with CBP/EP300 inhibitors, down-regulates the expression of an AR-dependent genes so these compounds can be considered as drugs to treat ER-/AR+ cancers.

The overexpression of EP300 leads to upregulation of mesenchymal markers and increases the migration, invasion, anchorage-independent growth, and drug resistance in breast cancer cells.⁷¹ Cell proliferation, colony formation, migration, and invasion depend on p300 activity in esophageal squamous carcinoma and the transcription of genes associated with angiogenesis, hypoxia, and epithelial-to-mesenchymal transition substantially decreases upon EP300 knockdown in these cells.²⁵ In addition, p300 promotes the acetylation of pluripotency-related transcription factors such as *OCT4*, *SOX2*, and *KLF4* and changes their transcription activity, thus regulating the acquisition of stemness markers and features in induced pluripotent stem cells.⁶⁸

A growing body of experimental evidence indicates that cancer drug resistance can be conditioned by p300 activity. For example, the clonogenic potential of docetaxel-resistant prostate cancer cells, their migration, and invasion are fueled by p300, the abundance of which is substantially elevated in the drug-resistant phenotype.⁸² The promoter sequences of ATP binding cassette (ABC) transporters, which are overexpressed in cisplatin-resistant breast and lung cancer cell lines, are characterized by a considerable enrichment of p300-catalyzed acetylation of nucleosomes conferring an augmented efflux of anticancer drugs.⁸³ Cisplatin-induced DNA damage activates the

p53-mediated recruitment of p300 to ABC gene promoters that are not repressed by the CoREST complex.⁸⁴ p300 plays an important role in DNA repair since it is recruited to the sites of DNA breaks, where it facilitates DNA repair and enhances transcription of some DNA repair proteins. Although p300 does not contribute to DNA repair itself, it serves as a cofactor and binding module for multiple proteins that are involved in DNA repair pathways such as PCNA, KU70, and KU80.⁸⁵ In triple-negative breast cancer cells, it serves as transcription cofactor of *NEIL3* and *LIG1*, which play an indispensable role in base excision repair.⁸⁶ In pancreatic cancer cells it was reported as an anti-apoptotic agent upon gemcitabine-induced DNA damage. p300 targeting by either siRNA or a small-molecule p300 inhibitor enhanced the cytotoxicity of gemcitabine.⁸⁵

Low expression and inactivating mutations in cancer initiation and progression

Deficiency of p300 activity has been weakly linked to genomic instability, the fundamental basis for the initiation and progression of almost all human cancers. Instability usually arises when DNA repair genes and mitotic checkpoint genes, as well as non-classic-care taker genes such as *TP53* and *ATM*, which are crucial in the DNA damage response, undergo inactivation. Some oncogenes can induce DNA replication fork collapse with an accompanying catastrophe for DNA replication, DNA double-strand breaks, accelerated mutations, and chromosome aberration.⁸⁷ Inactivating the mutations in *EP300* causes chronic DNA replication stress, resulting in persistent genomic instability. Aberrant DNA replication in EP300-mutated cells is characterized by increased replisome pausing and nucleolytic degradation of nascently synthesized DNA at stalled forks due to a prominent defect in fork stabilization and protection. This in turn results in the accumulation of single-stranded DNA gaps at the collapsed replication forks.⁸⁸ *EP300*-mutated cancers had significantly higher microsatellite instability and tumor mutational burden (TMB), representing the number of mutations per megabase harbored by tumor cells in each neoplasm. High TMB values in *EP300*-mutant-type cancers indicate a potential response to immunotherapy caused by significantly higher programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression.^{28,89} Moreover, EP300 was co-mutated with DNA mismatch repair genes.²⁸

p300 is considered as a tumor-suppressive gene that acts through the promotion of the functions of tumor suppressors such as p53, HBP1, FOXO, and HIPK2. The first of these proteins, transcription factor p53, becomes phosphorylated, released from Mdm2 inhibitory protein, and interacts with p300 in response to DNA damage.⁴¹ p300 is required for full p53 transactivation as well as the downstream p53 effects of growth arrest and/or apoptosis.⁹⁰ As with other transcription factors involved in controlling pro-apoptotic genes, p53 is phosphorylated by nuclear serine/threonine kinase HIPK2 upon DNA damage. p300-mediated acetylation of HIPK2 increases the enzyme stability and enhances its tumor-suppressor function.⁴³ HBP1 activates or represses the expression of some specific genes during cell growth and differentiation. p300-mediated acetylation of HBP1 is essential for its transactivation on the p16 promoter and activation

of the cyclin-dependent kinase inhibitor.⁴² Decreased acetylation of tumor-suppressor FOXO upon p300 deficiency promotes cell growth and increases the cancer cell resistance to cisplatin.⁴⁴ In addition, p300 deletion activates prooncogenic signals such as mitogen-activated protein (MAP) kinase, Janus kinase/signal transducer, and the activator of transcription (STAT) pathways. In chimeric mice, loss of p300 leads to upregulation of NOTCH1, BMI1, MYC, CCNE, and SKP2 oncogenes, as well as the development of thymic lymphoma and histiocytic sarcomas.³¹

p300-depleted cells have aggressive cancer phenotypes that are characterized by loss of cell-cell adhesion, defects in cell-matrix adhesion and increased migration.⁹¹ The deficiency of p300 upregulates the expression of genes associated with adhesion, cytoskeletal remodeling, stemness, apoptosis, and metastasis.⁹² The cell responds to EP300 downregulation by acquiring a phenotype that is characteristic of it undergoing epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), including enhanced cell motility and invasion, ability to proliferate after anticancer treatment as a consequence of drug resistance, and activation of the EMT regulatory pathway.⁹³

Some cancer types lacking p300 became more resistant to anticancer drugs such as paclitaxel,⁹² doxorubicin^{93,94} and cisplatin.⁴⁴ One study documented the development of multidrug resistance (MDR) as a consequence of p300 downregulation.⁹⁵ Overexpression of some ABC proteins contributes to MDR considerably, since these membrane transporters are responsible for the efflux of diverse drugs from cancer cells and therefore decreasing intracellular drug concentration and drug toxicity.⁹⁶ However, the abovementioned p300-deficient MDR phenotype was drug-transporter independent as P-glycoprotein remained low and cells ineffectively effused a fluorescent derivative of paclitaxel. In this case, lesser activation of apoptosis, caspase-9, and caspase-3/-7 activities were observed, leading to apoptosis evasion.⁹⁵

Relationship of EP300 and other epigenetic regulators in cancer

The expression of *EP300* crosstalk with other epigenetics factors has been studied according to data deposited in TGCA Pan-Cancer Atlas (pan-cancer analysis of whole genomes (ICGC/TCGA, Nature 2020). As shown in Figure 7, a high mRNA level of *EP300* is accompanied by high transcript level of other histone acetyltransferases, histone lysine methyltransferases, histone demethylases, RNA methyltransferases, and SWI/SNF subunits, and by repression of HDACs, histone arginine methyltransferases, and DNA methyltransferases.

Interplay between expression of EP300, histone acetylases, and deacetylases

High mRNA level of *EP300* is accompanied by a high expression of other histone acetyltransferases such as *KAT2B*, *KAT5*, *KAT6A*, *KAT6B*, and *KAT7*, and by the repression of opposing acting HDACs: *HDAC2*, *HDAC4*, *HDAC8*, and *HDAC11* (Figure 7A). This suggests that cancer cells with a high abundance of p300, CBP, and other acetyltransferases are generally susceptible to an elevated status of his-

tone acetylation, while simultaneously having reduced mechanisms to prevent acetylation-driven gene overexpression.

The studies documented co-operation between various acetyltransferases that may act together. For example, NuA4 synergizes locally with the SAGA complex, and is capable of histone acetylation due to the occurrence of a GCN5 subunit with acetyltransferase activity during DSB repair.⁹⁷ In contrast, HDAC1 and p300 compete for histone binding since these two opposing acting enzymes can directly interact with the overlapping regions of the histone H3 tail. Moreover, p300 can acetylate HDAC1 and attenuate its deacetylase activity.⁹⁸ Therefore, a hyperactive EP300 likely reduces nuclear HDAC activity in cancer cells.⁹⁹

In human gastric cancer cell lines, crosstalk of 4 epigenetic modification types including H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac, and m6A were observed, with co-regulation of about 360 protein-coding genes. Nearly 50% of dysregulated genes in tested cancer cell lines were simultaneously regulated by more than one modification type and characterized by a high expression of multiple histone modification writers (SETD1B, KMT2A, and CREBBP) and the low expression of histone modification erasers (KDM1A, KDM1B, HDAC1, and HDAC2). This epigenetic-modification-dysregulated cluster had poor survival, stromal activation, and immune suppression.¹⁰⁰

Importantly, the low expression of *EP300* is followed by low expression of its homolog: *CBP*. Therefore, the compensation mechanism by CBP seems unlikely in the majority of the considered p300-deficient cancers.

In summary, the positive correlation between transcription of EP300 and other acetyltransferases with simultaneous opposite interconnection with some HDACs indicates the existence of two cancer types in terms of their favored protein acetylation status.

Relationship between expression of EP300 and histone methylation status

Interestingly, both histone methylases, such as *KMT2A*, *KMT2D*, and *KMT2E*, and demethylases, such as *KDM2A*, *KDM3B*, *KDM5A*, and *KDM6A*, show a positive correlation with a high EP300 expression in TGCA Pan-Cancer Atlas study (Figure 7B). These enzymes of opposite functions form a regulatory loop that controls gene expression. Acetylation of histones H3 and H4 coexists frequently with trimethylation of H3K4 at the promoter and TSS of transcriptionally active genes, as H3K4me3 promotes downstream H3/H4 acetylation by the recruitment of HATs. H3K4me3 readers have been identified in many HAT complexes. For example, SGF29, a component of the SAGA HAT complex, contains a Tudor domain that binds H3K4me3. SGF29 deletion causes the loss of H3K9ac and disassembly of the SAGA complex at target sites.⁵ In contrast, acetylation of H3K27 at the promoter region of *IL1RN* and *GRM2* genes leads to H3K4me3 enrichment around TSS and transcriptional activation. Blocking the reading of H3K27ac by BRD proteins abolished H3K27ac-induced H3K4me3 and downstream gene activation.¹¹ H3K4me1, another mark of active transcription, also demonstrated the relationship with acetylation

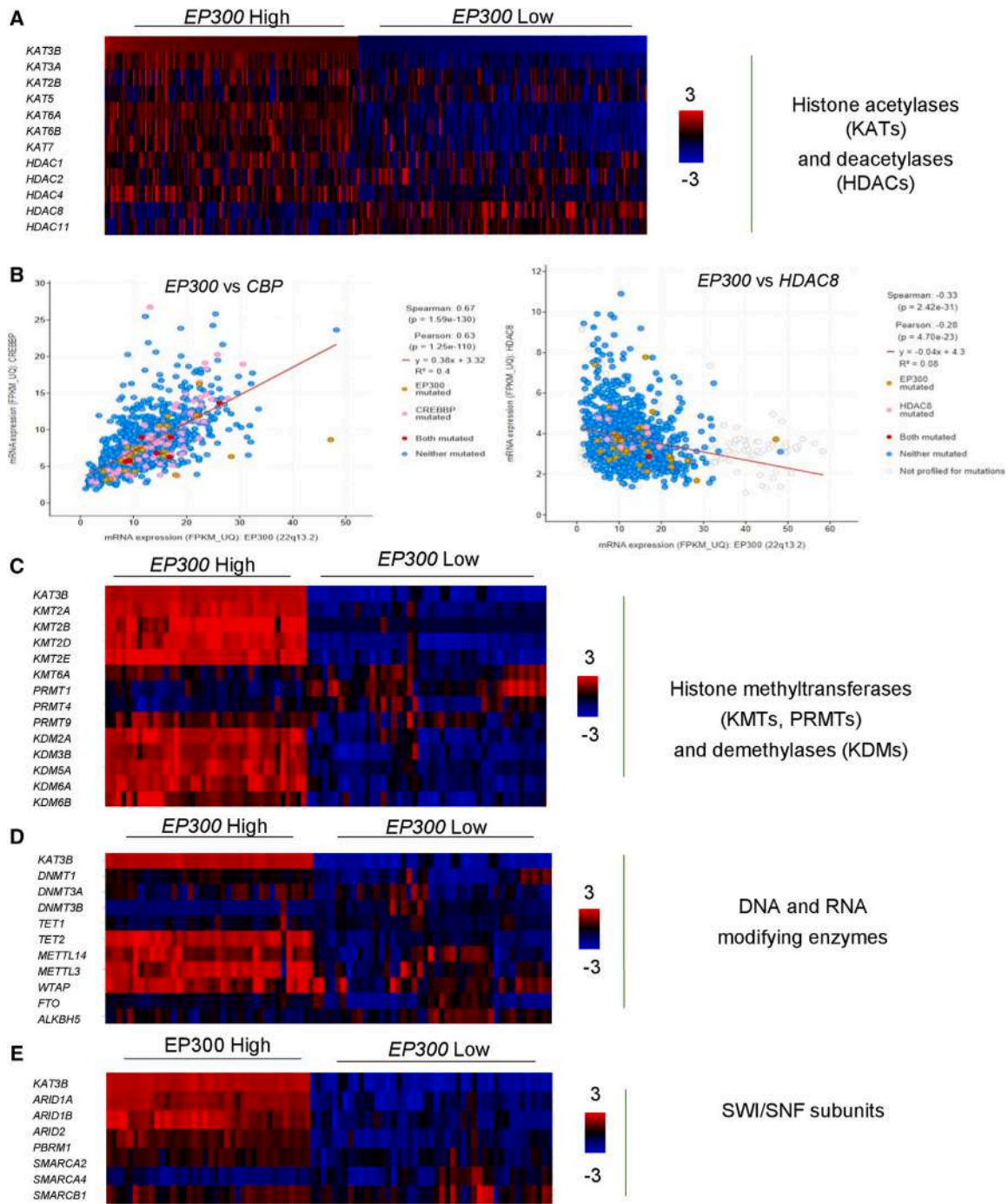


Figure 7. Co-expression of EP300 with other epigenetic factors

Heatmap presents overexpressed and downregulated *KAT3B* (EP300) samples and co-expression of EP300 with (A) other acetyltransferases (KATs) and (B) deacetylases (HDACs), histone methyltransferases (KMTs, PRMTs) (C), and demethylases (KDMs) (D), DNA and RNA methyltransferases and demethylases (E), and some SWI/SNF subunits in various tumor samples. (B) Exemplary dot-plot correlation graph with expression of EP300 and *KAT6A*, and between EP300 and *HDAC8*. The underlying data were derived from all TCGA Pan-Cancer Atlas (Pan-cancer analysis of whole-genome (ICGC/TCGA, Nature 2020) samples.

marks. However, the relationship between these two modifications is unequal. The loss of H3K4me1 reduced H3K27ac, but H3K27ac reduction did not affect H3K4me1.¹⁰ UTX (KDM6A) and MLL4 (KMT2B) form a feedforward regulatory loop that drives simultaneous H3K4 mono-methylation and H3K27ac on enhancers and super-enhancers to generate an active enhancer landscape. p300 forms an epigenetic protein complex with the H3K27 demethylase UTX and the H3K4 methyltransferase MLL4. MLL4-dependent H3K4 mono-methylation further augments the CBP/p300-dependent H3K27ac and transcriptional activation.³¹ Like H3K4me3 and H3K4me1, H3K36me3 is linked to regulation of histone acetylation. H3K36me3 recruits HDACs to the sites of active transcription. Moreover, H3K4me3 has been found to be promoter associated before transcription initiation and H3K4me3-dependent co-targeting of p300/CBP and HDACs may facilitate the dynamic turnover of histone acetylation. It is suggested that H3K4me3 and histone hyperacetylation at gene promoters may regulate transcriptional initiation from the TSS, whereas H3K36me2/3-mediated deacetylation is required to prevent initiation from aberrant sites within the gene body.⁵ Histone lysine acetylation and arginine methylation can also act cooperatively to localize and activate other methyltransferases. Pre-acetylation of H3K18 and H3K23 by CBP/EP300 triggers recruitment of arginine methyltransferase PRMT4 (CARM1), which methylates H3R17, thereby activating estrogen-responsive genes.^{22,101}

The cooperation between modifications may increase the effectiveness of the recruitment of specific factors. For example, PHF8 specifically binds to H3K4me3 via its PHD finger, and this interaction is stronger when H3K9 and H3K14 are also acetylated on the same tail of H3.¹⁰² Several reports have demonstrated that H3K9me3 and H3K27me3 modifications are mutually exclusive. H3K27me3 inserted by the KMT6A-containing PRC2 complex is associated with gene repression, while H3K27ac is associated with gene activation and active enhancers. The removal of H3K27ac by the HDAC1/2-containing NURD complex, facilitates the recruitment of the PRC2 complex and accumulation of H3K27me3 at promoters leading to gene repression. Methylation of H3K27me3 by KMT6A causes extrusion of p300 and CBP from chromatin, thereby preventing the accumulation of H3K27ac at enhancers and gene activation.⁵

Histone acetyltransferase EP300 and the histone demethylases KDM5A, KDM6A, and KDM6B, which can be jointly elevated in some cancer types, cooperate with KLF4 in transcriptional activation of POU5F1.¹⁰³ POU5F1 has been identified as one of the most important cancer stem cells markers and participates in stemness maintenance in cancer cells as well as correlating with clinicopathological features and poor prognosis for various tumors.¹⁰⁴

Concluding, the high EP300 transcription in the subset of cancer patients is mostly associated with high transcription of methyltransferases (KMTs) and demethylases (KDMs) listed in Figure 7C, which insert transcription promoting marks and remove repressive modifications, respectively. The discrepancy in this very general statement is evident for PRMT1 and PRMT4, which are considered as transcription-promoting enzymes, but their activity toward non-histone sub-

strates must be also taken into account while predicting their functional interaction with p300.

The relationship between expression of EP300 and enzymes, which covalently modify DNA and RNA

The alteration in the mRNA level of EP300 in cancers are associated with up- and downregulation of enzymes that are involved in covalent modifications of DNA and RNA (Figure 7D). Cancers that overexpress EP300 are characterized by a low level of DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 β (DNMT3), which is considered as *de novo* methyltransferase, as well as by overexpression of TET2, which catalyzes the conversion of the modified DNA base methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine, methyltransferase-like 3 and 14 (MTTL3, MTTL14), and pre-mRNA-splicing regulator WTAP. Although inactivating CREBBP/EP300 mutations were associated with hypermethylation in the literature,¹⁰⁵ transcription of DNMT1 DNMT3A/B remains mostly low in the studied group. It has been documented that overexpression of DNMTs in cancers, which cause hypermethylation of numerous genes such as hMLH1, p16, p53, CDH1, CEACAM6, CST6, ESR1, LCN2, and SCNN1A, also cause the activation of oncogene OCT4 through the IL-6/STAT3 pathway.¹⁰⁶ However, DNMT3B can act as a tumor suppressor in lymphomas, so a relatively low expression of DNMT3B and other DNA methyl transferases can support p300-dependent gene transcription in EP300-overexpressing tumors since many gene promoters are potential targets for DNMT3B activity. CpG methylation prevents the transcription-promoting methylations of H3K4, usually followed by nucleosome acetylation, because of the physical interference between DNMT3L, DNMT3A/B, and KDM1A/B, which compete for the N-terminal tail of histone H3.¹⁰⁷ Furthermore, methyl CpG binding protein 2 (MECP2) binds methylated DNA, recruits the H3K9me3 methyltransferase SUV3-9,⁵ and interacts with Sin3A, which brings HDAC to the histone of methylated DNA, thereby repressing gene transcription and antagonizing the transcription activating role of p300.¹⁰⁸

DNA demethylases TET1 and TET2 have different functions and are characterized by a distinct expression pattern in relation to EP300. TET1 regulates the 5mC levels at the promoters and transcription start sites, whereas TET2 demethylates CpG islands, gene bodies and cell-type-specific enhancers, particularly for highly expressed genes.¹⁰⁹ The similar expression pattern of TET2 and EP300 can be related to their functional relationship. p300 is involved in recruiting TET2 to chromatin through direct protein-protein interactions.¹¹⁰ In breast cancer cells, TET2 facilitated the proper recruitment of ER α to active enhancers,¹¹¹ which are then dynamically activated through a p300/CBP-catalyzed acetylation that promotes the recruitment of TFIID and RNAPII at enhancers and enhancer-regulated genes.¹¹²

The observed positive correlation between the mRNA level of RNA methyltransferases and EP300 can be explained by the fact that the H3K27 acetylation of METTL3 promoter regulates transcription of this methyltransferase.¹¹³ Such an interdependence in transcription control by p300 may also apply to other N⁶-adenosine-methyltransferases. However, in normal cells m6A destabilizes the EP300/CBP

transcript, thereby suggesting that METTL activity may protect cells from p300/CBP overexpression.¹¹⁴ The loss of the m6A reader protein YTHDF2 leads to the stabilization of the histone demethylase KDM6B transcript, increasing KDM6B abundance and declining the transcription repressive mark H3K27me3. Similarly, the methyltransferases METTL3 and METTL14 reduce the repressive histone mark H3K9me2 by a recruitment of KDM3B, which is mediated by the m6A reader protein YTHDC1. In various normal and cancer cell lines, the mRNA expression of *SETD2*, the histone methyltransferase of H3K36, positively correlated with the expression of the m6A writers METTL3, METTL14, and WTAP. Knockdown of *SETD2* or overexpression of the histone demethylase KDM4A drastically decreased global m6A levels, as well as genes such as *MYC*. METTL14 acts as a key player that recognizes and binds H3K36me3, linking m6A deposition with H3K36me3, which marks transcriptionally active regions.¹¹⁴ METTL3 was remarkably elevated in gastric cancer tissues, where it promoted cell proliferation via the SNHG3/miR-186-5p/cyclinD2 axis.¹¹⁵ Similarly, p300- and WDR5-dependent transcription of *MLL3* facilitated the malignant progression of cervical cancer by the regulation of *TXNDC5* expression.¹¹⁶

In summary, *EP300*-overexpressing cancers are characterized by gene expression-promoting profile, which starts with lowered level of DNMT3B and increased TET2, which likely cause hypomethylation of the subset of gene promoters, thereby promoting transcription permissive environment. Furthermore, m6A writers such as METTL3, METTL14, and WTAP play a role in the efficiency of mRNA splicing and RNA processing.

Co-expression of *EP300* and genes encoding subunits of SWI/SNF complex

Histone acetylation by p300 and its consequent impact on the gene transcription is mediated by the above-described histone, DNA modifying enzymes, and transcription factors, and by the bromodomain proteins, which adapt the chromatin structure to make DNA more or less accessible to transcription machinery. H3K27ac depletion by p300/cbp inhibition at both enhancers and promoters causes a clear reciprocal loss of multiple bromodomain-containing proteins including BRD2, BRD4, BRG1, and BRM from chromatin and transcriptional suppression of dependent genes.¹¹⁷ The expression of *EP300* positively correlates with SWI/SNF chromatin remodeling complex subunits such as *ARID1A*, *ARID2*, *PBRM1*, *SMARCA2* (BRM), and *SMARCB1*, but is associated with a low *SMARCA4* transcription (Figure 7D). The SWI/SNF complex subunits recruits p300 to distal enhancers, rather than promoters, inducing H3K27 acetylation and enhancer-associated gene transcription.³¹ In co-operation with BRD4 and BRG1, CBP/p300 plays an important role in inducing H3K27ac and the transcription of pluripotency genes, such as *OCT4* and *NANOG*.³¹ In addition, BRG1-dependent SWI/SNF was shown to enable the *EP300*-dependent transcription of proliferation and DNA repair genes from their E2F/CpG-driven promoters in breast cancer cells. BRG1/SWI/SNF-*EP300* complexes, accompanied by poly-ADP-ribose polymerase 1 (PARP1), was present at highly acetylated promoters of genes such as *CDK4*, *LIG1*, or *NEIL3*, which are

responsible for cancer cell growth and the removal of DNA damage.⁸⁶ Therefore, the lack of direct correlation between the transcription of *EP300* and *SMARCA4* in *EP300*-overexpressing cells may look surprising, but the high degree of overlap between BRG1 and BRM, which are mostly associated with active regulatory regions of the genome, may suggest that the two siblings replace each other at certain conditions.¹¹⁸ However, there is no direct evidence to support this hypothesis. *SMARCA4* is frequently mutated, truncated, and epigenetically silenced in various cancers, which become transcriptionally dependent on BRM, and BRG1 loss or decline is associated with a poor prognosis.¹¹⁹ Hence, the advantage of BRG1 silencing, which can act as tumor suppressor in *EP300*-overexpressing cells, can surpass the benefits of BRG1-p300 cooperation on chromatin that can be compensated by BRM.^{86,120} Suppression of SWI/SNF subunits in *EP300* repressed cancers may further limit unwanted gene transcription when the role of p300 is taken over by other acetyltransferases.¹²¹ The suppression of *SMARCA4* in *EP300*-overexpressing cancers is even more surprising in light of the weak but positive correlation between *EP300* and *PBRM1* expression. Product of the latter gene contains six tandem bromodomains, which are specialized in recognizing acetyl-lysine residues, thereby making *PBRM1* product an important reader of H3K14ac and a universal epigenetic marker of actively transcribing genes.¹²² Importantly, *PBRM1* marks only BRG1-dependent PBAF sub-complexes of SWI/SNF, so the functional impact of simultaneous p300 and *PBRM1* elevation with the likely deficiency of crucial PBAF subunit—BRG1 remains unknown.

The colorectal cancer study suggests that inhibition of histone deacetylation leads to increased *ARID1A* expression in LS180, HT29, and SW742 cells,¹²³ thereby linking elevated co-occurrence of *ARID1A* and *EP300*. *ARID1A* may function as a tumor suppressor through transcriptional downregulation of cancer stemness gene *ALDH1A1*, which is associated with reduced histone H3K27 acetylation in cholangiocarcinoma cells.¹²⁴ Another SWI/SNF gene—*ARID2*—that is co-expressed with *EP300* is known to inhibit metastasis of hepatocellular carcinoma cells by recruiting *DNMT1* to the promoter of genes, which belong to the Snail family. Elevated DNA methylation leads to suppression of Snail transcription.¹²⁵ Therefore, low *ARID2* mRNA level may link p300 declined cancers with their predisposition to metastasis as demonstrated in Figure 6D.

Concluding, expression of ARID domain-containing proteins such as *ARID1A/B* and *ARID2* positively correlates with expression of *EP300* in the subset of analyzed cancer samples, and to possibly facilitate P300-dependent gene transcription. SWI/SNF-driven chromatin remodeling most likely involves BRM in *EP300*-overexpressing cancers since expression of another ATPase of this complex—BRG1 is relatively low.

EP300 changes as a prognostic mark and therapeutic target

Pan-cancer studies demonstrate the link between the expression of *EP300* and improved cancer patient survival. However, the data indicate that both high and low expression of *EP300* may be associated with poor prognosis. High expression of p300 was followed by poor

overall survival in hepatocellular carcinoma, esophageal squamous cell carcinoma, nasopharyngeal cancer, breast cancer, cutaneous squamous cell carcinoma, and small cell lung cancer,⁷⁶ as well as non-small cell lung cancer.⁷⁸ Overexpression of *EP300* was associated with improved survival in non-small cell lung cancer, melanoma,⁷⁶ and glioblastoma.⁷⁷ In addition, it is indicated that both low and high expressions contribute to tumor invasiveness and resistance to chemotherapy. Therefore, personalized therapy seems to be a reasonable therapeutic approach in patients with dysregulated *EP300*. P300 status can be considered as an indicator for the use of EP300 inhibitors, HAT activators, or immunotherapy in anticancer therapy.

p300 declined cancers

The development of immune checkpoint inhibitor (ICI) therapy has opened a new era of anticancer therapy, with durable responses and significant survival benefits observed in many cancers.¹²⁶ The FDA has successfully approved three different categories of ICIs: PD-1 inhibitors (Nivolumab, Pembrolizumab, and Cemiplimab), PDL-1 inhibitors (Atezolimumab, Durvalumab, and Avelumab), and a CTLA-4 inhibitor (Ipilimumab).¹²⁷ However, a big group of patients do benefit from this approach to combat cancer. Consequently, increasing attention is being paid to the identification and development of predictive biomarkers of response to immune therapy. Tumor mutational burden, variations in DNA damage response pathways, neoantigen load (the number of mutations actually targeted by T cells), and PD-L1 expression¹²⁶ are listed among the most characteristic and promising features to discriminate patients for immune therapies. The ability of cytotoxic T cells and natural killer cells in the elimination of tumor cells and the tumor mutation burden as well as PD-L1 expression, was significantly higher in *EP300*-mutated than in *EP300*-wild-type cancers. These features indicated a favorable response to ICIs. Thus, the lack of *EP300* could be a predictive biomarker for a patient's response to immunotherapy.²⁸ Recent studies suggest that inactivating mutations in SWI/SNF, particularly subunits of in PBAF complex (*PBRM1*, *ARID2*, and *BRD7*) increase patient sensitivity to ICIs. Loss of function of SWI/SNF increased chromatin accessibility to transcription activators in IFN- γ -inducible genes in tumor cells, and subsequently increased production of chemokines, thereby leading to more effective recruitment of effector T cells to tumors.¹²⁶

In cancers characterized by the low expression of *EP300*, where activity of the enzyme is detrimental for cancer cell survival or proliferation, HAT activators and immunotherapy can be applied as a monotherapy or in combination with other drugs to improve the treatment outcome. To date, several p300 activators have been developed. These can be represented by CTB (cholera toxin B subunit) that induces acetylation of p53 by increasing the expression of p300 and consequently triggers cell death in a culture of breast cancer MCF-7 cells, while being well tolerated by normal lung MRC-5 fibroblasts.¹²⁸ YF2, a P300 and CBP HAT activator, has selective cytotoxicity in the *EP300*-mutated, diffuse large B cell lymphoma cell lines and induces acetylation of H3K14 and H3K27 as well as p53 *in vitro* and *in vivo*.¹²⁹ Moreover, YF2 upregulated the expression of several

MHC class I-II genes resulting in the activation of numerous immune regulatory signaling pathways, allowing for the synergic effect of YF2 and PD-L1 inhibitors.¹³⁰ The question whether p300 activators can be more potent in cancers characterized by the loss or decline of two and more acetyltransferases remains open, but the simultaneously low expression of p300 and other KAT family members provides a solid ground for such a hypothesis. Alike HAT activators, HDAC inhibitors are documented to attenuate tumor progression and improve immunotherapy. Inhibition of HDACs increases the immunogenicity of cancer cells by upregulating the expression of numerous compounds including components of the antigen-processing and presentation machinery, co-stimulatory molecules, stress-induced ligands, and death-inducing receptors, while simultaneously downregulating the expression of checkpoint ligands by tumor cells. The immune response is further enhanced by activation of the adaptive and innate host immune cells, which recognize and eliminate cancer cells.¹³¹ Some treatment schemes involving HDAC inhibitors combined with immune therapy have already demonstrated promising efficacy in various phases of pre-clinical and clinical trials.

EP300 overexpressed cancers

Patients diagnosed with cancers fueled by elevated p300 activity can possibly benefit from p300/CBP inhibitors. Several natural compounds block acetyltransferase activity of p300. These include garcinol, anacardic acidcurcumin,¹³² curcumin,¹³³ and carnosol.¹³⁴ Garcinol and anacardic acidcurcumin significantly reduce the invasive phenotype of rhabdomyosarcoma cells by inhibiting their growth rate, viability, and clonogenic ability. These compounds cause cell-cycle arrest in the G2/M phase and induce apoptosis.¹³² Garcinol prevents esophageal cancer metastasis *in vitro* and *in vivo*, suggesting its therapeutic potential for metastatic tumors.¹³⁵ Carnosol suppressed tumor growth and metastasis of breast cancer xenografts as well as strongly induced apoptosis in melanoma cells.^{136,137} A-485, C646, B026, L002, DCH36_06, CPI-1612, and PU141 represent small-molecule, synthetic inhibitors of CBP/p300 catalytic activity. These agents reduce the growth of cancers, including hormonal-responsive cancers, by inducing cell death, disturbing metabolic reprogramming of cancer cells and sensitizing cells to chemotherapy and immunotherapy.^{53,85,138-148} P300 inhibitor A-485 was suggested as possible effective anticancer treatment in *ARID1A*-mutated endometrial epithelium, where p300-dependent acetylation of super-enhancers promoted endometrial invasion in the absence of functional *ARID1A*. However, in *ARID1A*-proficient cancers inhibition of p300 may support *ARID1A*-based repression of genes responsible for migration such as *SERPINE1*.¹²¹ Identification of the bromodomain in the structure of p300 and CBP led to development of another group of inhibitors that interfere with acetyltransferase interaction with chromatin. Cell membrane-permeable compounds such as I-CBP112, SGC-CBP30, CPI-637, PF-CBP1, Y08197, GNE-781, and CCS1477 induce apoptosis, reduce growth and metastatic potential of cancers,^{149,150} growth of hormone-responsive cancers,^{79-81,147,151} sensitize cancer cells to immunotherapy,¹⁵² chemotherapy,^{149,150,153} and reverse drug-resistant phenotypes.⁸³ From the last synthetic group of CBP/p300 inhibitors, which simultaneously target the

bromodomain and the catalytic activity of acetyltransferases, NEO2734, NEO1132, and XP-524, there emerges promising anticancer approaches. NEO2734 substantially limits the proliferation of multiple cell lines. Although the cellular response and transcriptional changes in various lymphomas treated with NEO2734 were similar to either bromodomain and extra-terminal domain (BET) or CBP/EP300 inhibitors, the magnitude of NEO2734 was substantially higher.¹⁵⁴ NEO2734 and NEO1132 eliminated leukemic stem/progenitor cells in patient samples.¹⁵⁵ The dual BET/EP300 inhibitor XP-524 has a pronounced single-agent efficacy *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*, and in human pancreatic cancers. XP-524 *in vivo* led to extensive reprogramming of the pancreatic tumor microenvironment, sensitized murine carcinoma to ICIs and further extended survival, and in so doing provided evidence that the combined therapy XP-524 and immune checkpoint can be beneficial for at least some cancer patients.¹⁵⁶

Although the lack of specificity of p300 inhibitors is often considered as weak point, the simultaneous targeting of two or more acetyltransferases, which are overexpressed together with p300, may potentiate the effect of single p300 inhibition. The pan-inhibitor PU139, which blocks acetyltransferase activity of Gcn5, p300/CBP-associated factor (PCAF), CREB (cAMP response element-binding) protein (CBP), and p300, triggers caspase-independent cell death in cell culture, blocks growth of SK-N-SH neuroblastoma xenografts in mice and synergizes the cytotoxic effects with doxorubicin *in vivo*.¹³⁸ L002 reduces activity of p300, GCN5 (KAT2A), and PCAF (KAT2B), but their IC₅₀ varies from 1.98 to 34 μ M and 35 μ M, respectively.¹⁵⁷ Similarly, CBP/p300 bromodomain inhibitors interfere with the functioning of some BET family members, particularly with BRD4, which often associates with p300-containing and transcription-promoting complexes at the gene promoters and enhancers.¹⁵⁸ Therefore, an attempt to make use of p300 inhibitors for multi-KAT targeting likely requires far higher doses of these compounds, hence their adverse effects or toxicity may act as limiting factors.

Another approach with the target of declining p300 activity in cancer cells is the degradation of p300. The proteolysis-targeting chimera (PROTAC) compound termed “JQAD1” selectively targets EP300 for degradation. Cell treatment with JQAD1 causes loss of H3K27 acetylation and rapid neuroblastoma apoptosis, while showing a very limited toxicity to untransformed cells.¹⁵⁹ Another p300 degrader—dCBP-1—is exceptionally potent in killing multiple myeloma cells and can abolish the activity of the enhancer that drives MYC oncogene expression.¹⁶⁰ The genetic background as well as co-existed alteration in the expression and activity of other chromatin remodeling enzymes were not taken into consideration while testing anticancer efficacy of p300 degraders.

The new mode of synthetic lethality, which involves targeting p300 activity, can be taken into consideration in cancers that are fueled by p300 in the *SMARCA4*-mutated genotypes. The beneficial impact of BRG1 deficiency, widely described in primary tumors, for malig-

nant transition, cancer growth, and metastases may result from BRG1-mediated silencing of genes by the REST complex, which interacts with acetylated chromatin at the BRG1 binding sites in a fashion dependent on BRG1 bromodomain.¹⁶¹ If BRG1-REST-repressed genes emerge crucial for cancer well-being, then inhibition of histone acetylation by p300 or pan-acetyltransferase inhibitors may mirror the activity of mutated *SMARCA4*. Furthermore, simultaneous inhibition of p300/CBP and KDM6A was proposed as effective anticancer strategy since these two enzymes co-operate in activating oncogenic transcription.¹¹⁷ KDM6A, which is frequently overexpressed in parallel to p300, prevents suppression of oncogenes by antagonizing PRC2-mediated methylation of H3K27me1/2/3 in the absence of p300 activity. Interestingly, overexpression of p300 and KDM6A correlates negatively with the mRNA level of various HDAC family members, and this observation seems to be of crucial importance for the success of the suggested anticancer strategy involving prolonged inhibition of p300 and KDM6A. The loss of NCoR/SMRT complexes, which comprise HDAC3 as a catalytically active subunit, overcomes p300/CBP inhibition, and can possibly substantially limit beneficial effects of ip300- or ip300/iKDM6A-based anticancer therapies.¹¹⁷

SUMMARY

EP300 is frequently dysregulated in cancers. Some cancers are characterized by high expression and activity of EP300, which can serve as an indicator for the implementation of antagonizing or activating drugs in anticancer therapies. Despite extensive efforts and the development of many structurally different compounds capable of modulating p300 activity and expression, none have been accepted by the FDA for the treatment of malignancies. Immunotherapy and HAT activators seem promising for the treatment of cancers with *EP300* deleterious mutation and downregulation, but also require further investigation and testing in clinical trials. The observed interdependence between the expression of *EP300* and other chromatin remodeling enzymes and their documented functional crosstalk should be a prompt for considering the use of pan-acetyltransferase inhibitors and pan-bromodomain inhibitors in *EP300*-overexpressing cancers. Some of the above referred examples indicate likely limitation in the beneficial outcomes of p300 targeting in anticancer strategies, which result from mutations in other epigenetic factors. Although numerous options for up- and downregulation of p300 activity is currently available, the proper choice must be imposed by careful analysis of patient-specific genotype and co-existed mutations, which define the repertoire of chromatin and DNA remodeling enzymes capable of fine-tuning p300 role in cancer progression.

ACKNOWLEDGMENTS

Poland Ministry of Science and Higher Education, program “Inicjatywa doskonałości – uczelnia badawcza” (IDUB), grant no. IDUB-60/2021. The graphical abstract was created with [BioRender.com](https://www.biorender.com), agreement no. EG26IGNRI3.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, K.G. and A.R.; writing – original draft, K.G.; writing – review & editing, A.R.; formal analysis, K.G.; supervision, A.R.; funding acquisition, A.R.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

REFERENCES

- Shlyakhtina, Y., Moran, K.L., and Portal, M.M. (2021). Genetic and Non-Genetic Mechanisms Underlying Cancer Evolution. *Cancers* 13, 1380.
- Sahafnejad, Z., Ramazi, S., and Allahverdi, A. (2023). An Update of Epigenetic Drugs for the Treatment of Cancers and Brain Diseases: A Comprehensive Review. *Genes* 14, 873.
- Cavaliere, V. (2021). The Expanding Constellation of Histone Post-Translational Modifications in the Epigenetic Landscape. *Genes* 12, 1596.
- Jing, Y., Li, X., Liu, Z., and Li, X.D. (2022). Roles of Negatively Charged Histone Lysine Acylations in Regulating Nucleosome Structure and Dynamics. *Front. Mol. Biosci.* 9, 899013.
- Zhang, T., Cooper, S., and Brockdorff, N. (2015). The interplay of histone modifications - writers that read. *EMBO Rep.* 16, 1467–1481.
- Yang, Y., Zhang, M., and Wang, Y. (2022). The roles of histone modifications in tumorigenesis and associated inhibitors in cancer therapy. *J. Natl. Cancer Cent.* 2, 277–290. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2667005422000643>.
- Talbert, P.B., and Henikoff, S. (2021). The Yin and Yang of Histone Marks in Transcription. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 22, 147–170.
- Rajan, P.K., Udoh, U.-A., Sanabria, J.D., Banerjee, M., Smith, G., Schade, M.S., Sanabria, J., Sodhi, K., Pierre, S., Xie, Z., et al. (2020). The Role of Histone Acetylation-/Methylation-Mediated Apoptotic Gene Regulation in Hepatocellular Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 8894.
- Fallah, M.S., Szarics, D., Robson, C.M., and Eubanks, J.H. (2020). Impaired Regulation of Histone Methylation and Acetylation Underlies Specific Neurodevelopmental Disorders. *Front. Genet.* 11, 613098. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2020.613098>.
- Kang, Y., Kim, Y.W., Kang, J., and Kim, A. (2021). Histone H3K4me1 and H3K27ac play roles in nucleosome eviction and eRNA transcription, respectively, at enhancers. *FASEB J.* 35, e21781.
- Zhao, W., Xu, Y., Wang, Y., Gao, D., King, J., Xu, Y., and Liang, F.-S. (2021). Investigating crosstalk between H3K27 acetylation and H3K4 trimethylation in CRISPR/dCas-based epigenome editing and gene activation. *Sci. Rep.* 11, 15912. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95398-5>.
- Hwang, J.W., Cho, Y., Bae, G.-U., Kim, S.-N., and Kim, Y.K. (2021). Protein arginine methyltransferases: promising targets for cancer therapy. *Exp. Mol. Med.* 53, 788–808. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00613-y>.
- Liao, Q., Yang, J., Ge, S., Chai, P., Fan, J., and Jia, R. (2023). Novel insights into histone lysine methyltransferases in cancer therapy: From epigenetic regulation to selective drugs. *J. Pharm. Anal.* 13, 127–141. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177922001228>.
- Bure, I.V., Nemtsova, M.V., and Kuznetsova, E.B. (2022). Histone Modifications and Non-Coding RNAs: Mutual Epigenetic Regulation and Role in Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 5801.
- Dhar, G.A., Saha, S., Mitra, P., and Nag Chaudhuri, R. (2021). DNA methylation and regulation of gene expression: Guardian of our health. *Nucleus* 64, 259–270.
- Chen, C., Wang, Z., Ding, Y., Wang, L., Wang, S., Wang, H., and Qin, Y. (2022). DNA Methylation: From Cancer Biology to Clinical Perspectives. *Front. Biosci.* 27, 326.
- Zhang, F.-L., and Li, D.-Q. (2022). Targeting Chromatin-Remodeling Factors in Cancer Cells: Promising Molecules in Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 12815.
- Hyun, K., Jeon, J., Park, K., and Kim, J. (2017). Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Exp. Mol. Med.* 49, e324. <https://doi.org/10.1038/emmm.2017.11>.
- Swygert, S.G., and Peterson, C.L. (2014). Chromatin dynamics: interplay between remodeling enzymes and histone modifications. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 728–736.
- Srivastava, S., Kumar, S., Bhatt, R., Ramachandran, R., Trivedi, A.K., and Kundu, T.K. (2023). Lysine Acetyltransferases (KATs) in Disguise: Diseases Implications. *J. Biochem.* 173, 417–433.
- Pozziello, A., Nebbioso, A., Stunnenberg, H.G., Martens, J.H.A., Carafa, V., and Altucci, L. (2021). Recent insights into Histone Acetyltransferase-1: biological function and involvement in pathogenesis. *Epigenetics* 16, 838–850.
- Audia, J.E., and Campbell, R.M. (2016). Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 8, a019521.
- Di Cerbo, V., and Schneider, R. (2013). Cancers with wrong HATs: the impact of acetylation. *Brief. Funct. Genom.* 12, 231–243.
- Fermento, M.E., Gandini, N.A., Salomón, D.G., Ferronato, M.J., Vitale, C.A., Arévalo, J., López Romero, A., Nuñez, M., Jung, M., Facchinetti, M.M., and Curino, A.C. (2014). Inhibition of p300 suppresses growth of breast cancer. Role of p300 subcellular localization. *Exp. Mol. Pathol.* 97, 411–424.
- Bi, Y., Kong, P., Zhang, L., Cui, H., Xu, X., Chang, F., Yan, T., Li, J., Cheng, C., Song, B., et al. (2019). EP300 as an oncogene correlates with poor prognosis in esophageal squamous carcinoma. *J. Cancer* 10, 5413–5426.
- Li, Y., Yang, H.-X., Luo, R.-Z., Zhang, Y., Li, M., Wang, X., and Jia, W.-H. (2011). High expression of p300 has an unfavorable impact on survival in resectable esophageal squamous cell carcinoma. *Ann. Thorac. Surg.* 91, 1531–1538.
- Chen, M.-K., Cai, M.-Y., Luo, R.-Z., Tian, X., Liao, Q.-M., Zhang, X.-Y., and Han, J.-D. (2015). Overexpression of p300 correlates with poor prognosis in patients with cutaneous squamous cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.* 172, 111–119.
- Chen, Z., Chen, C., Li, L., Zhang, T., and Wang, X. (2021). Pan-Cancer Analysis Reveals That E1A Binding Protein p300 Mutations Increase Genome Instability and Antitumor Immunity. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 729927.
- Attar, N., and Kurdistani, S.K. (2017). Exploitation of EP300 and CREBBP Lysine Acetyltransferases by Cancer. *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* 7, a026534.
- Zhu, Y., Wang, Z., Li, Y., Peng, H., Liu, J., Zhang, J., and Xiao, X. (2023). The Role of CREBBP/EP300 and Its Therapeutic Implications in Hematological Malignancies. *Cancers* 15, 1219.
- Chen, Q., Yang, B., Liu, X., Zhang, X.D., Zhang, L., and Liu, T. (2022). Histone acetyltransferases CBP/p300 in tumorigenesis and CBP/p300 inhibitors as promising novel anticancer agents. *Theranostics* 12, 4935–4948.
- Kandagalla, S., Shekarappa, S.B., Rimac, H., Grishina, M.A., Potemkin, V.A., and Hanumanthappa, M. (2020). Computational insights into the binding mode of curcumin analogues against EP300 HAT domain as potent acetyltransferase inhibitors. *J. Mol. Graph. Model.* 101, 107756.
- Rack, J.G.M., Lutter, T., Kjærøng Bjerga, G.E., Guder, C., Ehrhardt, C., Värvi, S., Ziegler, M., and Aasland, R. (2014). The PHD finger of p300 influences its ability to acetylate histone and non-histone targets. *J. Mol. Biol.* 426, 3960–3972.
- Wang, F., Marshall, C.B., and Ikura, M. (2013). Transcriptional/epigenetic regulator CBP/p300 in tumorigenesis: structural and functional versatility in target recognition. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 3989–4008.
- Xu, L., Xuan, H., He, W., Zhang, L., Huang, M., Li, K., Wen, H., Xu, H., and Shi, X. (2023). TAZ2 truncation confers overactivation of p300 and cellular vulnerability to HDAC inhibition. *Nat. Commun.* 14, 5362.
- Henry, R.A., Kuo, Y.-M., and Andrews, A.J. (2013). Differences in Specificity and Selectivity Between CBP and p300 Acetylation of Histone H3 and H3/H4. *Biochemistry* 52, 5746–5759. <https://doi.org/10.1021/bi400684q>.
- Faiola, F., Liu, X., Lo, S., Pan, S., Zhang, K., Lyman, E., Farina, A., and Martinez, E. (2005). Dual regulation of c-Myc by p300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover and coactivation of Myc-induced transcription. *Mol. Cell Biol.* 25, 10220–10234.
- Pattabiraman, D.R., McGirr, C., Shakhbazov, K., Barbier, V., Krishnan, K., Mukhopadhyay, P., Hawthorne, P., Trezise, A., Ding, J., Grimmond, S.M., et al. (2014). Interaction of c-Myb with p300 is required for the induction of acute myeloid leukemia (AML) by human AML oncogenes. *Blood* 123, 2682–2690.
- Geng, X., Wang, C., Gao, X., Chowdhury, P., Weiss, J., Villegas, J.A., Saed, B., Perera, T., Hu, Y., Reneau, J., et al. (2022). GATA-3 is a proto-oncogene in T-cell lymphoproliferative neoplasms. *Blood Cancer J.* 12, 149.
- Ito, A., Lai, C.H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M.H., Appella, E., and Yao, T.P. (2001). p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J.* 20, 1331–1340.

41. Kannan, S., Partridge, A.W., Lane, D.P., and Verma, C.S. (2019). The Dual Interactions of p53 with MDM2 and p300: Implications for the Design of MDM2 Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, 5996.
42. Wang, W., Pan, K., Chen, Y., Huang, C., and Zhang, X. (2012). The acetylation of transcription factor HBP1 by p300/CBP enhances p16INK4A expression. *Nucleic Acids Res.* *40*, 981–995.
43. Choi, J.-R., Lee, S.-Y., Shin, K.S., Choi, C.Y., and Kang, S.J. (2017). p300-mediated acetylation increased the protein stability of HIPK2 and enhanced its tumor suppressor function. *Sci. Rep.* *7*, 16136. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16489-w>.
44. Shiota, M., Yokomizo, A., Kashiwagi, E., Tada, Y., Inokuchi, J., Tatsugami, K., Kuroiwa, K., Uchiumi, T., Seki, N., and Naito, S. (2010). Foxo3a expression and acetylation regulate cancer cell growth and sensitivity to cisplatin. *Cancer Sci.* *101*, 1177–1185.
45. Mahmud, Z., Gomes, A.R., Lee, H.J., Aimjongjun, S., Jiramongkol, Y., Yao, S., Zona, S., Alasiri, G., Gong, G., Yagüe, E., and Lam, E.W.F. (2019). EP300 and SIRT1/6 Co-Regulate Lapatinib Sensitivity Via Modulating FOXO3-Acetylation and Activity in Breast Cancer. *Cancers* *11*, 1067.
46. Galbiati, L., Mendoza-Maldonado, R., Gutierrez, M.I., and Giacca, M. (2005). Regulation of E2F-1 after DNA damage by p300-mediated acetylation and ubiquitination. *Cell Cycle* *4*, 930–939.
47. Manickavinayagam, S., Vélez-Cruz, R., Biswas, A.K., Bedford, E., Klein, B.J., Kutateladze, T.G., Liu, B., Bedford, M.T., and Johnson, D.G. (2019). E2F1 acetylation directs p300/CBP-mediated histone acetylation at DNA double-strand breaks to facilitate repair. *Nat. Commun.* *10*, 4951.
48. Hassa, P.O., Haenni, S.S., Buerki, C., Meier, N.I., Lane, W.S., Owen, H., Gersbach, M., Imhof, R., and Hottiger, M.O. (2005). Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* *280*, 40450–40464.
49. Jayatunga, M.K.P., Thompson, S., McKee, T.C., Chan, M.C., Reece, K.M., Hardy, A.P., Sekirnik, R., Seden, P.T., Cook, K.M., McMahon, J.B., et al. (2015). Inhibition of the HIF1 α -p300 interaction by quinone- and indandione-mediated ejection of structural Zn(II). *Eur. J. Med. Chem.* *94*, 509–516.
50. Wang, R., Cherukuri, P., and Luo, J. (2005). Activation of Stat3 sequence-specific DNA binding and transcription by p300/CREB-binding protein-mediated acetylation. *J. Biol. Chem.* *280*, 11528–11534.
51. Wang, Y., Liu, Y., Wang, C., Kang, R., Tang, D., and Liu, J. (2023). EP300 promotes ferroptosis via HSPA5 acetylation in pancreatic cancer. *Sci. Rep.* *13*, 15004. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42136-8>.
52. Jin, L., Garcia, J., Chan, E., de la Cruz, C., Segal, E., Merchant, M., Kharbanda, S., Raisner, R., Haverty, P.M., Modrusan, Z., et al. (2017). Therapeutic Targeting of the CBP/p300 Bromodomain Blocks the Growth of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Res.* *77*, 5564–5575. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0314>.
53. Bommi-Reddy, A., Park-Chouinard, S., Mayhew, D.N., Terzo, E., Hingway, A., Steinbaugh, M.J., Wilson, J.E., Sims, R.J., 3rd, and Conery, A.R. (2022). CREBBP/EP300 acetyltransferase inhibition disrupts FOXA1-bound enhancers to inhibit the proliferation of ER+ breast cancer cells. *PLoS One* *17*, e0262378.
54. Gao, J., Aksoy, B.A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S.O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., et al. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal.* *6*, p11.
55. Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B.E., Sumer, S.O., Aksoy, B.A., Jacobsen, A., Byrne, C.J., Heuer, M.L., Larsson, E., et al. (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* *2*, 401–404.
56. Pon, J.R., and Marra, M.A. (2015). Driver and Passenger Mutations in Cancer. *Annu. Rev. Pathol.* *10*, 25–50. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012414-040312>.
57. Karagiannakos, A., Adamaki, M., Tsintarakis, A., Vojtesek, B., Fähræus, R., Zoumpourlis, V., and Karakostas, K. (2022). Targeting Oncogenic Pathways in the Era of Personalized Oncology: A Systemic Analysis Reveals Highly Mutated Signaling Pathways in Cancer Patients and Potential Therapeutic Targets. *Cancers* *14*, 664.
58. Gao, Y.-B., Chen, Z.-L., Li, J.-G., Hu, X.-D., Shi, X.-J., Sun, Z.-M., Zhang, F., Zhao, Z.-R., Li, Z.-T., Liu, Z.-Y., et al. (2014). Genetic landscape of esophageal squamous cell carcinoma. *Nat. Genet.* *46*, 1097–1102.
59. Duex, J.E., Swain, K.E., Dancik, G.M., Paucek, R.D., Owens, C., Churchill, M.E.A., and Theodorescu, D. (2018). Functional Impact of Chromatin Remodeling Gene Mutations and Predictive Signature for Therapeutic Response in Bladder Cancer. *Mol. Cancer Res.* *16*, 69–77.
60. DeBoever, C., Tanigawa, Y., Lindholm, M.E., McInnes, G., Lavertu, A., Ingelsson, E., Chang, C., Ashley, E.A., Bustamante, C.D., Daly, M.J., and Rivas, M.A. (2018). Medical relevance of protein-truncating variants across 337,205 individuals in the UK Biobank study. *Nat. Commun.* *9*, 1612. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03910-9>.
61. Tang, Z., Kang, B., Li, C., Chen, T., and Zhang, Z. (2019). GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Res.* *47*, W556–W560.
62. Shao, X., Lv, N., Liao, J., Long, J., Xue, R., Ai, N., Xu, D., and Fan, X. (2019). Copy number variation is highly correlated with differential gene expression: a pan-cancer study. *BMC Med. Genet.* *20*, 175. <https://doi.org/10.1186/s12881-019-0909-5>.
63. Bhattacharya, A., Bense, R.D., Urzúa-Traslaviña, C.G., de Vries, E.G.E., van Vugt, M.A.T.M., and Fehrmann, R.S.N. (2020). Transcriptional effects of copy number alterations in a large set of human cancers. *Nat. Commun.* *11*, 715. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14605-5>.
64. Telloni, S.M. (2017). In Tumor Staging and Grading: A Primer BT - Molecular Profiling: Methods and Protocols, V. Espina, ed. (Springer New York), pp. 1–17. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6_1.
65. Trikalinos, N.A., Tan, B.R., Amin, M., Liu, J., Govindan, R., and Morgensztern, D. (2020). Effect of metastatic site on survival in patients with neuroendocrine neoplasms (NENs). An analysis of SEER data from 2010 to 2014. *BMC Endocr. Disord.* *20*, 44. <https://doi.org/10.1186/s12902-020-0525-6>.
66. Jögi, A., Vaapil, M., Johansson, M., and Pählman, S. (2012). Cancer cell differentiation heterogeneity and aggressive behavior in solid tumors. *Ups. J. Med. Sci.* *117*, 217–224.
67. Wasif, N., Ko, C.Y., Farrell, J., Wainberg, Z., Hines, O.J., Reber, H., and Tomlinson, J.S. (2010). Impact of Tumor Grade on Prognosis in Pancreatic Cancer: Should We Include Grade in AJCC Staging? *Ann. Surg. Oncol.* *17*, 2312–2320. <https://doi.org/10.1245/s10434-010-1071-7>.
68. Czerwinska, P., and Mackiewicz, A.A. (2023). Bromodomain (BrD) Family Members as Regulators of Cancer Stemness-A Comprehensive Review. *Int. J. Mol. Sci.* *24*, 995.
69. Ring, A., Kaur, P., and Lang, J.E. (2020). EP300 knockdown reduces cancer stem cell phenotype, tumor growth and metastasis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* *20*, 1076.
70. Zhong, Z., Harmston, N., Wood, K.C., Madan, B., and Virshup, D.M. (2022). A p300/GATA6 axis determines differentiation and Wnt dependency in pancreatic cancer models. *J. Clin. Invest.* *132*, e156305. <https://doi.org/10.1172/JCI156305>.
71. Mahmud, Z., Asaduzzaman, M., Kumar, U., Masrou, N., Jugov, R., Coombes, R.C., Shousha, S., Hu, Y., Lam, E.W.-F., and Yagüe, E. (2019). Oncogenic EP300 can be targeted with inhibitors of aldo-keto reductases. *Biochem. Pharmacol.* *163*, 391–403.
72. Rosen, R.D., and Sapra, A. (2023). TNM Classification (StatPearls Publishing). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553187/>.
73. Huh, J.W., Kim, H.C., Kim, S.H., Park, Y.A., Cho, Y.B., Yun, S.H., Lee, W.Y., and Chun, H.-K. (2013). Prognostic impact of p300 expression in patients with colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.* *108*, 374–377. <https://doi.org/10.1002/jso.23405>.
74. Naxerova, K., Reiter, J.G., Brachtel, E., Lennerz, J.K., van de Wetering, M., Rowan, A., Cai, T., Clevers, H., Swanton, C., Nowak, M.A., et al. (2017). Origins of lymphatic and distant metastases in human colorectal cancer. *Science* *357*, 55–60. <https://doi.org/10.1126/science.aai8515>.
75. Puccini, A., Seeber, A., Xiu, J., Goldberg, R.M., Soldato, D., Grothey, A., Shields, A.F., Salem, M.E., Battaglin, F., Berger, M.D., et al. (2021). Molecular differences between lymph nodes and distant metastases compared with primaries in colorectal cancer patients. *npj Precis. Oncol.* *5*, 95. <https://doi.org/10.1038/s41698-021-00230-y>.

76. Liu, Z., He, Y., Lian, X., Zou, H., Huang, Y., Wang, N., Hu, J., Cui, X., Zhao, J., Zhang, W., et al. (2019). Prognostic role of upregulated P300 expression in human cancers: A clinical study of synovial sarcoma and a meta-analysis. *Exp. Ther. Med.* *18*, 3161–3171. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7906>.
77. Miller, C.A., Settle, S.H., Sulman, E.P., Aldape, K.D., and Milosavljevic, A. (2011). Discovering functional modules by identifying recurrent and mutually exclusive mutational patterns in tumors. *BMC Med. Genom.* *4*, 34.
78. Hou, X., Li, Y., Luo, R.-Z., Fu, J.-H., He, J.-H., Zhang, L.-J., and Yang, H.-X. (2012). High expression of the transcriptional co-activator p300 predicts poor survival in resectable non-small cell lung cancers. *Eur. J. Surg. Oncol.* *38*, 523–530.
79. Caligiuri, M., Williams, G.L., Castro, J., Battalagine, L., Wilker, E., Yao, L., Schiller, S., Toms, A., Li, P., Pardo, E., et al. (2023). FT-6876, a Potent and Selective Inhibitor of CBP/p300, is Active in Preclinical Models of Androgen Receptor-Positive Breast Cancer. *Targeted Oncol.* *18*, 269–285. <https://doi.org/10.1007/s11523-023-00949-7>.
80. Garcia-Carpizo, V., Ruiz-Llorente, S., Sarmentero, J., González-Corpas, A., and Barrero, M.J. (2019). CREBBP/EP300 Bromodomain Inhibition Affects the Proliferation of AR-Positive Breast Cancer Cell Lines. *Mol. Cancer Res.* *17*, 720–730.
81. Zou, L.-J., Xiang, Q.-P., Xue, X.-Q., Zhang, C., Li, C.-C., Wang, C., Li, Q., Wang, R., Wu, S., Zhou, Y.-L., et al. (2019). Y08197 is a novel and selective CBP/EP300 bromodomain inhibitor for the treatment of prostate cancer. *Acta Pharmacol. Sin.* *40*, 1436–1447.
82. Gruber, M., Ferrone, L., Pühr, M., Santer, F.R., Furlan, T., Eder, I.E., Sampson, N., Schäfer, G., Handle, F., and Culig, Z. (2020). p300 is upregulated by docetaxel and is a target in chemoresistant prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* *27*, 187–198.
83. Strachowska, M., Gronkowska, K., Sobczak, M., Grodzicka, M., Michlewska, S., Kolacz, K., Sarkar, T., Korszun, J., Ionov, M., and Robaszkiewicz, A. (2023). I-CBP112 declines overexpression of ATP-binding cassette transporters and sensitized drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines to chemotherapy drugs. *Biomed. Pharmacother.* *168*, 115798. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332223015962>.
84. Sobczak, M., Strachowska, M., Gronkowska, K., and Robaszkiewicz, A. (2022). Activation of ABCG Genes by Cisplatin Depends on the CoREST Occurrence at Their Promoters in A549 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Cancers* *14*, 894. <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/4/894/htm>.
85. Ono, H., Basson, M.D., and Ito, H. (2016). P300 inhibition enhances gemcitabine-induced apoptosis of pancreatic cancer. *Oncotarget* *7*, 51301–51310.
86. Sobczak, M., Pitt, A.R., Spickett, C.M., and Robaszkiewicz, A. (2019). PARP1 Co-regulates EP300–BRG1-dependent transcription of genes involved in breast cancer cell proliferation and DNA repair. *Cancers* *11*, 1539–1618.
87. Moon, J.J., Lu, A., and Moon, C. (2019). Role of genomic instability in human carcinogenesis. *Exp. Biol. Med.* *244*, 227–240.
88. Barreto-Galvez, A., Niljkar, M., Gagliardi, J., Zhang, R., Kumar, V., Juruwala, A., Pradeep, A., Shaikh, A., Tiwari, P., Sharma, K., et al. (2023). Acetyl transferase EP300 deficiency leads to chronic replication stress mediated by defective fork protection at stalled replication forks. Preprint at bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.04.29.538781>.
89. Lawlor, R.T., Mattioli, P., Mafficini, A., Hong, S.-M., Piredda, M.L., Taormina, S.V., Malleo, G., Marchegiani, G., Pea, A., Salvia, R., et al. (2021). Tumor Mutational Burden as a Potential Biomarker for Immunotherapy in Pancreatic Cancer: Systematic Review and Still-Open Questions. *Cancers* *13*, 3119.
90. Grossman, S.R. (2001). p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur. J. Biochem.* *268*, 2773–2778. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02226.x>.
91. Krubasik, D., Iyer, N.G., English, W.R., Ahmed, A.A., Vias, M., Roskelley, C., Brenton, J.D., Caldas, C., and Murphy, G. (2006). Absence of p300 induces cellular phenotypic changes characteristic of epithelial to mesenchyme transition. *Br. J. Cancer* *94*, 1326–1332.
92. Asaduzzaman, M., Constantinou, S., Min, H., Gallon, J., Lin, M.-L., Singh, P., Raguz, S., Ali, S., Shousha, S., Coombes, R.C., et al. (2017). Tumour suppressor EP300, a modulator of paclitaxel resistance and stemness, is downregulated in metaplastic breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *163*, 461–474.
93. Zhou, Y., Hu, Y., Yang, M., Jat, P., Li, K., Lombardo, Y., Xiong, D., Coombes, R.C., Raguz, S., and Yagüe, E. (2014). The miR-106b~25 cluster promotes bypass of doxorubicin-induced senescence and increase in motility and invasion by targeting the E-cadherin transcriptional activator EP300. *Cell Death Differ.* *21*, 462–474.
94. Takeuchi, A., Shiota, M., Tatsugami, K., Yokomizo, A., Tanaka, S., Kuroiwa, K., Eto, M., and Naito, S. (2012). p300 mediates cellular resistance to doxorubicin in bladder cancer. *Mol. Med. Rep.* *5*, 173–176.
95. Hu, Y., Li, K., Asaduzzaman, M., Cuella, R., Shi, H., Raguz, S., Coombes, R.C., Zhou, Y., and Yagüe, E. (2016). MiR-106b~25 cluster regulates multidrug resistance in an ABC transporter-independent manner via downregulation of EP300. *Oncol. Rep.* *35*, 1170–1178.
96. Zheng, Y., Ma, L., and Sun, Q. (2021). Clinically-Relevant ABC Transporter for Anti-Cancer Drug Resistance. *Front. Pharmacol.* *12*, 648407. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.648407>.
97. Cheng, X., Côté, V., and Côté, J. (2021). NuA4 and SAGA acetyltransferase complexes cooperate for repair of DNA breaks by homologous recombination. *PLoS Genet.* *17*, e1009459.
98. Li, X., Yang, H., Huang, S., and Qiu, Y. (2014). Histone deacetylase 1 and p300 can directly associate with chromatin and compete for binding in a mutually exclusive manner. *PLoS One* *9*, e94523.
99. Rubio, K., Singh, I., Dobersch, S., Sarvari, P., Günther, S., Cordero, J., Mehta, A., Wujak, L., Cabrera-Fuentes, H., Chao, C.-M., et al. (2019). Inactivation of nuclear histone deacetylases by EP300 disrupts the MiCEE complex in idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat. Commun.* *10*, 2229. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10066-7>.
100. Yuan, C., Zhang, J., Deng, C., Xia, Y., Li, B., Meng, S., Jin, X., Cheng, L., Li, H., Zhang, C., and He, Y. (2022). Crosstalk of Histone and RNA Modifications Identified a Stromal-Activated Subtype with Poor Survival and Resistance to Immunotherapy in Gastric Cancer. *Front. Pharmacol.* *13*, 868830.
101. Suganuma, T., and Workman, J.L. (2008). Crosstalk among Histone Modifications. *Cell* *135*, 604–607.
102. Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* *21*, 381–395.
103. Wang, W.-P., Tzeng, T.-Y., Wang, J.-Y., Lee, D.-C., Lin, Y.-H., Wu, P.-C., Chen, Y.-P., Chiu, I.-M., and Chi, Y.-H. (2012). The EP300, KDM5A, KDM6A and KDM6B chromatin regulators cooperate with KLF4 in the transcriptional activation of POU5F1. *PLoS One* *7*, e25256.
104. He, D., Zhang, X., and Tu, J. (2020). Diagnostic significance and carcinogenic mechanism of pan-cancer gene POU5F1 in liver hepatocellular carcinoma. *Cancer Med.* *9*, 8782–8800. <https://doi.org/10.1002/cam4.3486>.
105. Ando, M., Saito, Y., Xu, G., Bui, N.Q., Medetgul-Ernar, K., Pu, M., Fisch, K., Ren, S., Sakai, A., Fukusumi, T., et al. (2019). Chromatin dysregulation and DNA methylation at transcription start sites associated with transcriptional repression in cancers. *Nat. Commun.* *10*, 2188.
106. Zhang, J., Yang, C., Wu, C., Cui, W., and Wang, L. (2020). DNA Methyltransferases in Cancer: Biology, Paradox, Aberrations, and Targeted Therapy. *Cancers* *12*, 2123.
107. Li, Y., Chen, X., and Lu, C. (2021). The interplay between DNA and histone methylation: molecular mechanisms and disease implications. *EMBO Rep.* *22*, e51803.
108. Lee, H.-T., Oh, S., Ro, D.H., Yoo, H., and Kwon, Y.-W. (2020). The Key Role of DNA Methylation and Histone Acetylation in Epigenetics of Atherosclerosis. *J. Lipid Atheroscler.* *9*, 419–434.
109. Huang, Y., Chavez, L., Chang, X., Wang, X., Pastor, W.A., Kang, J., Zepeda-Martinez, J.A., Pape, U.J., Jacobsen, S.E., Peters, B., and Rao, A. (2014). Distinct roles of the methylcytosine oxidases Tet1 and Tet2 in mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *111*, 1361–1366.
110. Rasmussen, K.D., Berest, I., Kefler, S., Nishimura, K., Simón-Carrasco, L., Vassiliou, G.S., Pedersen, M.T., Christensen, J., Zaugg, J.B., and Helin, K. (2019). TET2 binding to enhancers facilitates transcription factor recruitment in hematopoietic cells. *Genome Res.* *29*, 564–575.
111. Wang, L., Ozark, P.A., Smith, E.R., Zhao, Z., Marshall, S.A., Rendleman, E.J., Piunti, A., Ryan, C., Whelan, A.L., Helmin, K.A., et al. (2018). TET2 coactivates gene expression through demethylation of enhancers. *Sci. Adv.* *4*, eaau6986.
112. Narita, T., Ito, S., Higashijima, Y., Chu, W.K., Neumann, K., Walter, J., Satpathy, S., Liebner, T., Hamilton, W.B., Maskey, E., et al. (2021). Enhancers are activated by

- p300/CBP activity-dependent PIC assembly, RNAPII recruitment, and pause release. *Mol. Cell* 81, 2166–2182.e6.
113. He, L., Li, H., Wu, A., Peng, Y., Shu, G., and Yin, G. (2019). Functions of N6-methyladenosine and its role in cancer. *Mol. Cancer* 18, 176. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1109-9>.
 114. Kan, R.L., Chen, J., and Sallam, T. (2022). Crosstalk between epitranscriptomic and epigenetic mechanisms in gene regulation. *Trends Genet.* 38, 182–193.
 115. Ji, G., Wang, X., and Xi, H. (2023). METTL3-mediated m(6)A modification of lncRNA SNHG3 accelerates gastric cancer progression by modulating miR-186-5p/cyclinD2 axis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 37, 3946320231204694.
 116. Du, Q.-Y., Huo, F.-C., Du, W.-Q., Sun, X.-L., Jiang, X., Zhang, L.-S., and Pei, D.-S. (2022). METTL3 potentiates progression of cervical cancer by suppressing ER stress via regulating m6A modification of TXNDC5 mRNA. *Oncogene* 41, 4420–4432.
 117. Hogg, S.J., Motorna, O., Cluse, L.A., Johanson, T.M., Coughlan, H.D., Raviram, R., Myers, R.M., Costacurta, M., Todorovski, I., Pijpers, L., et al. (2021). Targeting histone acetylation dynamics and oncogenic transcription by catalytic P300/CBP inhibition. *Mol. Cell* 81, 2183–2200.e13. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276521003208>.
 118. Raab, J.R., Runge, J.S., Spear, C.C., and Magnuson, T. (2017). Co-regulation of transcription by BRG1 and BRM, two mutually exclusive SWI/SNF ATPase subunits. *Epigenet. Chromatin* 10, 62. <https://epigeneticsandchromatin.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13072-017-0167-8>.
 119. Marquez-Vilendrer, S.B., Thompson, K., Lu, L., and Reisman, D. (2016). Mechanism of BRG1 silencing in primary cancers. *Oncotarget* 7, 56153–56169.
 120. Strobeck, M.W., Reisman, D.N., Gunawardena, R.W., Betz, B.L., Angus, S.P., Knudsen, K.E., Kowalik, T.F., Weissman, B.E., and Knudsen, E.S. (2002). Compensation of BRG-1 function by Brm: insight into the role of the core SWI-SNF subunits in retinoblastoma tumor suppressor signaling. *J. Biol. Chem.* 277, 4782–4789.
 121. Wilson, M.R., Reske, J.J., Holladay, J., Neupane, S., Ngo, J., Cuthrell, N., Wegener, M., Rhodes, M., Adams, M., Sheridan, R., et al. (2020). ARID1A Mutations Promote P300-Dependent Endometrial Invasion through Super-Enhancer Hyperacetylation. *Cell Rep.* 33, 108366.
 122. Liao, L., Alica-Velázquez, N.L., Langbein, L., Niu, X., Cai, W., Cho, E.-A., Zhang, M., Greer, C.B., Yan, Q., Cosgrove, M.S., et al. (2019). High affinity binding of H3K14ac through collaboration of bromodomains 2, 4 and 5 is critical for the molecular and tumor suppressor functions of PBRM1. *Mol. Oncol.* 13, 811–828. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12434>.
 123. Erfani, M., Zamani, M., and Mokarram, P. (2022). Evidence of histone modification affecting ARID1A expression in colorectal cancer cell lines. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench* 15, 32–38.
 124. Yoshino, J., Akiyama, Y., Shimada, S., Ogura, T., Ogawa, K., Ono, H., Mitsunori, Y., Ban, D., Kudo, A., Yamaoka, S., et al. (2020). Loss of ARID1A induces a stemness gene ALDH1A1 expression with histone acetylation in the malignant subtype of cholangiocarcinoma. *Carcinogenesis* 41, 734–742.
 125. Jiang, H., Cao, H.-J., Ma, N., Bao, W.-D., Wang, J.-J., Chen, T.-W., Zhang, E.-B., Yuan, Y.-M., Ni, Q.-Z., Zhang, F.-K., et al. (2020). Chromatin remodeling factor ARID2 suppresses hepatocellular carcinoma metastasis via DNMT1-SnaI axis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117, 4770–4780. <https://doi.org/10.1073/pnas.1914937117>.
 126. Bai, R., Lv, Z., Xu, D., and Cui, J. (2020). Predictive biomarkers for cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors. *Biomark. Res.* 8, 34. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00209-0>.
 127. Shiravand, Y., Khodadadi, F., Kashani, S.M.A., Hosseini-Fard, S.R., Hosseini, S., Sadeghirad, H., Ladwa, R., O'Byrne, K., and Kulasinghe, A. (2022). Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy. *Curr. Oncol.* 29, 3044–3060.
 128. Dastjerdi, M.N., Salahshoor, M.R., Mardani, M., Hashemibeni, B., and Roshankhah, S. (2013). The effect of CTB on P53 protein acetylation and consequence apoptosis on MCF-7 and MRC-5 cell lines. *Adv. Biomed. Res.* 2, 24.
 129. Liu, Y., Fiorito, J., Gonzalez, Y., Estrella, B., Calcagno, E., Zuccarello, E., Hwang, H., Honig, B., Deng, S., Landry, D., et al. (2019). Strategy for Overcoming Crebbp and EP300 Mutations in Lymphoma: Development of First-in-Class HAT Activators. *Blood* 134, 4068. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497118619962>.
 130. Estrella, B., Pazos, M.A., II, Ricker, E.C., Ryu, Y.K., Piorczynski, T.B., Liu, Y., Tolu, S., and Amengual, J.E. (2022). First-in-Class Histone Acetyltransferase (HAT) Activator, YF2, Modulates Immune Evasion in DLBCL, Enhancing the Effects of Immune Checkpoint Blockade. *Blood* 140, 358–359. <https://doi.org/10.1182/blood-2022-166929>.
 131. Sun, W., Lv, S., Li, H., Cui, W., and Wang, L. (2018). Enhancing the Anticancer Efficacy of Immunotherapy through Combination with Histone Modification Inhibitors. *Genes* 9, 633.
 132. Tomasiak, P., Janisiak, J., Rogińska, D., Perużyńska, M., Machaliński, B., and Tarnowski, M. (2023). Garcinol and Anacardic Acid, Natural Inhibitors of Histone Acetyltransferases, Inhibit Rhabdomyosarcoma Growth and Proliferation. *Molecules* 28, 5292.
 133. Marcu, M.G., Jung, Y.-J., Lee, S., Chung, E.-J., Lee, M.-J., Trepel, J., and Neckers, L. (2006). Curcumin is an inhibitor of p300 histone acetyltransferase. *Med. Chem.* 2, 169–174.
 134. Alsamri, H., Hasasna, H.E., Baby, B., Alneyadi, A., Dhaheiri, Y.A., Ayoub, M.A., Eid, A.H., Vijayan, R., and Iratni, R. (2021). Carnosol Is a Novel Inhibitor of p300 Acetyltransferase in Breast Cancer. *Front. Oncol.* 11, 664403. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.664403>.
 135. Wang, J., Wu, M., Zheng, D., Zhang, H., Lv, Y., Zhang, L., Tan, H.-S., Zhou, H., Lao, Y.-Z., and Xu, H.-X. (2020). Garcinol inhibits esophageal cancer metastasis by suppressing the p300 and TGF- β 1 signaling pathways. *Acta Pharmacol. Sin.* 41, 82–92.
 136. Choi, S.M., Kim, D.-H., Chun, K.-S., and Choi, J.-S. (2019). Carnosol induces apoptotic cell death through ROS-dependent inactivation of STAT3 in human melanoma G361 cells. *Appl. Biol. Chem.* 62, 55. <https://doi.org/10.1186/s13765-019-0463-z>.
 137. Alsamri, H., El Hasasna, H., Al Dhaheiri, Y., Eid, A.H., Attoub, S., and Iratni, R. (2019). Carnosol, a Natural Polyphenol, Inhibits Migration, Metastasis, and Tumor Growth of Breast Cancer via a ROS-Dependent Proteasome Degradation of STAT3. *Front. Oncol.* 9, 743. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.00743>.
 138. Gajer, J.M., Furdas, S.D., Gründer, A., Gothwal, M., Heinicke, U., Keller, K., Colland, F., Fulda, S., Pahl, H.L., Fichtner, I., et al. (2015). Histone acetyltransferase inhibitors block neuroblastoma cell growth *in vivo*. *Oncogenesis* 4, e137.
 139. Yang, H., Pinello, C.E., Luo, J., Li, D., Wang, Y., Zhao, L.Y., Jahn, S.C., Saldanha, S.A., Chase, P., Planck, J., et al. (2013). Small-molecule inhibitors of acetyltransferase p300 identified by high-throughput screening are potent anticancer agents. *Mol. Cancer Therapeut.* 12, 610–620.
 140. Ono, H., Kato, T., Murase, Y., Nakamura, Y., Ishikawa, Y., Watanabe, S., Akahoshi, K., Ogura, T., Ogawa, K., Ban, D., et al. (2021). C646 inhibits G2/M cell cycle-related proteins and potentiates anti-tumor effects in pancreatic cancer. *Sci. Rep.* 11, 10078.
 141. Wang, Y.-M., Gu, M.-L., Meng, F.-S., Jiao, W.-R., Zhou, X.-X., Yao, H.-P., and Ji, F. (2017). Histone acetyltransferase p300/CBP inhibitor C646 blocks the survival and invasion pathways of gastric cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* 51, 1860–1868.
 142. Zhang, B., Chen, D., Liu, B., Dekker, F.J., and Quax, W.J. (2020). A novel histone acetyltransferase inhibitor A485 improves sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cells to TRAIL. *Biochem. Pharmacol.* 175, 113914. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295220301428>.
 143. Ansari, M.S.Z., Stagni, V., Iuzzolino, A., Rotili, D., Mai, A., Del Bufalo, D., Lavia, P., Degrassi, F., and Trisciuglio, D. (2023). Pharmacological targeting of CBP/p300 drives a redox/autophagy axis leading to senescence-induced growth arrest in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Gene Ther.* 30, 124–136. <https://doi.org/10.1038/s41417-022-00524-8>.
 144. Ji, C., Xu, W., Ding, H., Chen, Z., Shi, C., Han, J., Yu, L., Qiao, N., Zhang, Y., Cao, X., et al. (2022). The p300 Inhibitor A-485 Exerts Antitumor Activity in Growth Hormone Pituitary Adenoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 107, e2291–e2300. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgac128>.
 145. Cai, L.-Y., Chen, S.-J., Xiao, S.-H., Sun, Q.-J., Ding, C.-H., Zheng, B.-N., Zhu, X.-Y., Liu, S.-Q., Yang, F., Yang, Y.-X., et al. (2021). Targeting p300/CBP Attenuates Hepatocellular Carcinoma Progression through Epigenetic Regulation of Metabolism. *Cancer Res.* 81, 860–872.

146. Lasko, L.M., Jakob, C.G., Edalji, R.P., Qiu, W., Montgomery, D., Digiammarino, E.L., Hansen, T.M., Risi, R.M., Frey, R., Manaves, V., et al. (2017). Discovery of a selective catalytic p300/CBP inhibitor that targets lineage-specific tumours. *Nature* *550*, 128–132.
147. Waddell, A., Mahmud, I., Ding, H., Huo, Z., and Liao, D. (2021). Pharmacological Inhibition of CBP/p300 Blocks Estrogen Receptor Alpha (ER α) Function through Suppressing Enhancer H3K27 Acetylation in Luminal Breast Cancer. *Cancers* *13*, 2799.
148. Liu, J., He, D., Cheng, L., Huang, C., Zhang, Y., Rao, X., Kong, Y., Li, C., Zhang, Z., Liu, J., et al. (2020). p300/CBP inhibition enhances the efficacy of programmed death-ligand 1 blockade treatment in prostate cancer. *Oncogene* *39*, 3939–3951.
149. Picaud, S., Fedorov, O., Thanasopoulou, A., Leonards, K., Jones, K., Meier, J., Olzscha, H., Monteiro, O., Martin, S., Philpott, M., et al. (2015). Generation of a Selective Small Molecule Inhibitor of the CBP/p300 Bromodomain for Leukemia Therapy. *Cancer Res.* *75*, 5106–5119. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0236>.
150. Brooks, N., Knurowski, T., Hughes, A., Clegg, K., West, W., Pegg, N.A., Spencer, G.J., Chadwick, J., and Somerville, T.C. (2021). CCS1477, a Novel p300/CBP Bromodomain Inhibitor, Enhances Efficacy of Azacitidine and Venetoclax in Pre-Clinical Models of Acute Myeloid Leukaemia and Lymphoma. *Blood* *138*, 3291. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497121052204>.
151. Welti, J., Sharp, A., Brooks, N., Yuan, W., McNair, C., Chand, S.N., Pal, A., Figueiredo, I., Riisnaes, R., Gurel, B., et al. (2021). Targeting the p300/CBP Axis in Lethal Prostate Cancer. *Cancer Discov.* *11*, 1118–1137.
152. Liu, J., Wang, X., Jones, K., Brooks, N., Pegg, N., and Liu, X. (2022). Abstract 1345: p300/CBP bromodomain inhibitor CCS1477 enhances the efficacy of immune checkpoint blockade therapy in cancer treatment. *Cancer Res.* *82*, 1345. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2022-1345>.
153. Strachowska, M., Gronkowska, K., Michlewska, S., and Robaszekiewicz, A. (2021). CBP/p300 Bromodomain Inhibitor-I-CBP112 Declines Transcription of the Key ABC Transporters and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapy Drugs. *Cancers* *13*, 4614. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34572840/>.
154. Spriano, F., Gaudio, E., Cascione, L., Tarantelli, C., Melle, F., Motta, G., Priebe, V., Rinaldi, A., Golino, G., Mensah, A.A., et al. (2020). Antitumor activity of the dual BET and CBP/EP300 inhibitor NEO2734. *Blood Adv.* *4*, 4124–4135.
155. van Gils, N., Marti n ez Canales, T., Vermue, E., Rutten, A., Denkers, F., van der Deure, T., Ossenkoppele, G.J., Giles, F., and Smit, L. (2021). The Novel Oral BET-CBP/p300 Dual Inhibitor NEO2734 Is Highly Effective in Eradicating Acute Myeloid Leukemia Blasts and Stem/Progenitor Cells. *HemaSphere* *5*, e610.
156. Principe, D.R., Xiong, R., Li, Y., Pham, T.N.D., Kamath, S.D., Dubrovskiy, O., Ratia, K., Huang, F., Zhao, J., Shen, Z., et al. (2022). XP-524 is a dual-BET/EP300 inhibitor that represses oncogenic KRAS and potentiates immune checkpoint inhibition in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *119*, e2116764119.
157. Rai, R., Verma, S.K., Kim, D., Ramirez, V., Lux, E., Li, C., Sahoo, S., Wilsbacher, L.D., Vaughan, D.E., Quaggin, S.E., and Ghosh, A.K. (2017). A novel acetyltransferase p300 inhibitor ameliorates hypertension-associated cardio-renal fibrosis. *Epigenetics* *12*, 1004–1013.
158. Eischer, N., Arnold, M., and Mayer, A. (2023). Emerging roles of BET proteins in transcription and co-transcriptional RNA processing. *WIREs RNA* *14*, e1734. <https://doi.org/10.1002/wrna.1734>.
159. Durbin, A.D., Wang, T., Wimalasena, V.K., Zimmerman, M.W., Li, D., Dharia, N.V., Mariani, L., Shendy, N.A.M., Nance, S., Patel, A.G., et al. (2022). EP300 Selectively Controls the Enhancer Landscape of MYCN-Amplified Neuroblastoma. *Cancer Discov.* *12*, 730–751.
160. Vannam, R., Sayilgan, J., Ojeda, S., Karakyriakou, B., Hu, E., Kreuzer, J., Morris, R., Herrera Lopez, X.I., Rai, S., Haas, W., et al. (2021). Targeted degradation of the enhancer lysine acetyltransferases CBP and p300. *Cell Chem. Biol.* *28*, 503–514.e12.
161. Ooi, L., Belyaev, N.D., Miyake, K., Wood, I.C., and Buckley, N.J. (2006). BRG1 Chromatin Remodeling Activity Is Required for Efficient Chromatin Binding by Repressor Element 1-silencing Transcription Factor (REST) and Facilitates REST-mediated Repression. *J. Biol. Chem.* *281*, 38974–38980. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819337627>.

Original Paper

Activity of Lysosomal ABCC3, ABCC5 and ABCC10 is Responsible for Lysosomal Sequestration of Doxorubicin and Paclitaxel-Oregongreen488 in Paclitaxel-Resistant Cancer Cell Lines

Karolina Gronkowska^{a,b} Sylwia Michlewska^c Agnieszka Robaszkiewicz^a

^aDepartment of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland, ^bBio-Med-Chem Doctoral School of the University of Lodz and Lodz Institutes of the Polish Academy of Sciences, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland, ^cLaboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland.

Key Words

Multidrug resistance • ATP-binding cassette (ABC) transporters • Paclitaxel • Doxorubicin • Lysosomes

Abstract

Background/Aims: Cancer cell multidrug resistance induced by paclitaxel contributes to the high failure rates of chemotherapy and relapse of the disease. Several mechanisms have been described that underlie the observed resistance, including the overexpression of ABCB1 (P-glycoprotein), which represents an ATP-binding cassette (ABC) transmembrane protein, and its functional occurrence in lysosomal membranes is linked to drug accumulation in these organelles. **Methods:** Using clinically-relevant models of paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer and non-small cell lung cancer cell lines, we provide evidence for the role of ABCC subfamily members in the lysosomal sequestration of drugs in multidrug resistant phenotypes. Proteins expression level and its cellular localisation was measured using Western Blot and confocal microscopy. Drug accumulation was analysed by confocal microscopy and flow cytometry. Drug cytotoxicity was tested using resazurin assay and annexin V propidium iodide staining. **Results:** Regardless of the alteration in gene expression, paclitaxel induced the intracellular redistribution of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 and their enrichment in lysosomes. The use of ABCC inhibitors and transient silencing of these three genes limited the accumulation of doxorubicin and paclitaxel-OregonGreen488 in lysosomes, while having little impact on the total drug level inside cells. The cancer cells were also sensitized to various structurally unrelated chemotherapeutics of differing acidity. **Conclusion:** The results suggest

that lysosome membranes anchored ABCC proteins which remained functionally active and were capable to load chemotherapeutics into lysosomes in paclitaxel-resistant cancer cells. Therefore, targeting of lysosomal ABCC transporters may help to overcome paclitaxel-induced resistance by reducing the accumulation of drugs in lysosomes.

© 2023 The Author(s). Published by
Cell Physiol Biochem Press GmbH&Co. KG

Introduction

Paclitaxel (PTX) is an important first-line drug for the treatment of certain breast and advanced non-small cell lung cancers (NSCLC) due to the lack of specific markers for targeted or personalized medicine. Over 85% of lung cancer patients are diagnosed with non-small cell lung cancer (NSCLC), 60% of whom a standard chemotherapy regime is administered due to the advanced stage of disease [1–3]. Similarly, adjuvant and neoadjuvant chemo drugs are given particularly for metastatic breast cancer and triple-negative breast cancer patients (TNBC), where the cells lack estrogen, progesterone and HER2 receptors [4]. Paclitaxel is a tubulin-binding compound promoting accumulation of tubulin dimers and stabilizing microtubule fibers, which prevent proper spindle formation, arresting the cell cycle in mitosis and inducing apoptosis [5]. However, paclitaxel-induced resistance leads to treatment failure and tumor recurrence. The most frequently referred mechanisms of resistance include altered apoptotic pathways, increased drug metabolism, mutations and changes in tubulin composition, reduced drug uptake and overexpression of the pumps that actively transport the drug out of the cells [5, 6]. The latter group is represented by the ATP-binding cassette (ABC) proteins, using energy from ATP hydrolysis to translocate substances across the cell membrane. They are characterized by relatively low substrate specificity and remove a wide range of structurally unrelated compounds from cells, contributing to increased multidrug resistance (MDR) [7]. These transporters are classified into seven subfamilies (ABCA–ABCG) by the Human Genome Organization. MDR in paclitaxel-resistant human breast, lung and ovary cancers was associated with the overexpression of ABCB1 (P-glycoprotein), whereas ABCG2 (BCRP, Breast Cancer Resistance Protein) was reported in the last two tumor types [8]. Clinical trials that combined paclitaxel with P-glycoprotein inhibitors such as CBT-1 to treat solid tumors and with PSC 833 in breast, renal, lymphoma and ovarian cancer therapy were completed but not continued [9, 10]. Other ABCC subfamily members, such as ABCC1/MRP1, ABCC2/MRP2, ABCC3/MRP3, ABCB4/MDR3 were found up-regulated to various extents in paclitaxel-resistant breast cancer sublines [11], whereas the FOXM1-ABCC5 axis was shown to contribute to paclitaxel resistance in nasopharyngeal carcinoma cells [12]. Inhibitors of ABCC1 (PAK-104P), ABCB1 (LY329146) and Biricodar, which inhibits ABCC1, ABCB1 and other transporters of ABC group, have been shown to reverse paclitaxel resistance [13].

In the case of weakly basic drugs, their accumulation in sequestering organelles can be explained by changes in the intracellular pH gradient. The pH of the lumen of lysosomes is significantly lower in MDR cells, resulting in an increased pH difference between the lysosome and the cytosol. This may be a driving force for the accumulation of slightly basic anticancer agents such as doxorubicin, daunorubicin or mitoxantron ($pK_a = 8.3$) into acidic organelles [14]. In response to repeated exposure to paclitaxel, lung cancer RERF-LC-KJ accumulated more of Oregon Green® 488 conjugated paclitaxel in the lysosomal and extra-lysosomal compartments of cytoplasm than in other cell lines [15]. This study suggested that the changes in the subcellular localization of drugs may contribute to the development of multidrug resistance. A new line of research confirms the role of lysosomes in subcellular drug sequestration and hence, limitation of the anticancer agents in reaching intracellular targets [16, 17]. It has been demonstrated that certain ABC transporters, including ABCA2-3, ABCB1, ABCC1-2, or ABCG2, sequester anti-cancer drugs into (early/late) endo- or lysosomes [16]. In the multidrug resistant human leukemic cell line HL-60 the interplay between passive daunorubicin influx into lysosomes, as well as active ABCC1-dependent sequestration of a zwitterionic molecule, sulforhodamine 101, in the Golgi apparatus was

reported [18]. Furthermore, lysosomotropic weak bases such as ammonium chloride or chloroquine, as well as P-glycoprotein inhibitors (valsopodar or elacridar) and silencing, markedly increased the toxicity of P-glycoprotein substrates in cervical and ovary cancers, that were characterized by overexpression of LAMP2-colocalized ABC transporters [19]. In addition to the plasma membrane, ABCC1 was seen in endocytic vesicles, perinuclearly located lysosomes and trans-Golgi vesicles [20], where its activity on intracellular vesicles was sufficient to confer a drug resistance phenotype of HeLa cells, however ABCG2 was also found in lysosomal membranes of these cells [21]. Other ABCC proteins such as ABCC2, ABCC3 and ABCC4 were also detected in crude lysosomes of some non-resistant cell lines [22], but their role in lysosome-based multidrug resistance has not been supported by experimental evidence. Although recent proteomic datasets have classified some ABC proteins as lysosomal proteins, some controversy remains as to whether their endolysosomal localization is regular or only intermediate along the trafficking pathway (with synthesis in ER/Golgi, trafficking/recycling in endosomes and degradation in lysosomes) [23].

In this study we aimed to identify the ABCC subfamily members present in the lysosomal membrane and test their possible contribution to the sequestration of chemotherapy drugs in organelles. Use was made of clinically-relevant models of paclitaxel resistant phenotypes of non-small lung cancer (A549) and triple-negative breast cancer (MDA-MB-231), searching for subcellular localization of particular ABCC proteins. To give a readout of their activity in the lysosomal membrane we traced their impact on paclitaxel accumulation conjugated with OregonGreen488, which exists as a highly polar dianion at physiological pH. The probe increases paclitaxel polarity by almost 1000-fold, thereby substantially limiting its passive diffusion across membranes and making the lysosome loading entirely dependent on membrane transporters such as ABC proteins [24]. We also used the weak base doxorubicin, which is a known substrate of ABC membrane transporters and whose passive diffusion into lysosomes raises concerns about ABCB1-dependent lysosomal sequestration [21].

Materials and Methods

Materials

Non-small-cell lung cancer cell line A549 was purchased from ATCC. Breast cancer cell line MDA-MB-231 was purchased from Sigma Aldrich. DMEM High Glucose w/ L-Glutamine w/ Sodium Pyruvate, fetal bovine serum and antibiotics (penicillin and streptomycin) were from Biowest (CytoGen, Zgierz, Poland). Resazurin sodium salt, doxorubicin hydrochloride, cisplatin, paclitaxel, etoposide, ammonium chloride (A4514), MK-571 (M7571), Lysosome Isolation Kit (LYSISO1), Anti-LAMP1 antibody (SAB3500285) were from Sigma Aldrich (Poznan, Poland). Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide were ordered in Biokom (Janki/Warsaw, Poland). Anti-ABCC5 antibody (sc-376965) and siRNA Control (sc-37007) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (AMX, Lodz, Poland). Silencer Select Pre-designated siRNA: siABCC3 (#16602), siABCC5 (#19553) and siABCC10 (#40144), Lipofectamine RNAiMAX, OptiMem, SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate, PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#01154870), Pierce™ Protease Inhibitor Tablets (EDTA-free; PIC), Paclitaxel Oregon Green™ 488 conjugate (Flutax-2), LysoTracker™ Deep Red, BODIPY™ TR Ceramide, MitoTracker™ Red FM, SlowFade™ Glass Soft-set Antifade Mountant (with DAPI), anti-MRP3 (ABCC3) Polyclonal Antibody (PA5101482), anti-MRP5 (ABCC5) Polyclonal Antibody (PA5102678), anti-MRP10 (ABCC10) Polyclonal Antibody (PA5101678), SOD2 Antibody (1H6) (#MA1-106) were from ThermoFisher Scientific (ThermoFisher Scientific, Warsaw, Poland). Anti-ABCB1 (E1Y7B) Rabbit mAb (#13342), anti-ABCC1 (D708N) rabbit mAb (#14685), anti-ABCC3 (D8V8J) Rabbit mAb (#39909), ABCG2 (D5V2K) XP® Rabbit mAb (#42078), anti-CTB (E4D9Z) Mouse mAb (#58169), Histone H3 Rabbit Ab (#9715), anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (#7074), Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (#7076), Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate) (#4412), Anti-rabbit IgG Fab2 (Alexa Fluor® 594 Conjugate) (#8889), Anti-mouse IgG (H+L), F(ab')₂ fragment (PE Conjugate) (#59997) were from Cell Signaling Technologies (LabJOT, Warsaw, Poland). An Annexin V Apoptosis Detection Kit with Propidium iodide was purchased from BioLegend (BioCourse.pl, Katowice, Poland).

Cell culture and treatment with inhibitors

A549 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin (50 U/ml and 50 µg/ml, respectively) in 5% CO₂. Initially, MDA-MB-231 cells were cultured in F15 medium supplemented with 15% FBS and penicillin/streptomycin (50 U/ml and 50 µg/ml, respectively) without CO₂ equilibration. After 5 passages, the cells were adapted to grow in DMEM supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin (50 U/ml and 50 µg/ml, respectively) in 5% CO₂.

Paclitaxel at the concentration of 0.05 µM was added to cells for 48 h every 3 weeks for a total number of 6 cycles. The treatment scheme was chosen to fit the current therapeutic approaches, and drug concentration to fit the minimal paclitaxel concentration in the blood of patients [25]. The drug was washed out after 48 h and cells were cultured in the full growth medium till another dose of paclitaxel. After 6 cycles of treatment cells were frozen and kept in liquid nitrogen. After thawing, one dose of paclitaxel was added to cells and all experiments were performed up to six consecutive cell passages. Drug-resistant and non-resistant cell lines were cultured under the same condition.

Ammonium chloride (25 mM) and ABC transporter inhibitor MK-571 (25 µM) were added to cells for 2 h prior to analysis or treatment with anticancer drugs. Depending on the tested parameters, anticancer drugs were added to cells for 24 or 48 h.

Lysosome isolation

For the isolation of lysosomes destined for cytometer analysis, 2 million cells per sample were used; for Western Blot samples, 200 million cells per sample were used. The lysosome isolation was prepared according to the Lysosome Isolation Kit manufacturers protocol. Cells were trypsinized and washed two times with PBS. The cells were then resuspended in Extraction Buffer and sonicated (Bandelin Sonopuls HD2070). After every five strokes, cells were checked under a microscope to ascertain the degree of the breakage. The sonication was stopped at 80-85% of breakage. The samples were then centrifuged at 1000 x g for 10 min. The supernatant containing cells content was transferred to the new tubes and centrifuged at 20000 x g for 20 min. The pellet containing the Crude Lysosomal Fraction (mixture of mitochondria, lysosomes, peroxisomes and endoplasmic reticulum) was suspended in Extraction Buffer. Next, the samples were diluted to a solution containing 19% Optiprep Density Gradient Medium (0.505 ml Optiprep, 0.65ml Optiprep Dilution Buffer, 0.03 ml 2, 3 M Sucrose to 0.4 ml of Crude Lysosomal Fraction). To the diluted Optiprep fraction 250mM Calcium chloride was added to a final concentration of 8 mM. Next the samples were incubated on ice for 15 min and centrifuged for 5000 x g for 15 min to allow the precipitation of mitochondria, endoplasmic reticulum and peroxisomes. Finally, the supernatant containing lysosomes was transferred into fresh tubes. Lysosome purity and lysosomal membrane integrity were tested by flow cytometry after lysosome staining with Neutral Red dye, provided in the Lysosome isolation Kit. Fluorescence was read at 606 nm, the fluorescence of the lysosomotropic dye in the hydrated and acidic interior of lysosomes [26].

Formation of cell spheroids

Nunc™ Lab-Tek™ chamber slides were coated with faCellitate BIOFLOAT FLEX coating solution according to the manufacturer protocol. After 30 min of air-drying of the chambers within the laminar flow hood, the cells were seeded per well at a density of 20, 000 cells. Cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin (50 U/ml and 50 µg/ml, respectively) in 5% CO₂ to allow spheroids formation for 21 days.

Transient gene silencing

The cells were seeded per well at a density of 100, 000 cells on the 24-well plate, 10, 000 cells on Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide or 3-week spheroids were transfected using siRNA-RNAiMAX complexes according to the previously described protocol [27]. After 6 h incubation with the complexes, DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics was added to the desired volume and cells were grown for another 48 h to obtain transient gene silencing.

Flow cytometry

Cells were seeded into a 6-well plate at a density of 1 million cells per well. After 48 h of cell transfection, doxorubicin and paclitaxel-Oregon Green were added to the culture for another 24 h. Then lysosomes

were isolated or cells were trypsinized and washed with PBS, fixed in 0.5% formaldehyde in PBS at room temperature for 15 min and transferred to fresh PBS. The lysosomes were taken directly after isolation to analysis. The fluorescence intensity was measured by a flow cytometer LSR® II (Becton Dickinson) at ex: 470/em: 595 nm/nm for anthracyclines and ex: 496 nm/em: 524 nm for paclitaxel. The cell or lysosome population was discriminated based on FSC-A and SSC-A parameters in Flowing Software 2. Intensity of the cell fluorescence was visualized on a histogram and the shift in fluorescence distribution indicated the alteration in drug distribution.

Whole-cell protein expression evaluation

For protein expression evaluation cells were lysed in RIPA buffer (supplemented with 1 mM PMSF and PIC) and sonicated (Bandelin Sonopuls HD2070); Proteins were then separated by SDS-PAGE, transferred into a nitrocellulose membrane and stained with primary antibodies (1:5000) at 4°C overnight. After subsequent staining with HRP-conjugated secondary antibodies (1:5000 for antirabbit and 1:2500 for anti-mouse antibodies; room temperature; 2 h), the signal was developed with the SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate and pictures were acquired using ProXima 2750 (Isogen Life Science). ACTB was used as the control.

Lysosomal protein expression evaluation

Lysosomes were suspended in 5x RIPA buffer (supplemented with 1 mM PMSF and PIC) and sonicated (Bandelin Sonopuls HD2070). Lysosome lysates were then separated by SDS-PAGE, transferred into a nitrocellulose membrane and stained with primary antibodies (1:5000) at 4°C overnight. After subsequent staining with HRP-conjugated secondary antibodies (1:10,000 for antirabbit and 1:5000 for anti-mouse antibodies; room temperature; 2 h), the signal was analyzed using the SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate in ChemiDoc-IT2 (UVP, Meranco, Poznan, Poland). ACTB, H3 and SOD2 was used as the control.

Confocal microscopy evaluation of ABC proteins

For the confocal imaging of ABC proteins, cells were seeded on a Nunc™ Lab-Tek™ chamber slide. 2 h before cell fixation, LysoTracker™ Deep Red was added to the final volume of 75 nM and cells were incubated 1 h at 37°C. Cells were fixed with a 1% formaldehyde solution in PBS at room temperature for 15 min, permeabilized and blocked with 1% FBS solution in PBS with 0.1% TritonX-100 at room temperature for 1 h. Primary antibodies (1:400) were added in 1% BSA solution in PBS with 0.1% TritonX-100 and incubated at 4°C overnight. A secondary antibody (1:400) was then added in 1% BSA solution in PBS with 0.1% TritonX-100 at room temperature for 2 h. After washing, the slides were mounted with SlowFade™ glass soft-set antifade mountant (with DAPI). The TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) with a 63x/1.40 objective (HC PL APO CS2, Leica Microsystems, Germany) was used for sample visualization. The samples were imaged with the following wavelength values for excitation and emission: 485 and 500-550 nm for Alexa Fluor® 488, 647 and 660-670 nm for LysoTracker Deep Red and 405 and 430-480 nm for DAPI. The fluorescence intensity and colocalization was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems, Germany).

Confocal microscopy imaging of lysosomal proteins

For the confocal imaging of ABC proteins, cells were seeded on a Nunc™ Lab-Tek™ chamber slide. Cells were fixed with a 1% formaldehyde solution in PBS at room temperature for 15 min, permeabilized and blocked with 1% FBS solution in PBS with 0.1% TritonX-100 at room temperature for 1 h. Anti-LAMP primary antibody (1:400) was added in 1% BSA solution in PBS with 0.1% TritonX-100 and incubated at 4°C overnight. A secondary antibody labelled with Alexa Fluor® 488 (1:400) was then added in 1% BSA solution in PBS with 0.1% TritonX-100 at room temperature for 2 h. Next anti-ABC primary antibodies (1:400) were added in 1% BSA solution in PBS with 0.1% TritonX-100 and incubated at 4°C overnight. A secondary antibody labelled with Alexa Fluor® 546 or R-phycoerythrin (PE) (1:400) was then added in 1% BSA solution in PBS with 0.1% TritonX-100 at room temperature for 2 h. After washing, the slides were mounted with SlowFade™ glass soft-set antifade mountant (with DAPI). The TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) with a 100x/1.40 objective (HC PL APO CS2, Leica Microsystems, Germany) was used for sample visualization. The samples were imaged with the following wavelength values for excitation and emission:

485 and 500-550 nm for Alexa Fluor® 488, 550 and 570-580 nm for Alexa Fluor® 546, 480 and 570-580 nm for R-phycoerythrin (PE). The scans of cells were deconvolved using 3D-Deconvolution accessible in Leica Application Suite X software (LAS X, Leica Microsystems, Germany).

Confocal microscopy analysis of drug accumulation in cells

Cells seeded on Nunc™ Lab-Tek™ chamber slides were treated with anticancer drugs and inhibitors. Next, LysoTracker™ Deep Red (75 nM for 2 h), BODIPY™ TR Ceramide (5 µM for 30 min), or MitoTracker™ Red FM (100 nM for 30 min), was added to the culture media. After incubation and cell washing with PBS, cells were mounted with SlowFade™ glass soft-set antifade mountant (with DAPI). The TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) with a 63x/1.40 and 10x 0.40 DRY objectives (HC PL APO CS2, Leica Microsystems, Germany) was used for sample visualization. The samples were imaged with the following wavelength values for excitation and emission: 485 and 500-550 nm for Alexa Fluor® 488 conjugated Paclitaxel, 470 and 580-600 nm for Doxorubicin and 405 and 430-480 nm for DAPI. The fluorescence intensity was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems, Germany).

Confocal microscopy evaluation of drug accumulation in spheroids

3-week-old 3D cell cultures were stained with LysoTracker™ Deep Red (75 nM) for 2 h. Next, spheroids were fixed with a 4% formaldehyde solution in PBS, at room temperature for 30 min. After fixation the spheroids were washed with PBS and incubated with 1 µg/ml DAPI for 30 min at room temperature. Spheroids were analyzed immediately. The TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) with a 63x/1.40 and 10x 0.40 DRY objectives (HC PL APO CS2, Leica Microsystems, Germany) was used for sample visualization. The samples were imaged with the following wavelength values for excitation and emission: 485 and 500-550 nm for Alexa Fluor® 488 conjugated Paclitaxel, 470 and 580-600 for Doxorubicin and 405 and 430-480 nm for DAPI. The fluorescence intensity was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems, Germany).

Resazurin toxicity assay

The day prior to transfection/treatment, cells were seeded at a density of 2,500 cells per well on Nunc® MicroWell™ 384-well optical bottom plates. After transfection/incubation with drugs and inhibitors, cells were incubated with the resazurin solution (5 µM) in the growth medium at 37 °C for 3 h. The fluorescence that corresponds to the metabolic activity of living cells was measured with a fluorescence microplate reader (BioTek Synergy HTX, Biokom, Poland) at excitation 530 and emission 590 nm. The fluorescence value for control cells was assumed to be 100%.

Annexin V and propidium iodide staining

For the visualization of apoptosis/necrosis induction by the combination of drugs and inhibitors, Nunc™ Lab-Tek™ chamber slides were coated with faCellitate BIOFLOAT FLEX coating solution according to manufacturer protocol. Cells seeded on coated chamber slides were harvested for 3-weeks to obtain spheroid formation. Cells were treated with inhibitor/ siRNA-RNAiMAX complexes and anticancer drugs. After washing with PBS, according to the manufacturer protocols, Annexin V-FITC and Propidium iodide were added to the cells in a binding buffer [28] and incubated for 30 min at room temperature. After incubation, spheroids were washed with PBS and incubated with 1 µg/ml DAPI for 30 min at room temperature. Spheroids were stored in PBS. The confocal laser scanning microscopy platform TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) with a 10x objective (HC PL APO CS2, Leica Microsystems, Germany) was used for the imaging of samples at the following wavelength values for excitation and emission: 485 and 500-550 nm for AnnexinV-FITC, 450 and 610-620 for Propidium iodide, 405 and 430-480 nm for DAPI, using Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems). The level of baseline fluorescence was established individually for each experiment. Fluorescence intensity was determined as arbitrary units (a.u.) with the Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems, Germany).

Statistical analysis

Data are shown as mean ± standard deviation (SD). Parametric or non-parametric tests were conducted after testing the Gaussian distribution of data with the Shapiro-Wilk test. Student's t-test or the Mann-Whitney test was used to calculate statistically significant differences between two samples, while one-way analysis of variance (ANOVA) or the Kruskal-Wallis test followed by corresponding *post hoc* test was

carried out to compare multiple samples. Statistics were calculated using GraphPad Prism 8.01 software. Statistically significant differences were marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$.

Results

Paclitaxel resistance is associated with enrichment of some ABCC transporters in lysosomal membranes

Knowing that paclitaxel-resistant cancer cells are characterized by overexpression of the three most frequently referred ABC proteins such as ABCB1, ABCC1 and ABCG2 and that ABCB1 is localized in some intracellular organelles [7, 8,15, 16, 29–31], we tested for expression and particularly searched for intracellular redistribution of ABCC subfamily members caused by a high cell exposure to paclitaxel. Among the tested and multidrug resistance-relevant transporters, only ABCB1 and ABCC5 increased in both studied cell lines as imaged by confocal microscopy and Western Blot analysis of whole cell lysates (Fig. 1A-B, 1F-G, S1A-B, S1D, S2A-B, S2D). An elevated level of ABCC1 was found in A549 cells resistant to paclitaxel (Fig. S1A, S1D), ABCC10 in MDA-PTX (Fig. S2A, S2D), whereas ABCC3 declined in both paclitaxel-resistant cell lines (Fig. S1A, S1D, Fig. S2A, S2D). The development of drug resistance was associated with the enrichment of ABCB1, ABCC3, ABCC5 and ABCC10 in lysosomes, stained with LysoTracker™ Deep Red, as shown in confocal images and by colocalization of these proteins with lysosomes (Fig. 1A, 1C, 1D, 1F, 1H, 1I, S1A, S1C, S2A, S2C, S3), regardless of their paclitaxel-induced alteration in cellular abundance. ABCB1, ABCC3, ABCC5 and ABCC10 were further confirmed by observing the increased level of all these four proteins in the membranes of lysosomes isolated from paclitaxel-resistant phenotypes (Fig. 1E, 1J). ABCC1, which reportedly occurred in the Golgi apparatus and an intracellular vehicle in multidrug resistant cells, remained anchored in the plasma membrane.

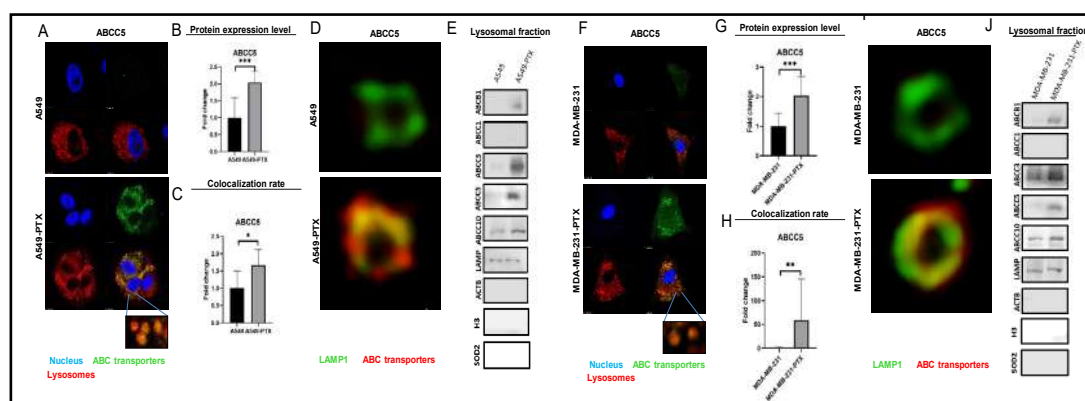


Fig. 1. Paclitaxel resistance is associated with enrichment of ABC transporters in lysosomes. A, F) Comparison of selected ABC transporter abundance and intracellular localization in non- and paclitaxel-resistant cancer cell lines A549 (A) and MDA-MB-231 (F). ABC transporters were visualized by immunocytochemistry followed by confocal microscopy. Green fluorescence of ABC transporters is derived from Alexafluor488-conjugated secondary antibody, blue DNA was stained with DAPI, whereas red lysosomes with LysoTracker™ Deep Red. (B-C, F-G) The fluorescence intensity, which corresponds to ABC protein level inside cells (B; G) and colocalization between considered proteins and lysosomes (C, H) were determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student's t-test or Mann Whitney test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$. (D, I) Confocal microscopy imaging of lysosomal proteins in non- and paclitaxel-resistant cancer cell lines A549 (D) and MDA-MB-231 (I). ABC transporters were visualized by immunocytochemistry followed by confocal microscopy. Red fluorescence of ABC transporters is derived from R-phycoerythrin-labelled secondary antibody and LAMP1- green fluorescence is derived from Alexafluor488-conjugated secondary antibody. The scans of lysosomes were deconvolved using 3D-Deconvolution accessible in Leica Application Suite X software (LAS X, Leica Microsystems, Germany). (E, J) ABC transporters were detected and compared in isolated lysosomes of cancer cell lines and their paclitaxel-resistant counterparts by western blot. LAMP was used as an internal and positive control, whereas ACTB served as a control for lysosome contamination with cytoplasmic and plasma membrane fractions; SOD2 was a control for

Paclitaxel resistance enhances the sequestration of acidity-different compounds in lysosomes

Knowing that a highly acidic environment of lysosomes determines the passive accumulation of compounds depending on their acidity, we made use of neutral Paclitaxel Oregon Green 488 that can only enter lysosomes by active membrane transporters, and we traced its intracellular localization by confocal microscopy and co-staining of selected organelles. In parallel, intracellular distribution of doxorubicin was tested. Doxorubicin enters acidic organelles due to weak base chemical features, but it is also transported across cellular membranes by the ABC proteins, making it possible to estimate the contribution of ABC proteins in doxorubicin loading to lysosomes. As shown in Fig. 2A-D and Fig. S4A-B, gaining resistance to paclitaxel considerably changed intracellular localization of both drugs. In non-resistant cells, neutral Paclitaxel Oregon Green 488 accumulated in the cytoplasm (cytoskeleton binding), whereas doxorubicin was found in cytoplasm and to a lower extent also in the nucleus. Repeated exposure to paclitaxel enhanced the drug sequestration in lysosomes, as indicated by substantial increase in the drug-lysosome co-localization rate (Fig. 2C, 2D).

To confirm enhanced accumulation of the considered drugs in lysosomes enriched in ABCB1, ABCC3, ABCC5 and ABCC10, the fluorescence intensity in lysosomes isolated from non-resistant and paclitaxel-resistant cells exposed to Paclitaxel OregonGreen 488 and doxorubicin was compared. The median value of fluorescence distribution indicates 3- and 7-fold increase in lysosomal trapping of paclitaxel and anthracycline respectively in paclitaxel-resistant phenotypes (Fig. 2E-F).

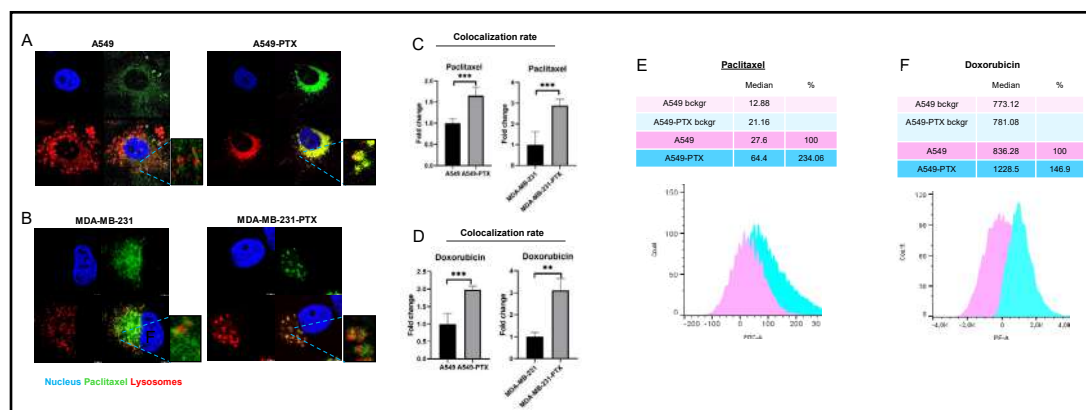


Fig. 2. Development of cancer cell resistance to paclitaxel is followed by intracellular drug redistribution to lysosomes. (A-B) Comparison of paclitaxel intracellular localization between non-resistant and paclitaxel-resistant cancer cell lines (A549 – A and MDA-MB-231 – B) after their exposure to paclitaxel for 24 h based on confocal imaging (TCS SP8, Leica Microsystems, Germany). Paclitaxel Oregon Green™ 488 is visualized in green (0,1 μM), DNA (DAPI) in blue and lysosomes (LysoTracker™ Deep Red) in red. (C,D) The colocalization between fluorescence of Paclitaxel Oregon Green™ 488 (C), autofluorescence of doxorubicin (D) and LysoTracker™ Deep Red was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student's t-test or Mann Whitney test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$ (G-H) Comparison of doxorubicin (G) and paclitaxel (H) lysosomal uptake between non-resistant and paclitaxel-resistant A549 cancer cell line after their exposure to drugs for 24 h based on Flow Cytometry. The fluorescence intensity was measured by flow cytometer LSR® II (Becton Dickinson) at em: 595 nm/ex: 470 nm for anthracyclines and em: 524 nm/ex: 496 nm for paclitaxel. Distribution of cell/lysosomes intensity was analysed in Flowing Software 2. The analyzed cell population was discriminated based on FSC-A and SSC-A parameters. Intensity of cell fluorescence was visualized on a histogram and the shift in fluorescence distribution indicated the alteration in drug distribution.

Taking into account literature reports on the possible non-specific binding of Oregon Green 488-labeled paclitaxel to the Golgi apparatus [32] and enrichment of ABCB1 in the mitochondria membrane [29], the impact of development of paclitaxel resistance on the possible accumulation of fluorescently labeled paclitaxel in these two cellular compartments was checked (Fig. S4C-F). As shown in Fig. S4C-D, colocalization of the drug, endoplasmic reticulum and Golgi apparatus was substantially lower in the resistant phenotype of A549 cells. Based on the confocal images in Fig. S4E-F, mitochondria of resistant cells accumulated a lower amount of Paclitaxel Oregon Green 488 indicating that intracellular redistribution of ABCB1, ABCC3, ABCC5 and ABCC10 to lysosomes co-occurs with considerably enhanced Paclitaxel Oregon Green 488 and doxorubicin accumulation in these organelles.

Development of cancer cell resistance to paclitaxel is followed by ABCC transporter-dependent drug redistribution to lysosomes

Taking into account previous reports on the lysosomal function of ABCB1 [19, 33], we focused mostly on ABCC3, ABCC5 and ABCC10. Their lysosomal localization and possible impact on drug sequestration in these organelles has not been mechanistically described.

To confirm the role of lysosomal ABC transporters in lysosomal drug sequestration, the uptake of chemotherapeutics was analyzed in the presence of two inhibitors MK-571 and ammonium chloride (AC). MK-571 is a non-selective inhibitor of several ABCC-transporters, including ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC5 and ABCC10 [34–40]. Due to its non-selective action against several transporters, it serves as a potential pan-ABCC inhibitor [41]. AC is a lysosomal lumen alkalizer, which increases the acidic pH of the lysosomes, thereby leading to the passage of neutral cytotoxic drugs across the lysosomal membrane and considerable release of weak bases entrapped in these organelles [33]. Ammonium chloride declined accumulation of the doxorubicin inside lysosomes in a resistant lung cancer cell line grown in a monolayer, but had weaker impact on Paclitaxel Oregon Green 488 intracellular localization (Fig. 3A-B, Fig. S5A). Interestingly, iABCC was more potent in reducing colocalization between lysosomes and both drugs, and almost completely prevented doxorubicin sequestration inside lysosomes. This indicates that the ABCC subfamily of proteins is involved in lysosomal sequestration of the studied drugs.

The role of lysosomes in drug accumulation was also confirmed in a 3D cancer cell culture treated with ammonium chloride, causing deeper penetration of Paclitaxel Oregon Green 488 and doxorubicin (Fig. 3C, Fig. S5B-D). In paclitaxel-resistant spheroids fluorescently labeled paclitaxel was entrapped in peripheral cell layers and visualized on fluorescence plots across the 3D culture. Ammonium chloride also increased the signal of both drugs in the central part of the culture, thereby allowing them to target the cells located in the inner spheroid layers. The ABCC pan-inhibitor MK-571 phenocopied the effect of ammonium chloride, thereby suggesting that ABCC subfamily of proteins entrap these two drugs in the outer layer of spheroid and likely in the lysosomes.

The functional impact of drug sequestration in the lysosomes by ABCC transporters and drug toxicity was studied by evaluating apoptotic and necrotic markers (Fig. 3D, 3E). Analysis of Annexin V intensity in 3D culture of A549-PTX spheroids confirmed a stronger apoptotic induction with the combination of drug and iABCC than with drugs alone, whereas not observing a substantial extent of necrosis. Accordingly, confocal imaging of Annexin V and propidium iodide-stained spheroids showed a similar distribution of apoptotic cells in all spheroid layers after spheroid exposure to the combination of drug and iABCC (Fig. 3F, Fig. S5E). A strong Annexin V signal in 3D cultures treated with the drug alone was observed in the outer parts of spheroid. All these results suggest that drug entrapment by lysosomal ABCC transporters prevents the drug reaching a pharmacological target and hence, reduces drug cytotoxicity.

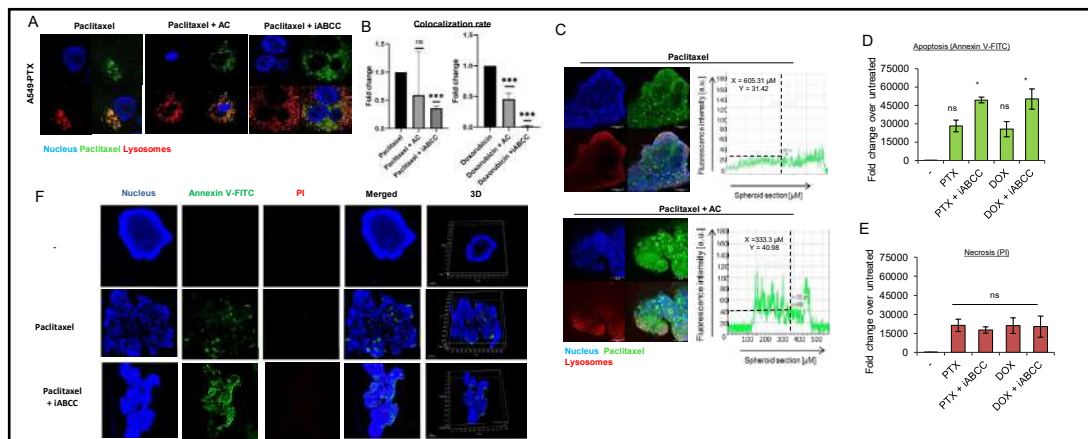


Fig. 3. Lysosomotropic neutralizing agent prevents ABCC-dependent drug sequestration in lysosomes of paclitaxel-resistant cancer phenotypes. (A) Comparison of lysosome and paclitaxel colocalization in paclitaxel-resistant A549 cell line after cell treatment with drug alone or in combination with lysosomotropic neutralizing agent (ammonium chloride - AC; 25 mM) and ABCC inhibitor (MK-571 – iABCC; 100 μ M), which were added for 2 h prior to Paclitaxel Oregon Green™ 488 treatment (0.1 μ M). Pictures were acquired with confocal microscope (TCS SP8, Leica Microsystems, Germany). Paclitaxel Oregon Green™ 488 is marked red, DNA was stained with DAPI (blue) and lysosomes with LysoTracker™ Deep Red (green). (B) The impact of ammonium chloride (AC) and MK571 (iABCC) on doxorubicin (0,05 μ M) and paclitaxel (0.1 μ M) colocalization with lysosomes was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student's t-test or Mann Whitney test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$. (C) 4 week-old 3D PTX-resistant A549 were treated with Paclitaxel Oregon Green™ 488 (green) alone for 48 h or in combination with ammonium chloride (25 mM; 2 h prior to paclitaxel), stained with LysoTracker™ Deep Red (red) and DAPI (blue). Spheroid fluorescence was captured with confocal microscope (TCS SP8, Leica Microsystems, Germany). The fluorescence intensity plot at spheroid cross section was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. (D,E) The role of ABCC in cell protection against doxorubicin (0.05 μ M; 48 h) and paclitaxel (0.1 μ M; 48 h) -induced cytotoxicity in 3D culture of 3 week old A549-PTX spheroids was assayed by measurement the Annexin V (D) and propidium iodide. (E) iABCC was added as in (A). The fluorescence intensity was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between the variants was tested with one-way ANOVA and Tukey post-hoc test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$. (F) The role of ABCC in cell protection against paclitaxel-induced cytotoxicity (0.01 μ M; 48 h) in 3D culture of 3 week old A549-PTX spheroids was assayed by spheroid triple staining with Annexin V (green), propidium iodide (red) and DAPI (blue) for 1 h. iABCC was added as in A. Images were acquired as in C. The green fluorescence intensity of entire spheroid corresponds to the extent of apoptosis in the culture, whereas intensity of red fluorescence to necrosis.

Deficiency of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 prevents drug sequestration in lysosomes of paclitaxel-resistant cancer cells

To identify the possible role of particular ABCC family members in lysosomal drug sequestration, we made use of transient gene silencing and targeted mRNA of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 with siRNA to substantially reduce their abundance in paclitaxel-resistant cells (Fig. S6). We considered whether these proteins contributed to regulation of the drug level inside cells. Either flow cytometry measurement of Paclitaxel Oregon Green 488 and doxorubicin fluorescence intensity inside whole cells (Fig. 4A) or confocal microscopy-based quantification of cell fluorescence (Fig. 4B, 4C) indicated that there was no sign of substantial alteration in cell fluorescence, with only one exception. The deficiency of ABCC3 in A549-PTX was followed by a statistically significant increase of the doxorubicin level inside cells when analyzed by flow cytometry. However, the silencing of ABCC3, ABCC5 or ABCC10 increased the drug level outside lysosomes (Fig. 4B), hence reducing drug-colocalization with lysosomes (Fig. 4D). The most prominent reduction in doxorubicin-lysosome and

Paclitaxel Oregon Green 488-lysosome co-occurrence was observed in ABCC3-deficient cells. This protein therefore seems to be largely responsible for the accumulation of fluorescently-labeled paclitaxel and anthracycline inside lysosomes.

To confirm the role of particular ABCC transporters in lysosomal drug sequestration, these organelles were isolated from paclitaxel-resistant ABCC3-, ABCC5- and ABCC10-deficient and proficient cells treated with Paclitaxel Oregon Green 488 and compared using lysosome fluorescence by flow cytometry. As shown in Fig. 4E and Fig. S7 and according to data from confocal imaging (Fig. 4B, 4C, Fig S8), the most striking reduction of fluorescently labeled paclitaxel accumulation was observed in ABCC3-deficient cells, where it dropped below 50%. The knock down of the other two proteins caused slight, mostly statistically insignificant changes with the exception of ABCC10 knock down in paclitaxel-resistant A549 cells, where the accumulation of Paclitaxel Oregon Green 488 was considerably reduced.

These results suggests that all three studied proteins may be important for lysosome-based drug accumulation and resistance, with ABCC3 emerging as a key protein involved in the active trapping of chemotherapeutics inside acidic organelles.

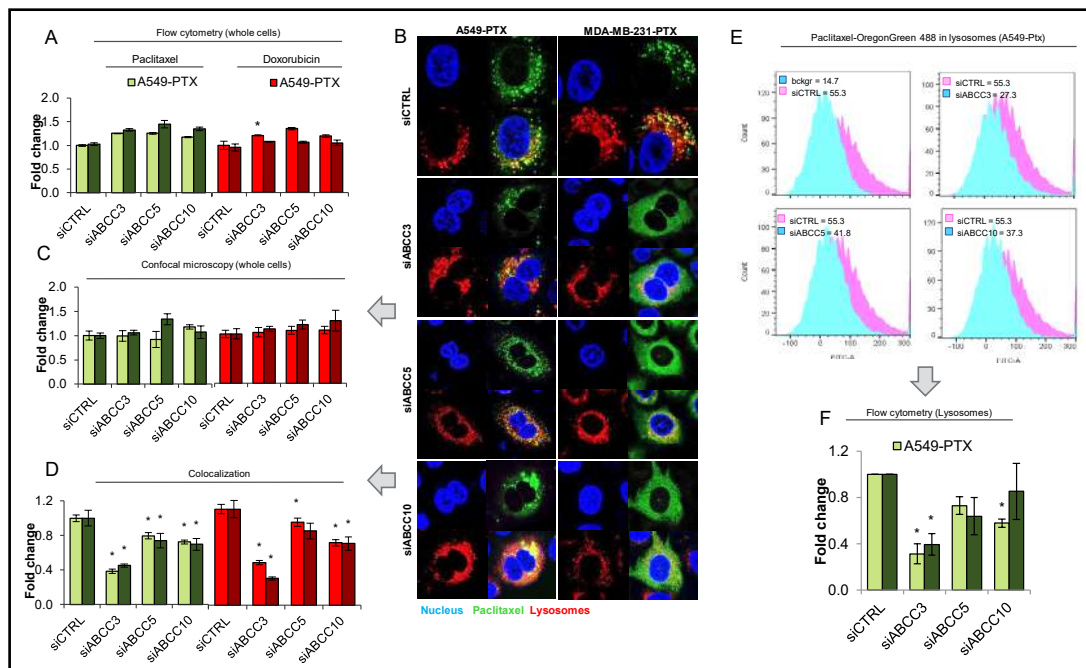


Fig. 4. Transient ABCC silencing prevents drug sequestration in lysosomes of paclitaxel-resistant cancer phenotypes. (A) Comparison of cell lysosomal uptake in paclitaxel-resistant A549 cell line and MDA-MB-231 after transfection with control siRNA and siRNA for ABCC3, ABCC5 and ABCC10. Paclitaxel (0.1 μ M) and Doxorubicin (0.05 μ M) was added 48h after transfection for 24h. The fluorescence intensity was measured by a flow cytometer LSR® II (Becton Dickinson) at ex: 470/em: 595 nm/nm for anthracyclines and ex: 496 nm/em: 524 nm for paclitaxel. Distribution of cells intensity was analysed in Flowing Software 2. (B,C,D) Comparison of paclitaxel distribution in paclitaxel-resistant A549 cell line (A) and MDA-MB-231 (B) after transfection with control siRNA and siRNA for ABCC3, ABCC5 and ABCC10. Paclitaxel (0,1 μ M) was added 48h after transfection for 24h. (B) Pictures were acquired with confocal microscope (TCS SP8, Leica Microsystems, Germany). Paclitaxel Oregon Green™ 488 is marked green, DNA was stained with DAPI (blue) and lysosomes with LysoTracker™ Deep Red (red). The fluorescence intensity, which corresponds to drug level inside cells (C) and colocalization between considered proteins and lysosomes (D) were determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between the variants was tested with one-way ANOVA or Kruskal Wallis Test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$. (E,F) Comparison of paclitaxel lysosomal uptake in paclitaxel-resistant A549 cell line and MDA-MB-231 after transfection with control siRNA and siRNA for ABCC3, ABCC5 and ABCC10. Paclitaxel (0,01 μ M) was added 48h after transfection for 24h. The fluorescence intensity was measured by flow cytometer LSR® II (Becton Dickinson) at em: 524 nm/ex: 496 nm. Distribution of lysosomes intensity was analysed in Flowing Software 2.

Lysosome-enriched ABCC transporters protect paclitaxel-resistant cancer cells from anticancer drugs

Since the impact of single ABCC silencing on doxorubicin and Paclitaxel Oregon Green 488 accumulation in lysosomes was incomplete, all three proteins were knocked down simultaneously and the drug accumulation and toxicity was compared for ABCC3/5/10-deficient and proficient cells. As expected, targeting mRNA of three ABCC transporters with siRNA lowered lysosomal sequestration of doxorubicin and fluorescently-labeled paclitaxel (Fig. 5A, 5B, Fig. S9A), and led to dramatic decrease in drug-lysosome colocalization, up to ~4% for doxorubicin in the paclitaxel-resistant A549 cells (Fig. 5C, Fig. S9B). Importantly, the knock down of ABCC3/ABCC5/ABCC10 increased the cytotoxicity of paclitaxel, doxorubicin, cisplatin and etoposide that vary in their acidity. A similar effect was also observed for the pan-ABCC inhibitor (Fig. 5D).

In a 3D culture of these cells, the knock down of all three ABCC transporters substantially enhanced the spheroid penetration by Paclitaxel Oregon Green 488, which was distributed approximately equally across the entire spheroid regardless of its depth, whereas in control cells the green fluorescence of the drug was prevalently observed in the outer spheroid layers (Fig. 5E). A similar profile of the difference between siCTRL and siABCC was also found

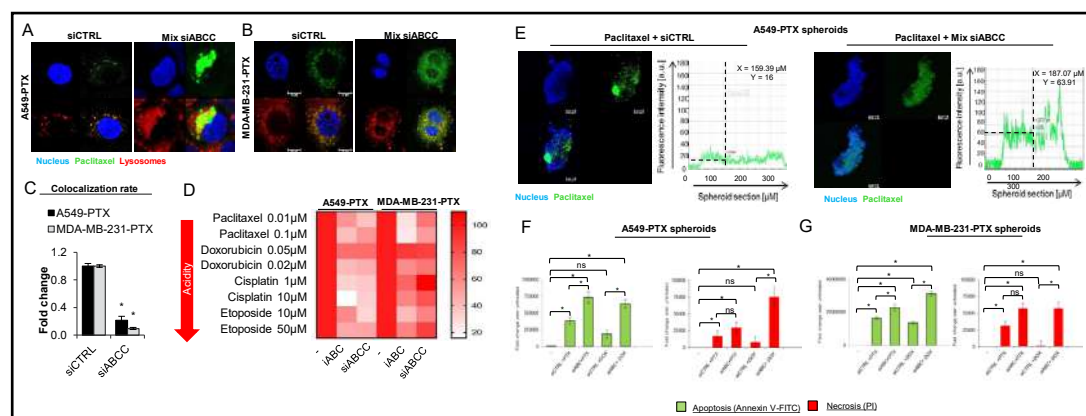


Fig. 5. Transient ABCC silencing increase cytotoxic effect of anticancer drugs. (A-C) The impact of simultaneous silencing with siABCC3, siABCC5 and siABCC10 on Paclitaxel Oregon Green 488 intracellular distribution was tested in paclitaxel-resistant A549 (A) and MDA-MB-231 (B) cells. Fluorescently labeled paclitaxel (green) was added to cells 72 h after their transfection with siRNA mixture (Mix siABCC) or with non-template control for another 24 h. Lysosomes were stained with LysoTracker™ Deep Red (red) and DAPI (blue). (C) Colocalization of Paclitaxel Oregon Green 488-derived green and LysoTracker™-derived red fluorescence was quantified with Leica Application Suite X. Bars in Fig. show mean ± SD. The difference between two means was tested with Student's t-test (Gaussian distribution values) or Mann Whitney test (non-Gaussian distribution values), and statistically significant differences are marked with * when p<0.05, ** when p<0.01, *** when p<0.001. (D) Cell metabolic activity that serves as a readout of cell viability was assayed with resazurin red. iABCC (MK-571; 25 μM) was administrated to the culture for 2 h prior to drugs, whereas cell transfection with the mixture of siABCC3, siABCC5 and siABCC10 was carried out 72 h prior to induction of cytotoxicity. For each tested chemotherapeutic, the viability of siCTRL or iABCC untreated cells was assumed as 100%. (E) 4 week-old 3D PTX-resistant A549 were transfected with mix of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 or siRNA control 78h prior to treatment with paclitaxel (0.1 μM), stained with DAPI (blue). Paclitaxel Oregon Green 488 fluorescence was captured with confocal microscope (TCS SP8, Leica Microsystems, Germany). The fluorescence intensity plot at spheroid cross section was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. (F,G) The role of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 in cell protection against doxorubicin (0.05 μM; 48 h) and paclitaxel (0.1 μM; 48 h) -induced cytotoxicity in 3D culture of 3 week old A549-PTX and MDA-MB-231-PTX spheroids was assayed by measurement the Annexin V (D) and propidium iodide (E). The drugs was added to cells 72 h after their transfection with siRNA mixture (Mix siABCC) or with non-template control. The fluorescence intensity was quantified with Leica Application Suite X. The difference between the variants was tested with one-way ANOVA or Kruskal Wallis Test, and statistically significant differences are marked with * when p<0.05, ** when p<0.01, *** when p<0.001.

in doxorubicin-treated 3D cell cultures (Fig. S9C). Furthermore, silencing of ABCC3/5/10 phenocopied the impact of iABCC and ammonium chloride regarding drug distribution to spheroids. This suggests that ABCC, enriched in lysosomes of paclitaxel-resistant cancer cells, is involved in the doxorubicin and Paclitaxel Oregon Green 488 trapping in the outer cell layers of the 3D culture and protects deeper spheroid layers from drug penetration. To test if drug retention in the peripheral part of spheroids by ABCC3, ABCC5 and ABCC10 reduces the cytotoxicity of doxorubicin and paclitaxel similarly to the pan-ABCC inhibitor, we compared the extent of apoptotic and necrotic cells between the control and ABCC3/5/10 knockdowns (Fig. 5F, 5G). Analysis of apoptotic marker - Annexin V intensity in a 3D culture of A549-PTX and MDA-MB-231 spheroids confirmed a more potent apoptotic induction by the drug in ABCC knockdown cells than transfection with control siRNA. A greater extent of necrosis was observed in cells after ABCC silencing and doxorubicin treatment (Fig. S10C-D), but it was not observed after ABCC silencing and paclitaxel exposure, in comparison with control siRNA (Fig. S10A-B). Interestingly, Annexin V and propidium iodide-stained spheroids showed a similar distribution of apoptotic cells in all spheroid layers after ABCC silencing in comparison with control siRNA in which apoptotic marker was located mainly in the outer parts of the spheroid (Fig. S10 A-D). These results suggest that drug entrapment by lysosomal ABCC3, ABCC5 and ABCC10 reduces drug cytotoxicity.

In summary, our results suggest that the lysosomal fractions of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 may protect cells growing in 3D structures from doxorubicin and paclitaxel. Their impact on the anticancer efficacy of other chemotherapeutics that are actively transported across membranes by ABCC3, ABCC5 and ABCC10, is also likely, but requires further verification.

Discussion

One of the most frequently referred mechanism of multidrug resistance is conferred by the overexpression of ABC transporters that actively transport chemotherapeutic drugs across intracellular and plasma membranes, thereby removing them out of the cells or sequestering them inside some cellular organelles and limiting their toxicity. A substantial body of evidence links declined cancer cell responsiveness to chemotherapeutics being accumulated in lysosomes, which increase in number due to the G2 arrest-dependent activation of TFEB transcription factor following the exposure of cancer cells to hydrophobic weak-base drugs such as doxorubicin, daunorubicin, mitoxantrone and symadex [42]. Some data including our results, also indicated enhanced lysosomal biogenesis in paclitaxel-treated cancer cells [15], which may be assigned to at least two mechanisms. Similarly, to the drugs listed above, paclitaxel triggered G2/M arrest regardless of the p53 mutation status in glioma cells [43]. Furthermore, lysosomal drug sequestration induced lysosomal stress and TFEB-mediated lysosomal biogenesis [44]. Additionally, it has been shown that stress factors in the tumor microenvironment induced drug resistance via ABCB1. This occurred through two mechanisms: rapid P-glycoprotein internalization via endocytosis of plasma membrane and redistribution via intracellular trafficking and hypoxia-inducible factor-1 α expression which up-regulated ABCB1 expression and was accompanied by lysosomal biogenesis. As part of endocytosis, the ABCB1-containing plasma membrane buds inward to form an early endosome, which next forms a lysosome. During endocytosis, the catalytic active-site and ATP-binding domain of P-glycoprotein are still exposed to the cytosol and are enabled to pump substrates from the cytosol into lysosomes [45]. Lysosomal drug accumulation results in the translocation of lysosomes from the perinuclear zone towards the plasma membrane via movement on microtubule tracks. Following translocation to the plasma membrane, drug-loaded lysosomes fuse with the plasma membrane and release the drugs from the cell, evidenced by the increasing levels of the lysosomal enzyme cathepsin D in the extracellular environment [46]. Other transporters, such as ABCA2-3, ABCC1-2 and ABCG2 were shown to be recruited from the cell membrane surface via internalization into (early/late) endo- or

lysosomes, which was demonstrated in colocalization studies with these ABC transporters and endo- or lysosomal markers. However, some ABC transporters (e.g., ABCA4, ABCA5, ABCB1, ABCB6, ABCB9, ABCC4–5, ABCD4, ABCG1 and ABCG4) have, in addition to their cellular membrane localization, a real subcellular destination rather than an intermediate [16]. Nothing is known at present about the molecular mechanism that sorts the ABCC family members such as ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC5 and ABCC10 to lysosomes and the lysosomal membrane [22]. Although some differences in amino acid sequence and protein structure between ABCB1 and these ABCC transporters exist, they share similarity in functional domains allowing them to bind to ATP and substrates, and so be shuttled across membranes [23]. Liu-Kreyche and co-authors provided evidence for the presence of ABCC2, ABCC3 and ABCC4 in similar or even higher levels than ABCB1 in lysosomes of non-resistant HepG2, Hep3B2, H226, OVCAR3 and N87 cell lines, and ABCC3 was detected in all of them [22]. In our model of A549 and MDA-MB-231 cells the development of drug resistance was followed by the enrichment of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 in lysosomes, but only ABCC5 transcription was considerably enhanced. This suggests that the redistribution of ABC transporters from plasma or from other intracellular compartment membranes to lysosomes rather than protein overexpression, plays a key role in lysosomal sequestration of at least doxorubicin and Paclitaxel Oregon Green 488. This conclusion can be possibly extended to other anticancer therapeutics, which are listed as substrates of ABC transporters, however the trapping of these therapeutics inside acidic organelles in multidrug resistant cells must be first experimentally confirmed. The origin of ABCC proteins that are enriched in lysosomal membrane of paclitaxel-resistant cell lines remains unknown. None of the three proteins were visibly present in the plasma membrane of resistant cells, in contrast to ABCC1. Hence, the indirect pathway of their lysosomal targeting seems unlikely, where after synthesis in the endoplasmic reticulum and passing through the Golgi apparatus, they are first sorted to the cell surface and from there, enter the endocytic pathway in response to cell treatment with doxorubicin or Paclitaxel Oregon Green 488. The plasma membrane localized ABCC1 did not move to the lysosomes during development of paclitaxel resistance, thereby further supporting the hypothesis based on the alternative route of subcellular trafficking of lysosomal transmembrane ABCC proteins. The variety of options include: classical and direct sorting of endoplasmic reticulum-derived proteins from the trans-Golgi network (TGN) to the endosomes and lysosomes that are mediated by adaptor protein complexes (AP1, AP2, AP3), or Golgi-localized, gamma-ear containing ADP-ribosylation factor binding (GGA) proteins, or non-classical pathways such as post-translational modifications (N-glycosylation and covalent lipid attachment), several amino acid motifs that do not conform to the canonical tyrosine and dileucine signals and association with other proteins [47]. Other ABCA, ABCB and ABCD subfamily members are considered to be lysosomal proteins. ABCB6 and ABCB9 are internalized to endolysosomes in clathrin-dependent fashion by an extended N-terminal domain (TMD0), which does not contain classical sorting determinants. ABCD4 traffics to the lysosomes only in association with LMBD1 (LMBR1 domain-containing protein 1), a lysosomal protein with nine putative transmembrane domains and classical tyrosine-based motif located in a cytosolic loop. ABCA2, ABCA3 and ABCA4 possess the trafficking signal motive xLxxKN (proximal post-Golgi compartment) that drives them to lysosomes [23]. This suggests that cell exposure to paclitaxel and other drugs which induce lysosome-mediated multidrug resistance [15, 17, 21], may alter the ABCC intracellular trafficking pathways without apparent increase in their expression. This aspect requires further investigation since the ability to retain multidrug resistance-associated ABC transporters outside lysosomes could improve the efficacy of chemotherapy. Another important issue refers to the functional impact of ABC transporters on drug sequestration in lysosomes and limiting their toxicity. Previous reports have focused mostly on P-glycoprotein with its involvement in multidrug resistance and colocalization with lysosomal LAMP2 protein in vinblastine- and paclitaxel-resistant (but not in non-resistant) cervical and ovary cancer cells, respectively [33]. Despite experimental evidence indicating P-glycoprotein incorporation into the membrane of cytoplasmic vesicles, the contribution of this enzyme in drug sequestration

remains controversial. The enzyme remains active in intracellular compartments but its ER and Golgi localization is transient and lysosomal localization is less common, even while the lysosomal pathway plays a major role in the degradation of P-gp in cancer cells [23]. The silencing of ABCB1, with pharmacological inhibition of the enzyme with valspodar or elacridar and treatment with lysosomotropic weak bases (NH₄Cl, chloroquine, or methylamine), caused relocation of DOX from the lysosomes to DNA in the nucleus and sensitized only the Pgp-expressing cell to cytotoxic drugs. Accordingly, the paclitaxel-resistant breast and lung cancer cell lines were characterized by a striking enrichment of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 in lysosomes, which was followed by the enhanced accumulation of doxorubicin and paclitaxel-OregonGreen in lysosomes of paclitaxel-resistant phenotypes. Though direct evidence is lacking regarding the functional expression of P-glycoprotein in the membrane of lysosomes. Regardless whether P-glycoprotein activity in lysosomes has been corroborated or not, there was no correlation shown between the patterns of the expression level of ABCB1 and the resistance to paclitaxel in human lung cancer cell lines. The colocalization between Oregon Green® 488 conjugated paclitaxel with LysoTracker® Red was more frequent in the RERF-LC-KJ cells, characterized by relatively low expression of ABCB1 when compared to other cell lines [15]. This leaves a gap and suggests the likely contribution of other anticancer drug transporters such as ABCC accumulating Oregon Green® 488 conjugated paclitaxel in the lysosomes of cells that are low in ABCB1. In our study ABCC3 emerged the most potent for trapping Paclitaxel Oregon Green 488 and doxorubicin in lysosomes, although confocal microscopy images and quantification of ABCC5 and ABCC10 colocalization with lysosomes confirmed their role in the lysosomal trapping of both studied compounds. The advantage of one transporter over the other in the sequestration of particular chemotherapeutics may be determined by their abundance in the lysosomal membrane as well as their substrate specificity. ABCC3 transports a variety of antineoplastic drugs such as etoposide, vincristine, methotrexate and sorafenib, whereas its overexpression has correlated to the sensitivity reduction of drugs, namely paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, vinorelbine, cisplatin, doxorubicin and VP-16 [48]. The substrates of ABCC5 comprise nucleoside analogs, cyclic nucleosides, 6-mercaptopurine and thioguanine, 5-fluorouracil, cisplatin, methotrexate, PMEA, AZT, but also a wide range of fluorochromes [49]. Therefore, limited activity of ABCC5 in Paclitaxel Oregon Green 488 and the doxorubicin loading to lysosomes may result from a limited specificity towards the studied compounds. However, the impact of ABCC10 on sequestration of our drugs was lower than that of ABCC3 even though paclitaxel and doxorubicin are listed among ABCC10 substrates [50]. Our unpublished RNA-Seq data confirms the highest mRNA level of ABCC3 in paclitaxel-resistant A549 cells, and a 10-fold lower level of ABCC5 and ABCC10. Interestingly, the enrichment of ABCB1 in the lysosomes of paclitaxel-resistant cells did not have any substantial impact on ABCC3, ABCC5 and ABCC10-dependent drug trapping in lysosomes. As mentioned above, the abundance of particular proteins in the lysosomal membrane ensures their *bona fide* contribution to drug transport into the lysosome lumen. From our unpublished data, the mRNA level of ABCB1 was more than 10-fold lower than that of ABCC5 and ABCC10, and more than 50-fold lower than ABCC3 in both paclitaxel-resistant cell lines. Therefore, the role of ABCB1 in our cellular model may be of minor importance.

Cancer cells are characterized by a large heterogeneity in the expression of ABC transporters. mRNA profiling of all known human ABC genes and subsequent Western Blot analysis of their protein expression showed an overlap in the overexpression of ABCB1 and ABCC3 proteins only in the tested paclitaxel-resistant breast cancer sublines. Up-regulation of ABCG2 and ABCC4 proteins was observed only in paclitaxel-resistant SK-BR-3 cells and ABCB4 and ABCC2 in paclitaxel-resistant MCF-7 cells [11]. Due to the variability in transporter overexpression among tumors escalating during therapy, specific inhibition of particular transporters or their silencing, leads to the expected benefit in an unlikely way. In our study, pan-ABCC inhibitor – MK-571 with documented activity against ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC5 and ABCC10 prevented doxorubicin and Paclitaxel Oregon Green 488 loading to lysosomes and enabled the toxicity of at least some chemotherapeutic drugs. Therefore,

Pan-ABCC inhibitors emerge as encouraging candidates for pharmacological strategies to overcome multidrug resistance by exploiting lysosomes as subcellular targets in reversing drug sequestration resistance [44]. Many efforts have been made to interfere with the activity of ABC transporters and to reverse multidrug resistance. For example, P-glycoprotein, ABCC1 and BRCP inhibitors have been tested as chemo-sensitizers in clinical trials such as cyclosporine A and tariquidar. However, no useful therapeutic effects were shown due to high toxicity, drug-drug interaction and clinical trial design problems of this method [51]. New and safe ABCC transporter inhibitors capable of blocking multiple ABCC proteins for single or combinatorial patient treatment must be developed. Regardless of the overexpression profile or subcellular localization of particular ABCC proteins in a given tumor, pan-ABCC inhibitors could reduce drug efflux outside cells and limit drug sequestration in lysosomes. As mentioned previously, the relative level of ABCB1 expression and lysosome abundance, which is often elevated in drug-resistant cells, could predict the possible therapeutic success of pan-ABCC inhibitors. In particular, identification of lysosomes as essential players in drug resistance can lead to innovation of therapeutic approaches where targeting lysosomal function might improve response to chemotherapy [17].

In summary, the members of the ABCC subfamily of transmembrane transporters play a crucial role in lysosomal sequestration and hence the reduced toxicity of some anticancer drugs. The lysosomal trafficking of ABC proteins does not require their gene overexpression nor plasma membrane localization, typical for indirect protein sorting to the cell surface, to the endocytic pathway and hence, the lysosomal membrane. We provided further evidence that a passive influx of doxorubicin to lysosomes is facilitated by ABCC proteins, particularly ABCC3. Still, numerous questions remain open, including: why are these three proteins enriched in lysosomes? Why does ABCC1 remain in the plasma membrane upon ABC protein mobilization to lysosomes? Is the profile of the ABCC proteins sorted to lysosomes similar in other multidrug resistant cells?

Conclusion

In conclusion, our study shows that the lysosomal membrane of paclitaxel-resistant non-small cell lung cancer and triple-negative breast cancer is enriched in ABCC3, ABCC5 and ABCC1, contributing to doxorubicin and Paclitaxel Oregon Green 488 sequestration in lysosomes. Further studies are needed to confirm the role of the ABCC subfamily members in lysosome-mediated multidrug resistance, and their functional impact on other anticancer drug trapping. The identification of the mechanisms that cause a higher abundance of these particular ABCC proteins in lysosomes, other organelles and the plasma membrane, may provide new molecular targets for anticancer interventions.

Acknowledgements

Author Contributions

Conceptualization: A.R.; methodology: A.R. and K.G.; validation: K.G. and A.R.; investigation: K.G., S.M. and A.R.; writing—original draft preparation: K.G. and A.R.; writing—review and editing: K.G., S.M. and A.R.; supervision, A.R.; project administration, A.R.; funding acquisition, A.R.

Funding Sources

This research was funded by National Centre for Research and Development, grant number LIDER/22/0122/L-10/18/NCBR/2019.

Statement of Ethics

The authors have no ethical conflicts to disclose.

Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- 1 Kampan NC, Madondo MT, McNally OM, Quinn M, Plebanski M: Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer. Mulik RS, editor. *Biomed Res Int* 2015;2015:413076.
- 2 Zang F, Rao Y, Zhu X, Wu Z, Jiang H: Shikonin suppresses NEAT1 and Akt signaling in treating paclitaxel-resistant non-small cell of lung cancer. *Mol Med* 2020;26:28.
- 3 Pu J, Shen J, Zhong Z, Yanling M, Gao J: KANK1 regulates paclitaxel resistance in lung adenocarcinoma A549 cells. *Artif cells, nanomedicine, Biotechnol* 2020;48:639–647.
- 4 Ge J, Zuo W, Chen Y, Shao Z, Yu K: The advance of adjuvant treatment for triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Med* 2021;19:187–201.
- 5 Maloney SM, Hoover CA, Morejon-Lasso L V, Prosperi JR: Mechanisms of Taxane Resistance. *Cancers* 2020;12:11.
- 6 Škubník J, Pavlíčková V, Ruml T, Rimpelová S: Current Perspectives on Taxanes: Focus on Their Bioactivity, Delivery and Combination Therapy. *Plants* 2021;10:3.
- 7 Pan S-T, Li Z-L, He Z-X, Qiu J-X, Zhou S-F: Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2016;43:723–737.
- 8 Gao L, Zhao P, Li Y, Yang D, Hu P, Li L, et al.: Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by novel curcumin analogues in paclitaxel-resistant human breast cancer cells. *Biochem Cell Biol* 2020;98:484–91.
- 9 A Phase I Study of Infusional Paclitaxel With the P-Glycoprotein Antagonist PSC 833 - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet] [cited 2023 Apr 7].. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT0001383?cond=paclitaxel+ABCB1&draw=2&rank=2>
- 10 Paclitaxel and CBT-1(Registered Trademark) to Treat Solid Tumors - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet] [cited 2023 Apr 7].. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00972205?cond=paclitaxel+ABCB1&draw=2&rank=5>
- 11 Němcová-Fürstová V, Kopperová D, Balušíková K, Ehrlichová M, Brynychová V, Václavíková R, et al.: Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporters. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016;310:215–228.
- 12 Hou Y, Zhu Q, Li Z, Peng Y, Yu X, Yuan B, et al.: The FOXM1–ABCC5 axis contributes to paclitaxel resistance in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cell Death Dis* 2017;8:e2659–e2659.
- 13 Stefan SM, Wiese M: Small-molecule inhibitors of multidrug resistance-associated protein 1 and related processes: A historic approach and recent advances. *Med Res Rev* 2019;1;39:176–264.
- 14 Alfarouk KO, Stock CM, Taylor S, Walsh M, Muddathir AK, Verduzco D, et al.: Resistance to cancer chemotherapy: Failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2015 Jul 15 [cited 2023 Apr 7];15:1–13.
- 15 Shimomura M, Yaoi T, Itoh K, Kato D, Terauchi K, Shimada J, et al.: Drug resistance to paclitaxel is not only associated with ABCB1 mRNA expression but also with drug accumulation in intracellular compartments in human lung cancer cell lines. *Int J Oncol* 2012;40:995–1004.
- 16 Stefan K, Wen Leck LY, Namasivayam V, Bascuñana P, Huang ML-H, Riss PJ, et al.: Vesicular ATP-binding cassette transporters in human disease: relevant aspects of their organization for future drug development. *Futur Drug Discov* 2020;2:FDD51.
- 17 Geisslinger F, Müller M, Vollmar AM, Bartel K: Targeting Lysosomes in Cancer as Promising Strategy to Overcome Chemoresistance—A Mini Review *Front Oncol* 2020;9;10:1156.
- 18 Gong Y, Duvvuri M, Krise JP: Separate roles for the Golgi apparatus and lysosomes in the sequestration of drugs in the multidrug-resistant human leukemic cell line HL-60. *J Biol Chem*. 2003;278:50234–50239.
- 19 Stefan SM, Jansson PJ, Kalinowski DS, Anjum R, Dharmasivam M, Richardson DR: The growing evidence for targeting P-glycoprotein in lysosomes to overcome resistance. *Future Med Chem* 2020;12:473-477
- 20 Bakos É, Homolya .: Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2007;23;453:621–641.

- 21 Gericke B, Wienböcker I, Brandes G, Löscher W: Is P-Glycoprotein Functionally Expressed in the Limiting Membrane of Endolysosomes? A Biochemical and Ultrastructural Study in the Rat Liver. *Cells* 2022;11:1556.
- 22 Liu-Kreyche P, Shen H, Marino AM, Iyer RA, Humphreys WG, Lai Y: Lysosomal P-gp-MDR1 Confers Drug Resistance of Brentuximab Vedotin and Its Cytotoxic Payload Monomethyl Auristatin E in Tumor Cells. *Front Pharmacol* 2019;10:749.
- 23 Szakacs G, Abele R: An inventory of lysosomal ABC transporters. *FEBS Lett* 2020;1;594:3965–3985.
- 24 Lee MM, Gao Z, Peterson BR: Synthesis of a Fluorescent Analogue of Paclitaxel that Selectively Binds Microtubules and Sensitively Detects Efflux by P-Glycoprotein. *Angew Chem Int Ed Engl* 2017;56:6927.
- 25 Stage TB, Bergmann TK, Kroetz DL: Clinical Pharmacokinetics of Paclitaxel Monotherapy: An Updated Literature Review. *Clin Pharmacokinet* 2018;57:7–19.
- 26 Sousa C, Sá e Melo T, Gêze M, Gaullier J-M, Mazière JC, Santus R: Solvent Polarity and pH Effects on the Spectroscopic Properties of Neutral Red: Application to Lysosomal Microenvironment Probing in Living Cells. *Photochem Photobiol* 1996;63:601–607.
- 27 Sobczak M, Strachowska M, Gronkowska K, Robaszekiewicz A: Activation of ABCC Genes by Cisplatin Depends on the CoREST Occurrence at Their Promoters in A549 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Cancers (Basel)* 2022;14:894.
- 28 FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI [cited 2023 Apr 21]; Available from: www.biolegend.com
- 29 Guo W, Dong W, Li M, Shen Y: Mitochondria P-glycoprotein confers paclitaxel resistance on ovarian cancer cells. *Onco Targets Ther* 2019;12:3881–3891.
- 30 Chung WM, Ho YP, Chang WC, Dai YC, Chen L, Hung YC, et al.: Increase Paclitaxel Sensitivity to Better Suppress Serous Epithelial Ovarian Cancer via Ablating Androgen Receptor/Aryl Hydrocarbon Receptor-ABCG2 Axis. *Cancers (Basel)* 2019;11:4.
- 31 Reshma PL, Unnikrishnan BS, Preethi GU, Syama HP, Archana MG, Remya K, et al.: Overcoming drug-resistance in lung cancer cells by paclitaxel loaded galactoxyloglucan nanoparticles. *Int J Biol Macromol* 2019;136:266–274.
- 32 Lee MM, Gao Z, Peterson BR: Synthesis of a Fluorescent Analogue of Paclitaxel That Selectively Binds Microtubules and Sensitively Detects Efflux by P-Glycoprotein. *Angew Chem Int Ed Engl* 2017;56:6927–6931.
- 33 Yamagishi T, Sahni S, Sharp DM, Arvind A, Jansson PJ, Richardson DR: P-glycoprotein mediates drug resistance via a novel mechanism involving lysosomal sequestration. *J Biol Chem* 2013;288:31761–31771.
- 34 Ruiz-López E, Jovčevska I, González-Gómez R, Tejero H, Al-Shahrour F, Muyldermans S, et al.: Nanobodies targeting ABCC3 for immunotargeted applications in glioblastoma. *Sci Rep [Internet]* 2022;12:22581.
- 35 Chen X-Y, Yang Y, Wang J-Q, Wu Z-X, Li J, Chen Z-S: Overexpression of ABCC1 Confers Drug Resistance to Betulin. *Front Oncol* 2021;11:640656.
- 36 Barrington RD, Needs PW, Williamson G, Kroon PA: MK571 inhibits phase-2 conjugation of flavonols by Caco-2/TC7 cells, but does not specifically inhibit their apical efflux. *Biochem Pharmacol* 2015;95:193.
- 37 Pellegatta S, Di Ianni N, Pessina S, Pattera R, Anghileri E, Eoli M, et al.: ABCC3 Expressed by CD56dim CD16+ NK Cells Predicts Response in Glioblastoma Patients Treated with Combined Chemotherapy and Dendritic Cell Immunotherapy. *Int J Mol Sci* 2019;20:5886.
- 38 Döring H, Kreutzer D, Ritter C, Hilgeroth A: molecules Discovery of Novel Symmetrical 1, 4-Dihydropyridines as Inhibitors of Multidrug-Resistant Protein (MRP4) Efflux Pump for Anticancer Therapy. *Molecules* 2020;26:18.
- 39 Huang W, Chen K, Lu Y, Zhang D, Cheng Y, Li L, et al.: ABCC5 facilitates the acquired resistance of sorafenib through the inhibition of SLC7A11-induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma. *Neoplasia* 2021;23:1227–1239.
- 40 Kathawala RJ, Wang YJ, Ashby CR, Chen ZS: Recent advances regarding the role of ABC subfamily C member 10 (ABCC10) in the efflux of antitumor drugs. *Chin J Cancer* 2014;33:223.
- 41 Howe K, Gibson GG, Coleman T, Plant N: In silico and *in vitro* modeling of hepatocyte drug transport processes: importance of ABCC2 expression levels in the disposition of carboxydichlorofluorescein. *Drug Metab Dispos* 2009;37:391–399.
- 42 Mlejnek P, Havlasek J, Pastvova N, Dolezel P, Dostalova K: Lysosomal sequestration of weak base drugs, lysosomal biogenesis, and cell cycle alteration. *Biomed Pharmacother* 2022;153:113328.
- 43 Han BI, Lee M: Paclitaxel-induced G2/m arrest via different mechanism of actions in glioma cell lines with differing p53 mutational status. *Int J Pharmacol* 2016;12:19–27.

Gronkowska et al.: Activity of Lysosomal ABC Transporters is Responsible For Lysosomal Sequestration of Drugs

- 44 Halaby R.: Influence of lysosomal sequestration on multidrug resistance in cancer cells. *Cancer drug Resist (Alhambra, Calif)* 2019;2:31–42.
- 45 Al-Akra L, Bae DH, Sahni S, Huang MLH, Park KC, Lane DJR, et al.: Tumor stressors induce two mechanisms of intracellular P-glycoprotein-mediated resistance that are overcome by lysosomal-targeted thiosemicarbazones. *J Biol Chem* 2018;293:3562.
- 46 Zhitomirsky B, Assaraf YG: Lysosomal accumulation of anticancer drugs triggers lysosomal exocytosis. *Oncotarget* 2017;8:45117.
- 47 Staudt C, Puissant E, Boonen M, Sansebastiano G-P Di, Gaballo A. Subcellular Trafficking of Mammalian Lysosomal Proteins: An Extended View. *Int J Mol Sci* 2016;18(1):47.
- 48 Ramírez-Cosmes A, Reyes-Jiménez E, Zertuche-Martínez C, Hernández-Hernández CA, García-Román R, Romero-Díaz RI, et al.: The implications of ABCC3 in cancer drug resistance: can we use it as a therapeutic target? *Am J Cancer Res* 2021;11:4127.
- 49 Jungsuwadee P, Vore ME: Efflux Transporters. *Compr Toxicol Second Ed* 2010;4:557–601.
- 50 Abbasifarid E, Sajjadi-Jazi SM, Beheshtian M, Samimi H, Larijani B, Haghpanah V. The Role of ATP-Binding Cassette Transporters in the Chemoresistance of Anaplastic Thyroid Cancer: A Systematic Review. *Endocrinology* 2019;160(8):2015–23.
- 51 Xiao H, Zheng Y, Ma L, Tian L, Sun Q. Clinically-Relevant ABC Transporter for Anti-Cancer Drug Resistance. *Front Pharmacol* 2021;12:705.

Supplementary figure legends:

Fig S1. The impact of paclitaxel resistance on ABCB1, ABCC1 and ABCC3 expression and distribution inside A549 cells

(A) ABCB1, ABCC1, ABCC3 and ABCC10 were visualized in non-resistant and paclitaxel-resistant A549 cells by immunocytochemistry followed by confocal microscopy. Green fluorescence of ABC transporters is derived from Alexafluor488-conjugated secondary antibody, blue DNA was stained with DAPI, whereas lysosomes in red were stained with LysoTracker™ Deep Red. (B and C) The fluorescence intensity, which corresponds to ABC protein level inside cells (B) and colocalization between considered proteins and lysosomes (C) were determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student's t-test or Mann Whitney test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$.

(D) Western blot images of SDS-PAGE separated proteins from whole cell lysates were acquired with ChemiDoc-IT2 (UVP, Meranco, Poznan, Poland). ACTB served as a loading control.

Fig S2. The impact of paclitaxel resistance on ABCB1, ABCC1 and ABCC3 expression and distribution inside MDA-MB-231 cells

(A) ABCB1, ABCC1, ABCC3 and ABCC10 were visualized in non-resistant and paclitaxel-resistant A549 cells by immunocytochemistry followed by confocal microscopy. Green fluorescence of ABC transporters is derived from Alexafluor488-conjugated secondary antibody, blue DNA was stained with DAPI, whereas lysosomes in red were stained with LysoTracker™ Deep Red. (B and C) The fluorescence intensity, which corresponds to ABC protein level inside cells (B) and colocalization between considered proteins and lysosomes (C) were determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student's t-test or Mann Whitney test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$.

(D) Western blot images of SDS-PAGE separated proteins from whole cell lysates were acquired with ChemiDoc-IT2 (UVP, Meranco, Poznan, Poland). ACTB served as a loading control.

Fig S3. Confocal microscopy imaging of lysosomal proteins

Confocal microscopy imaging of lysosomal proteins in non- and paclitaxel-resistant cancer cell lines A549 (A) and MDA-MB-231 (B). ABC transporters were visualized by immunocytochemistry followed by confocal microscopy. Red fluorescence of ABC transporters is derived from Alexa Fluor®546 R-labelled secondary antibody and LAMP1- green fluorescence is derived from Alexafluor488-conjugated secondary antibody. The scans of lysosomes were deconvolved using 3D-Deconvolution accessible in Leica Application Suite X software (LAS X, Leica Microsystems, Germany)

Fig S4. The development of paclitaxel resistance is followed by the intracellular redistribution of Paclitaxel Oregon Green 488 and doxorubicin

(A-B) Comparison of doxorubicin intracellular localization between non-resistant and paclitaxel-resistant cancer cell lines (A549 – A and MDA-MB-231 – B) after their exposure to doxorubicin (0.05 μM ; 24 h; red). The lysosomes were stained with LysoTracker™ Deep Red (green). DNA was stained with DAPI. Cells were observed using TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) confocal microscope (C) The colocalization of Paclitaxel Oregon Green 488 (0.1 μM), endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in non-resistant and paclitaxel-resistant A549 cells was monitored by staining of the latter organelles with BODIPY™ TR Ceramide (red) and pictures were acquired using TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) confocal microscope. DNA was counterstained with DAPI. (E) The colocalization of Paclitaxel Oregon Green 488 (0.1 μM), and mitochondria in non-resistant and paclitaxel-resistant A549 cells was monitored by staining of the mitochondria with MitoTracker™ Red FM (red) and pictures were acquired using TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) confocal microscope. DNA was counterstained with DAPI. Correlation of Paclitaxel Oregon Green 488 and

endoplasmic reticulum/ Golgi apparatus (D) and LysoTracker (F) occurrence was quantified with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student's t-test and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$.

Fig S5. Lysosomotropic neutralizing agent prevents ABCC-dependent drug sequestration in lysosomes of paclitaxel-resistant cancer phenotypes

A) The impact of lysosomotropic neutralizing agent (ammonium chloride - AC; 25 mM, 2 h prior to anthracyclin) and pan-ABCC inhibitor (MK-571; 25 μ M; 2 h prior to anthracyclin) on the intracellular codistribution of doxorubicin (red) and lysosomes (LysoTracker™ Deep Red - green) in cells cultured in monolayer was observed using TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) confocal microscope. DNA was stained with DAPI (blue). (B) The depth of penetration of 3 week old A549-PTX spheroid culture by doxorubicin (0.05 μ M; 24 h; red), co-stained with LysoTracker™ Deep Red (75 nM; 2 h; green) and DAPI (1 μ g/ml; 30 min; blue), with and without Ammonium chloride – AC (25 mM; 2 h prior to doxorubicin). The spheroids was analyzed with Leica Application Suite X on pictures captured with confocal microscope (TCS SP8, Leica Microsystems, Germany). Red fluorescence intensity (ex: 470 and em: 580-600 nm) that corresponds to drug concentration was monitored across spheroid section. (C,D) The depth of penetration of 3 week old A549-PTX spheroid culture by doxorubicin (C) (0.05 μ M; 24 h; red) and (D) Paclitaxel Oregon Green™ 488 (0,1 μ M), co-stained with DAPI (1 μ g/ml; 30 min; blue), with and without MK-571 – iABCC (25 μ M). The spheroids was analyzed with Leica Application Suite X on pictures captured with confocal microscope (TCS SP8, Leica Microsystems, Germany). Paclitaxel Oregon Green™ fluorescence that corresponds to drug concentration was monitored across spheroid section. (E) The role of ABCC in cell protection against doxorubicin-induced cytotoxicity (0.05 μ M; 48 h) in 3D culture of 3 week old A549-PTX spheroids was assayed by spheroid triple staining with Annexin V (green), propidium iodide (red) and DAPI (blue) for 1 h. iABCC was added as in (C,D). Images were acquired as in B, C and D. The green fluorescence intensity of entire spheroid corresponds to the extent of apoptosis in the culture, whereas intensity of red fluorescence to necrosis.

Fig S6. The efficacy of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 targeting with siRNA and lack of siRNA cross-reactivity

(A) Whole cell lysates derived from 2D cell cultures transfected with siRNA against mRNA of ABCC3, ABCC5, ABCC10 and equal molar mixture of all for 72 h were separated using SDS-PAGE. Membranes were stained with anti-ABCC3, anti-ABCC5 and anti-ABCC10 antibodies to confirm selectivity and efficacy of particular siRNAs. Cells transfected with non-template siRNA (siCTRL) served as a control for normal protein level. ACTB was used as a loading control.

Fig S7. The deficiency of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 favors extra-lysosomal localization of doxorubicin

(A) Intracellular localization of doxorubicin (0.05 μ M; 24 h; red) was monitored in cells proficient and deficient in particular ABCC transporters, which were treated with anthracyclin 72 h after transfection with corresponding siRNA. Lysosomes were stained with LysoTracker™ Deep Red (green) and DNA with DAPI.

Fig S8. The silencing of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 declines accumulation of Paclitaxel Oregon Green 488 in lysosomes

(A) Accumulation of Paclitaxel Oregon Green 488 in lysosomes of paclitaxel-resistant A549 cells proficient and deficient in ABCC3, ABCC5 and ABCC10 was evaluated by measuring fluorescence intensity of isolated lysosomes by LSR® II (Becton Dickinson) flow cytometer at ex: 496 nm/em: 524 nm. First, cells were transfected with siRNA for 72 h and then exposed to the fluorescently-labeled paclitaxel (0.1 μ M) for another 24 h. Lysosomes were isolated and fluorescence was read immediately. Lysosomes of siCTRL untreated cells served as background control for lysosome autofluorescence. Numerical values for each cell phenotype in legend (blue and pink boxes)

represent median value of fluorescence distribution.

Fig S9. Simultaneous deficiency of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 sensitizes paclitaxel-resistant cells to doxorubicin

(A and B) Intracellular distribution of doxorubicin (0.05 μ M; 24 h; red) was tested 72 h after paclitaxel-resistant transfection of A549 (A) and MDA-MB-231 (B) with the equal molar mixture of siABCC3, siABCC5 and siABCC10 or non-template control. Lysosomes were stained with LysoTrackerTM Deep Red (green), whereas DNA with DAPI (blue). (C) Colocalization of green and red fluorescence was analyzed and quantified in Leica Application Suite X. (D) 4 week-old 3D PTX-resistant A549 were transfected with mix of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 or siRNA control 72 h prior to treatment with doxorubicin (0,05 μ M; 24 h; red), stained with LysoTrackerTM Deep Red (green) and DAPI (blue). Spheroid fluorescence was captured with confocal microscope (TCS SP8, Leica Microsystems, Germany). The fluorescence intensity plot at spheroid cross section was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X.

Fig S10. ABCC3, ABCC5 and ABCC10 silencing increase proapoptotic effect of doxorubicin and paclitaxel in 3D cancer cell models

(A,B) The role of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 in cell protection against paclitaxel-induced cytotoxicity (0.1 μ M; 48 h) in 3D culture of 4 week old A549-PTX (A) and MDA-MB-231 (B) spheroids was assayed by spheroid triple staining with Annexin V (green), propidium iodide (red) and DAPI (blue) for 1 h. The spheroids was transfected with siRNA against mRNA of ABCC3, ABCC5, ABCC10 and equal molar mixture of all for 72 h. (C,D) The role of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 in cell protection against doxorubicin -induced cytotoxicity (0.05 μ M; 48 h) in 3D culture of 4 week old A549-PTX (C) and MDA-MB-231 (D) spheroids was assayed by spheroid triple staining with Annexin V (green), propidium iodide (red) and DAPI (blue) for 1 h. The spheroids was transfected with siRNA against mRNA of ABCC3, ABCC5, ABCC10 and equal molar mixture of all for 72 h.

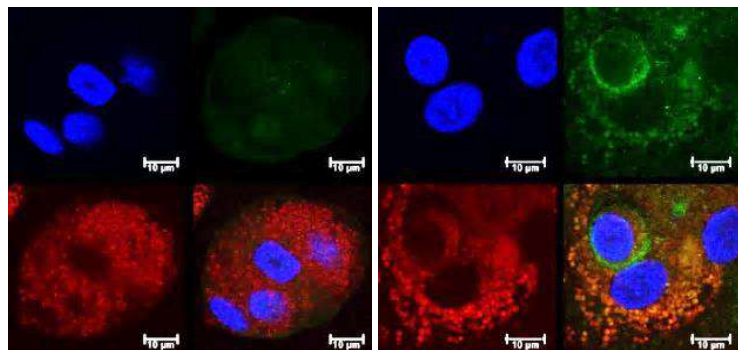
Fig. S1

A

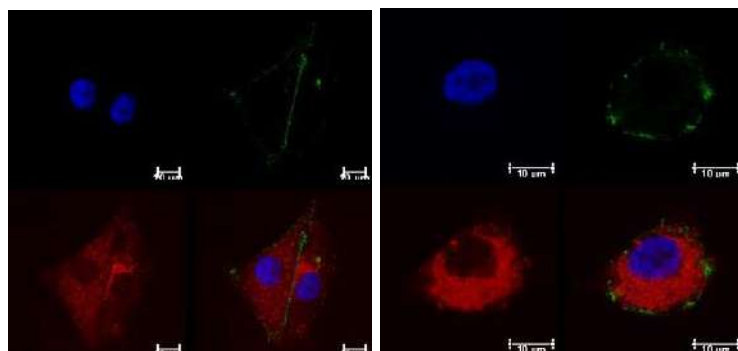
A549

A549-PTX

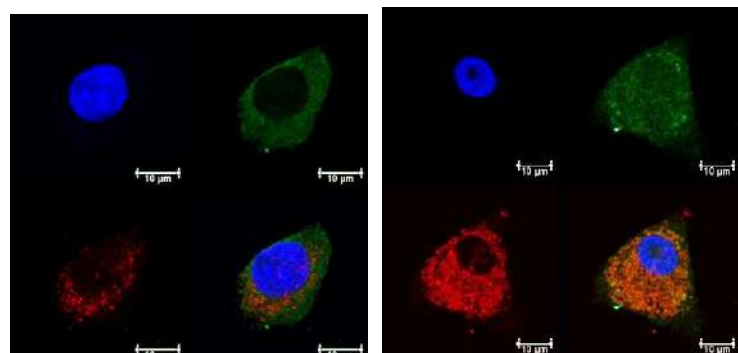
ABCB1



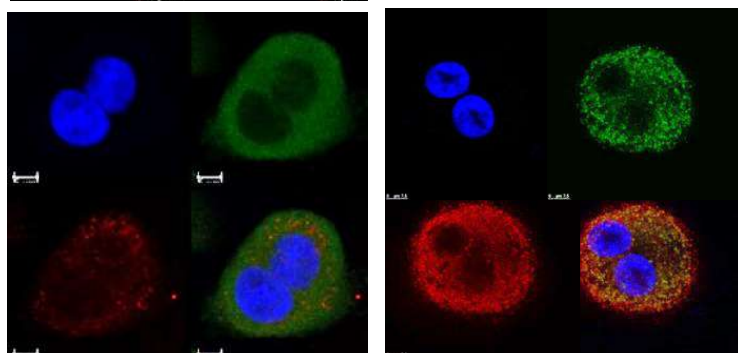
ABCC1



ABCC3



ABCC10



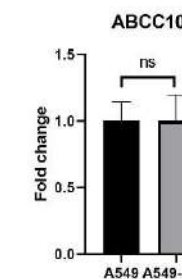
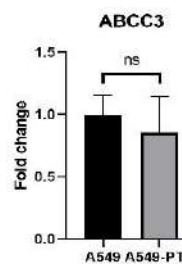
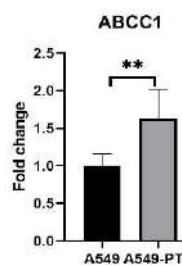
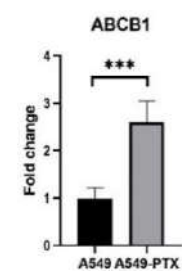
Nucleus

ABC transporters

Lysosomes

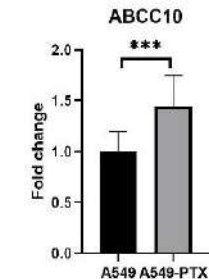
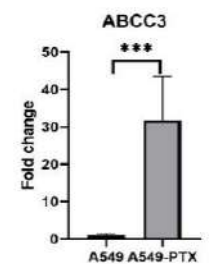
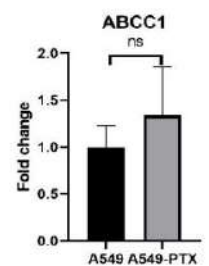
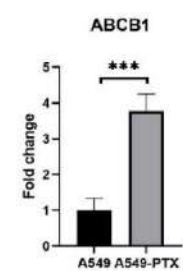
B

Protein expression level



C

Colocalization rate



D

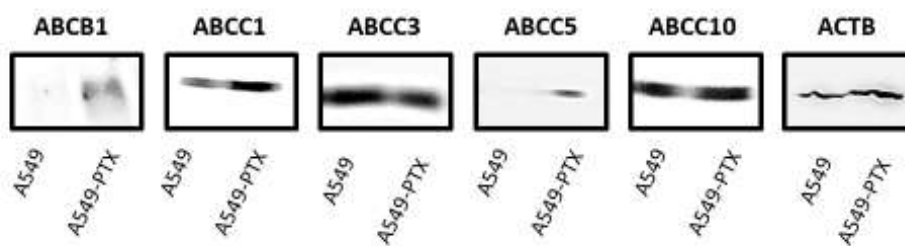
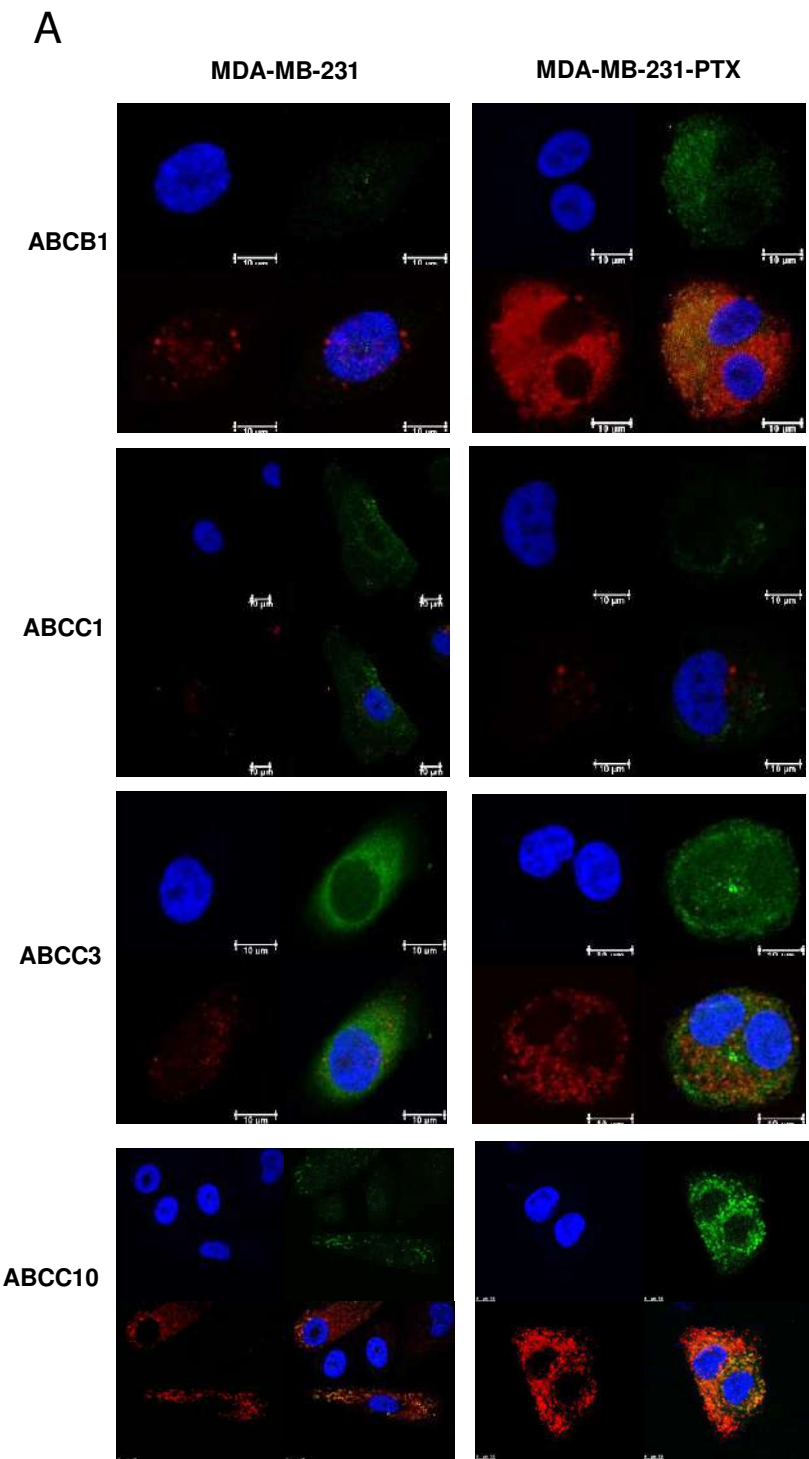
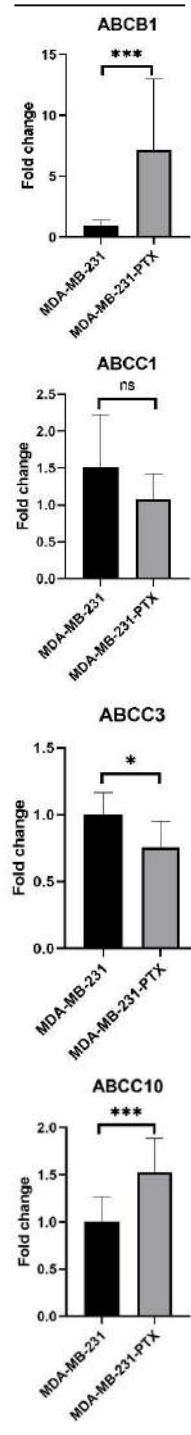


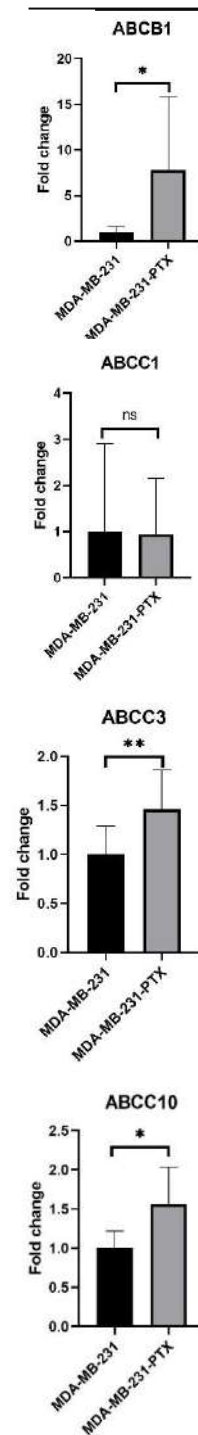
Fig. S2



B Protein expression level



C Colocalization rate



D

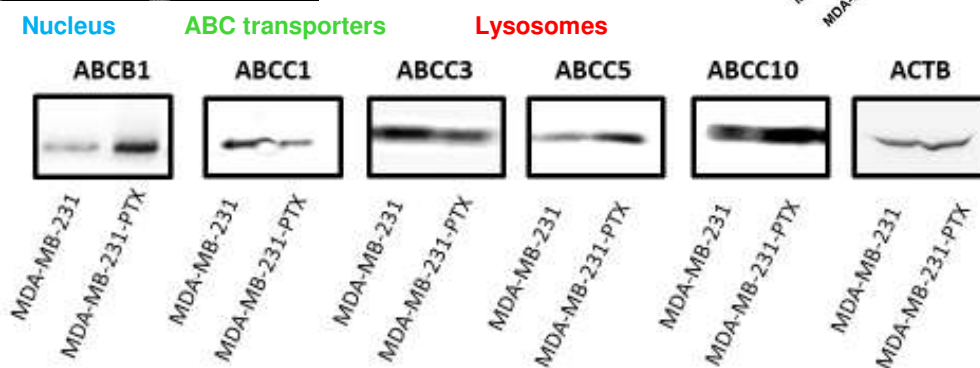


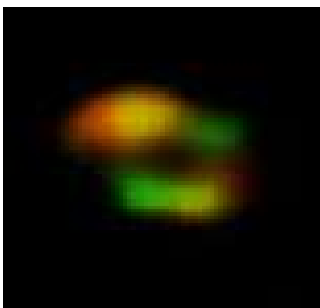
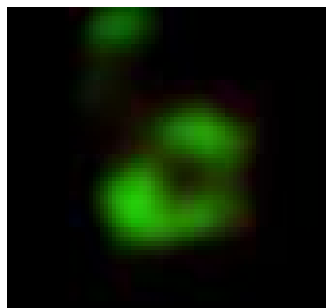
Fig. S3

A

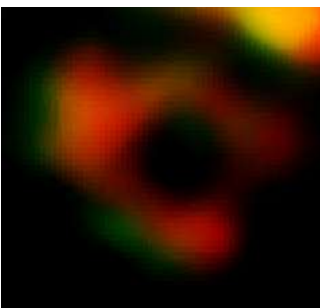
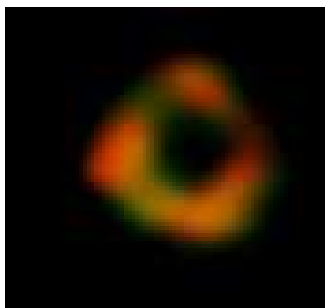
ABCC3

ABCC10

A549



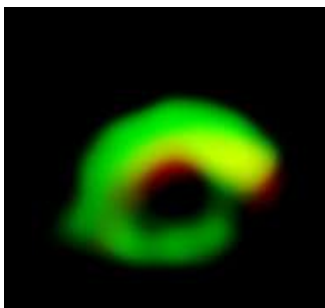
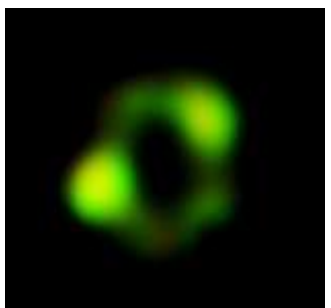
A549-PTX



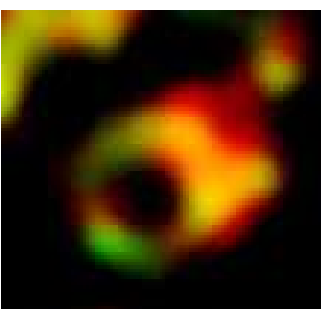
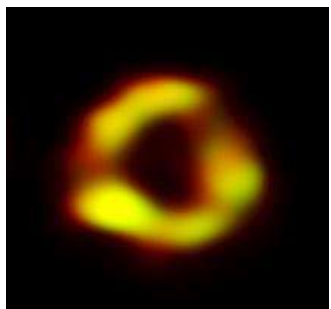
LAMP ABC transporters

B

MDA-MB-231



MDA-MB-231-PTX



LAMP ABC transporters

Fig. S4

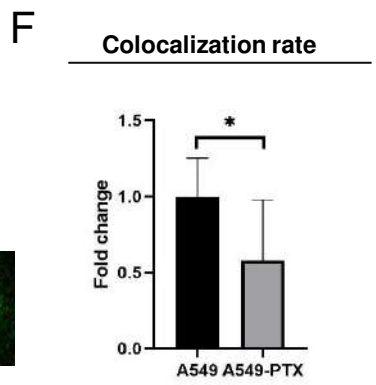
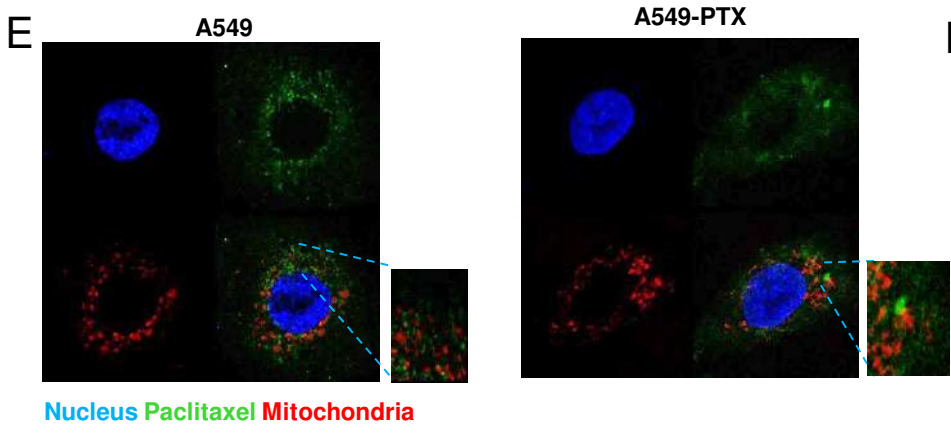
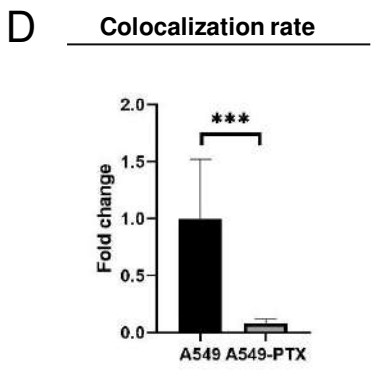
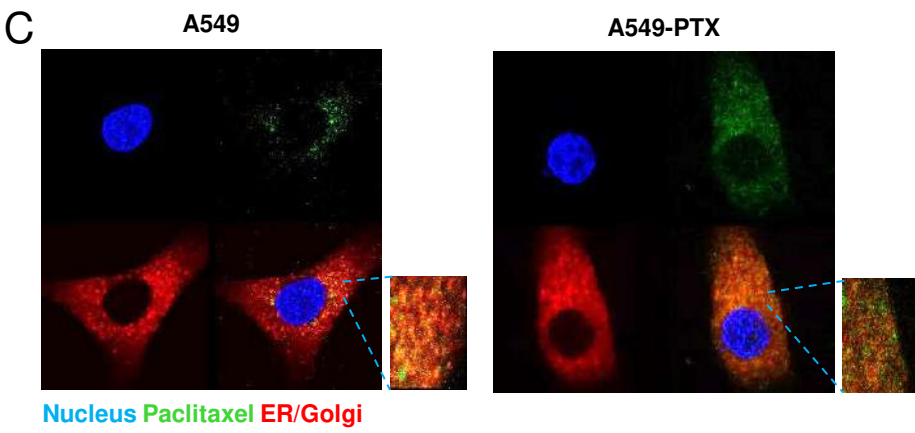
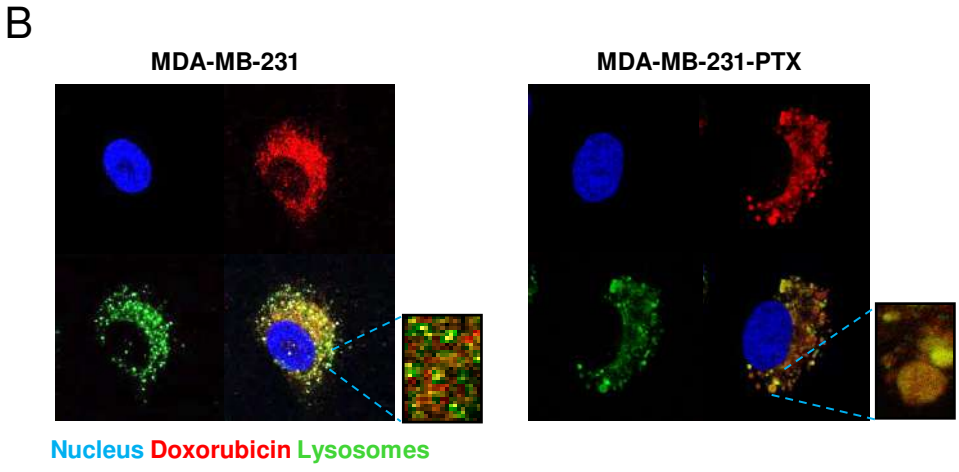
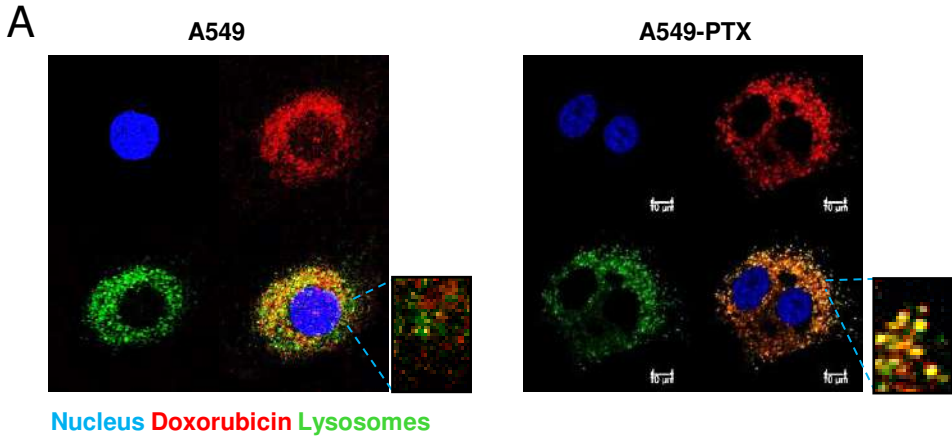
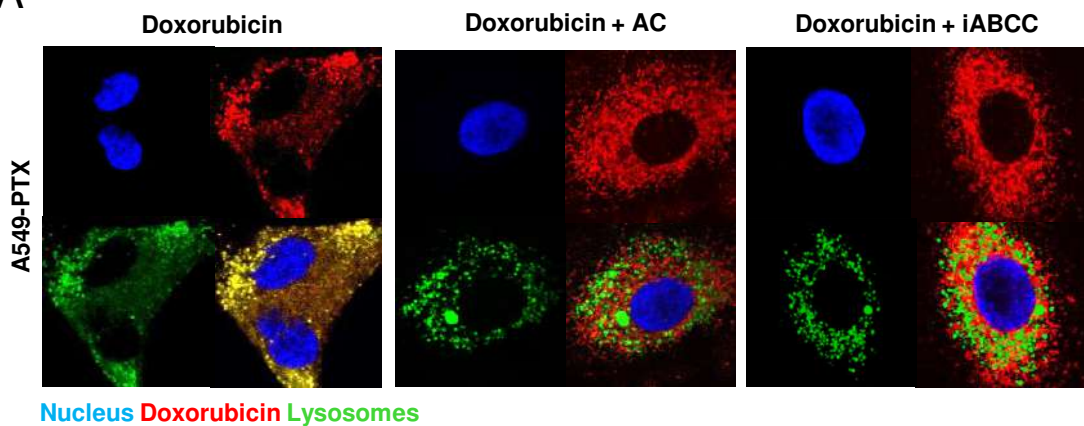


Fig. S5 A

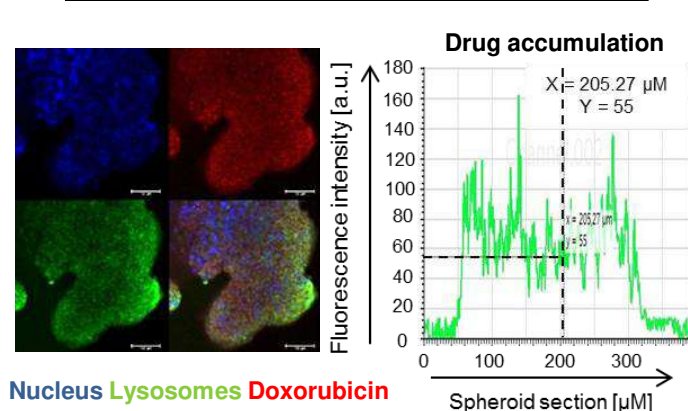
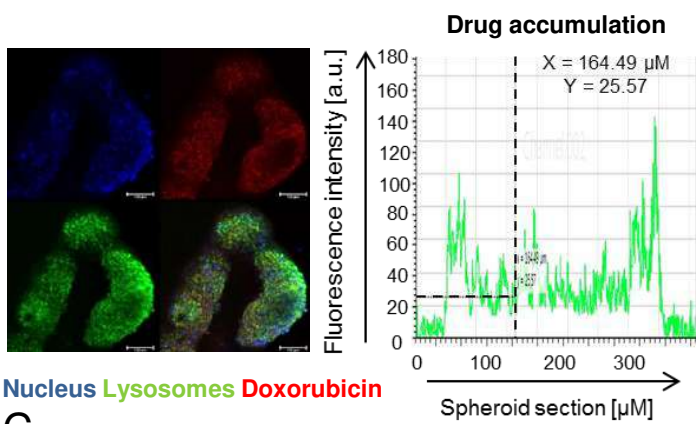


B

Doxorubicin

A549-PTX spheroids

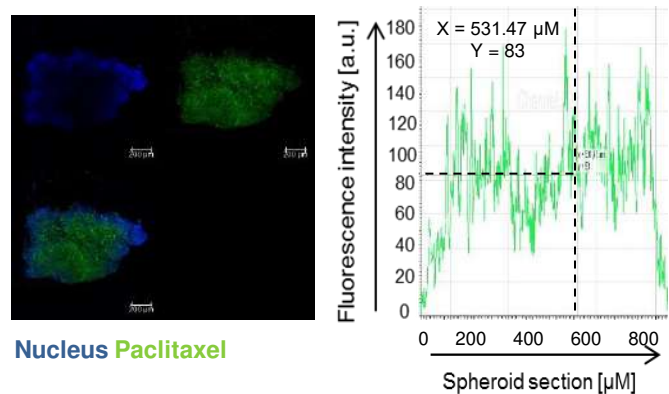
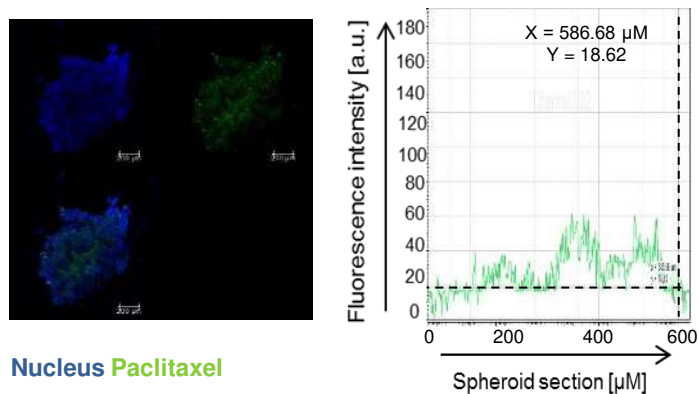
Doxorubicin + AC



C

Paclitaxel

Paclitaxel + iABCC



D

Doxorubicin

Doxorubicin + iABCC

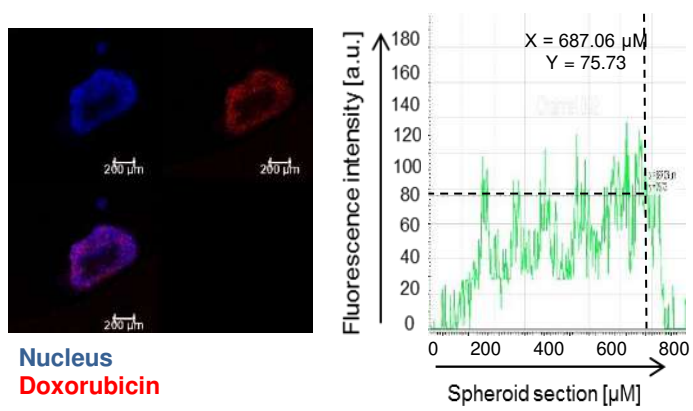
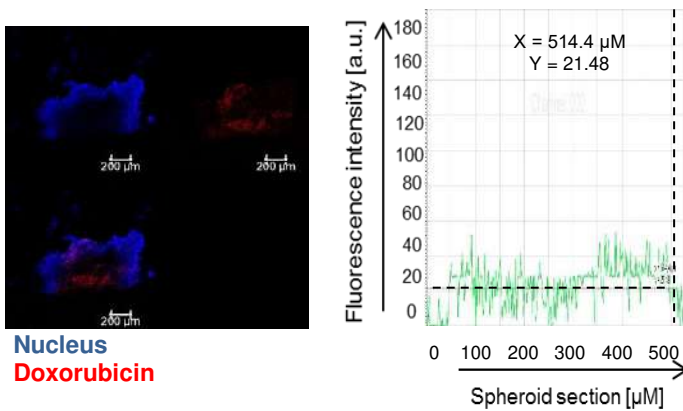


Fig. S5

E

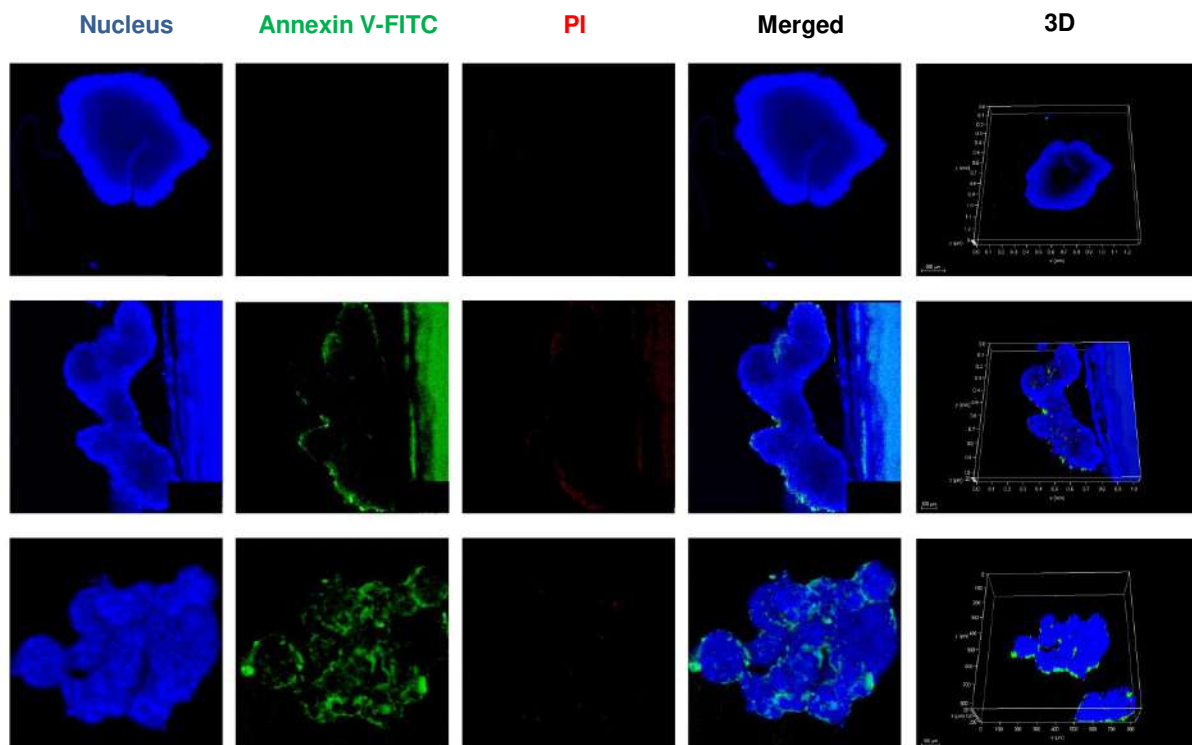


Fig. S6

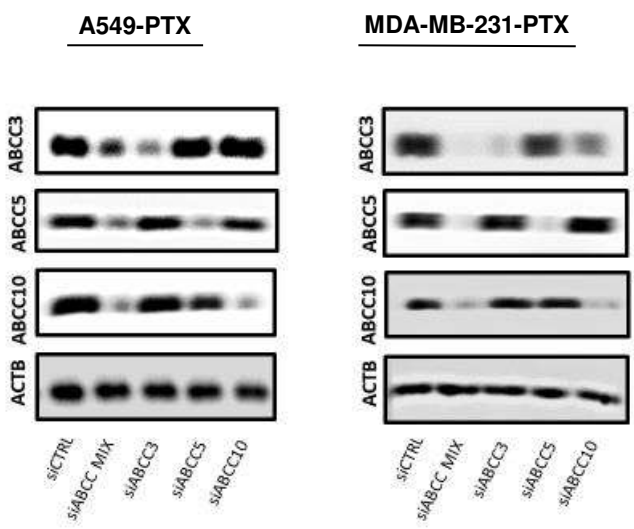


Fig. S7

MDA-MB-231-PTX + Paclitaxel

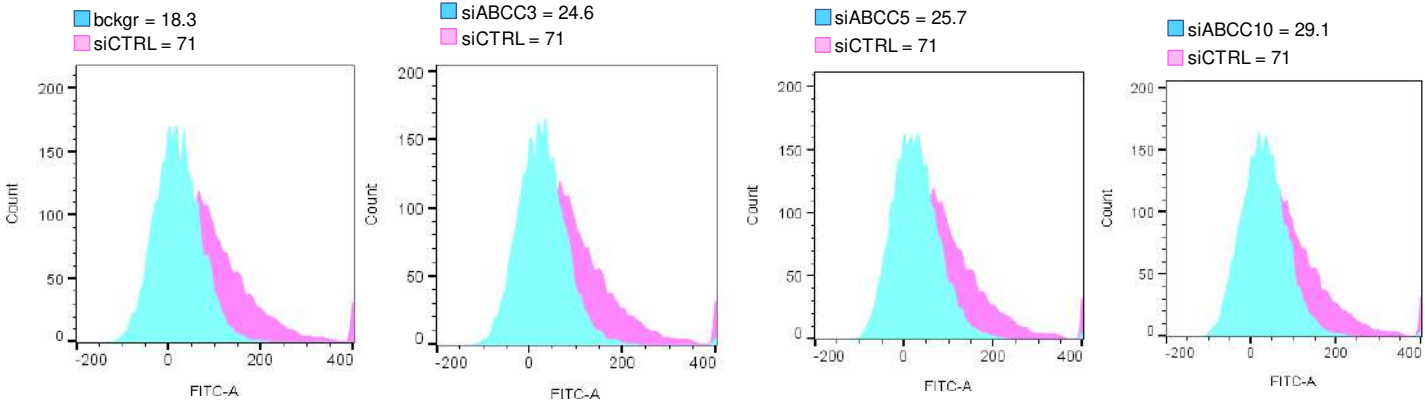


Fig. S8

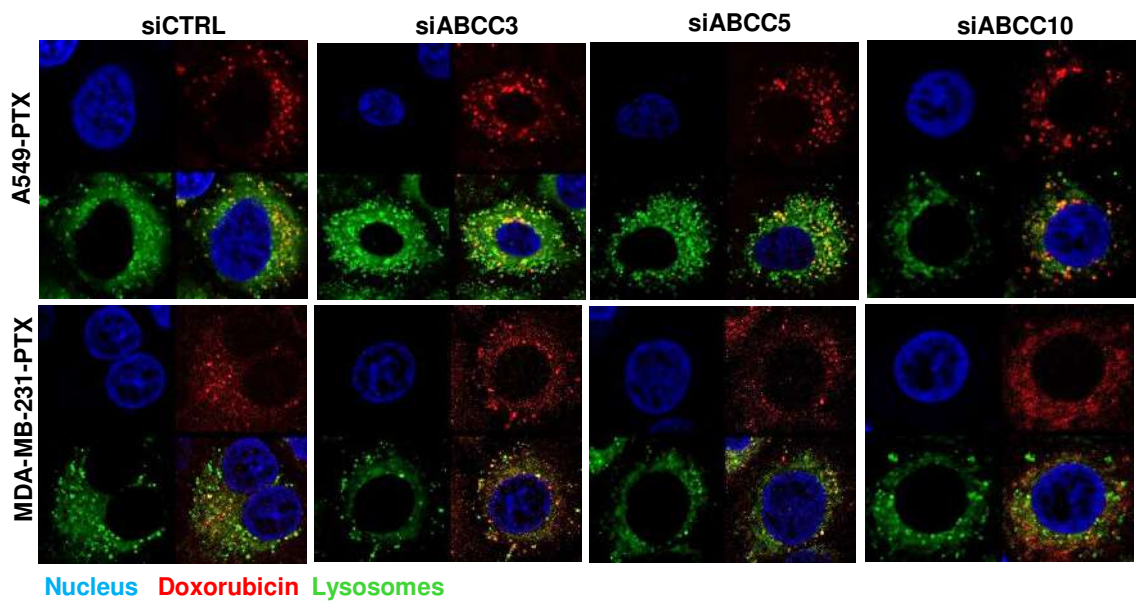


Fig. S9

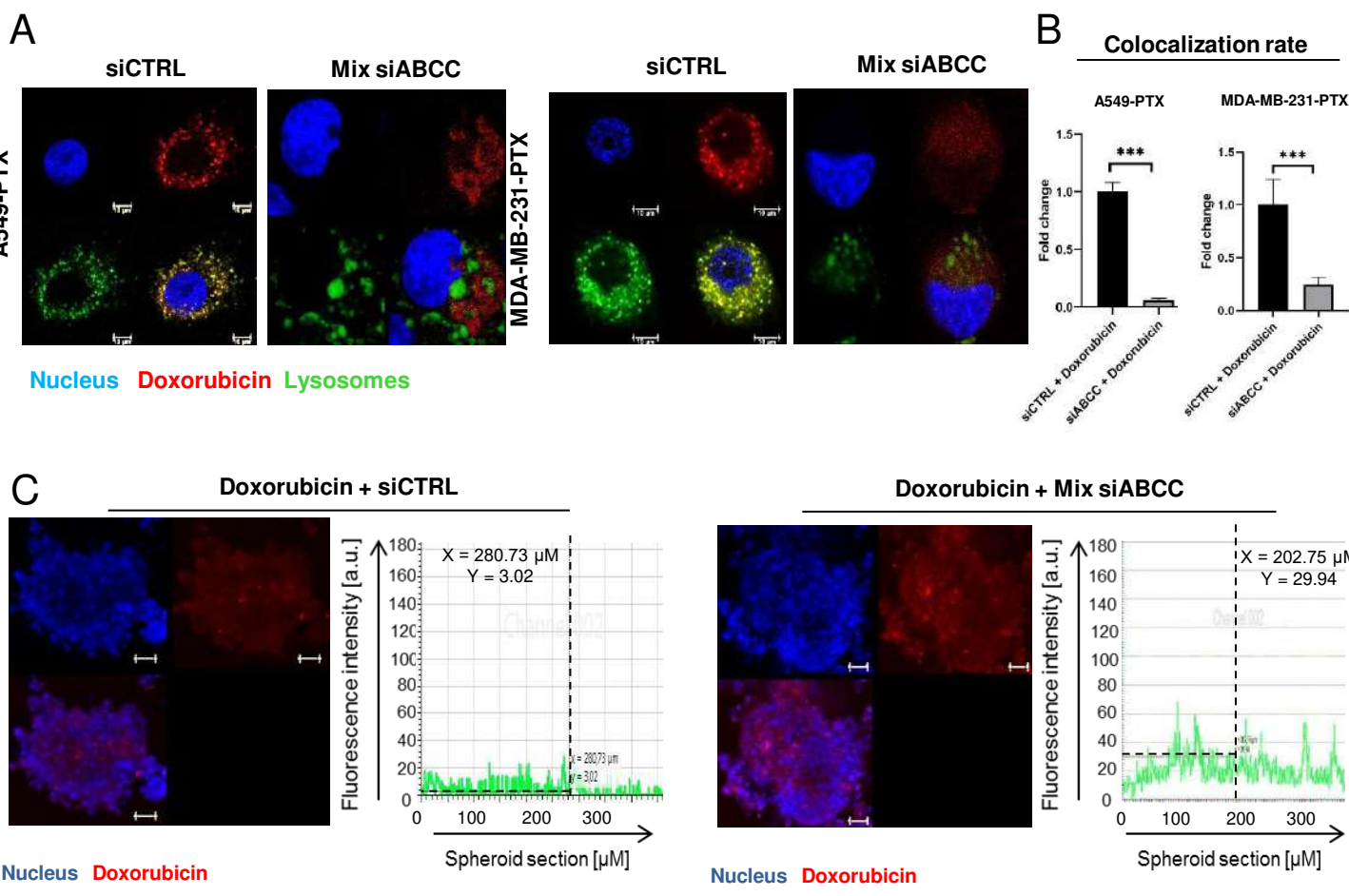
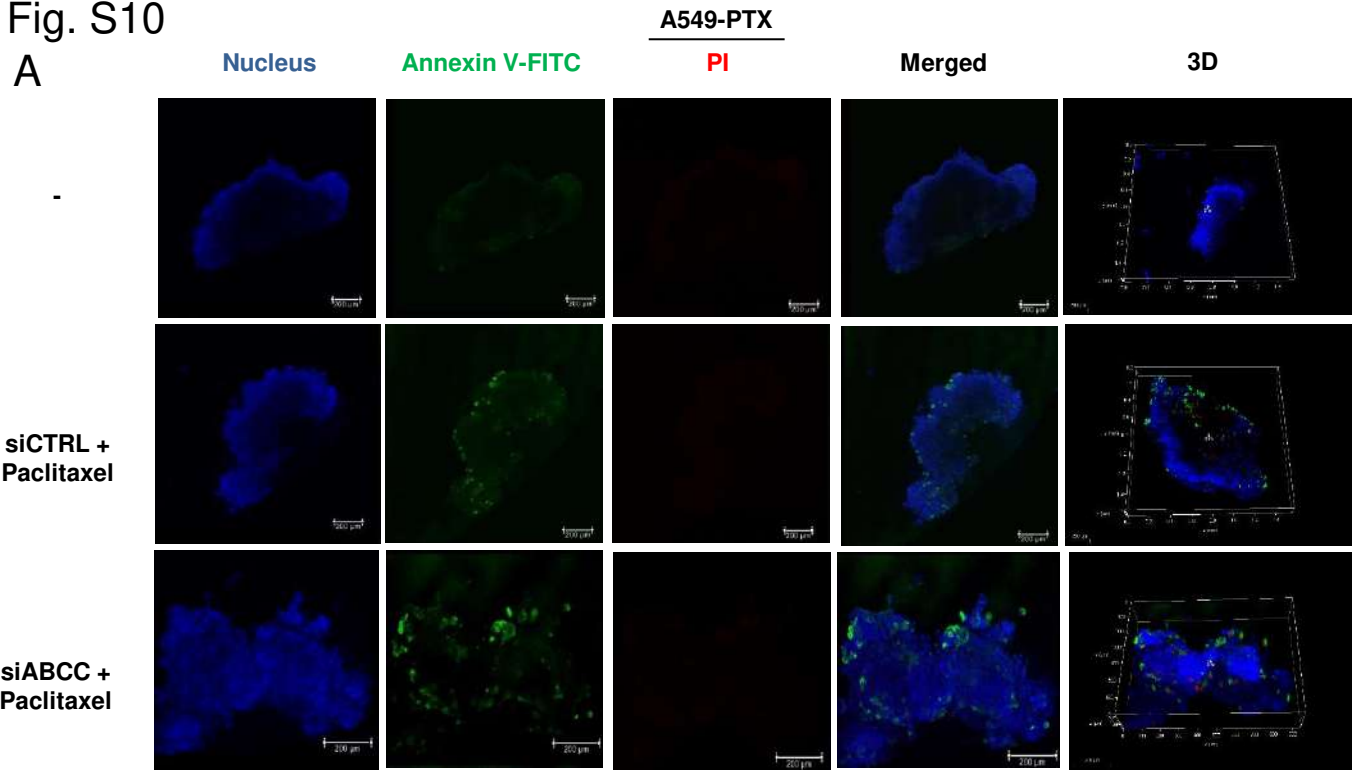


Fig. S10

A



B

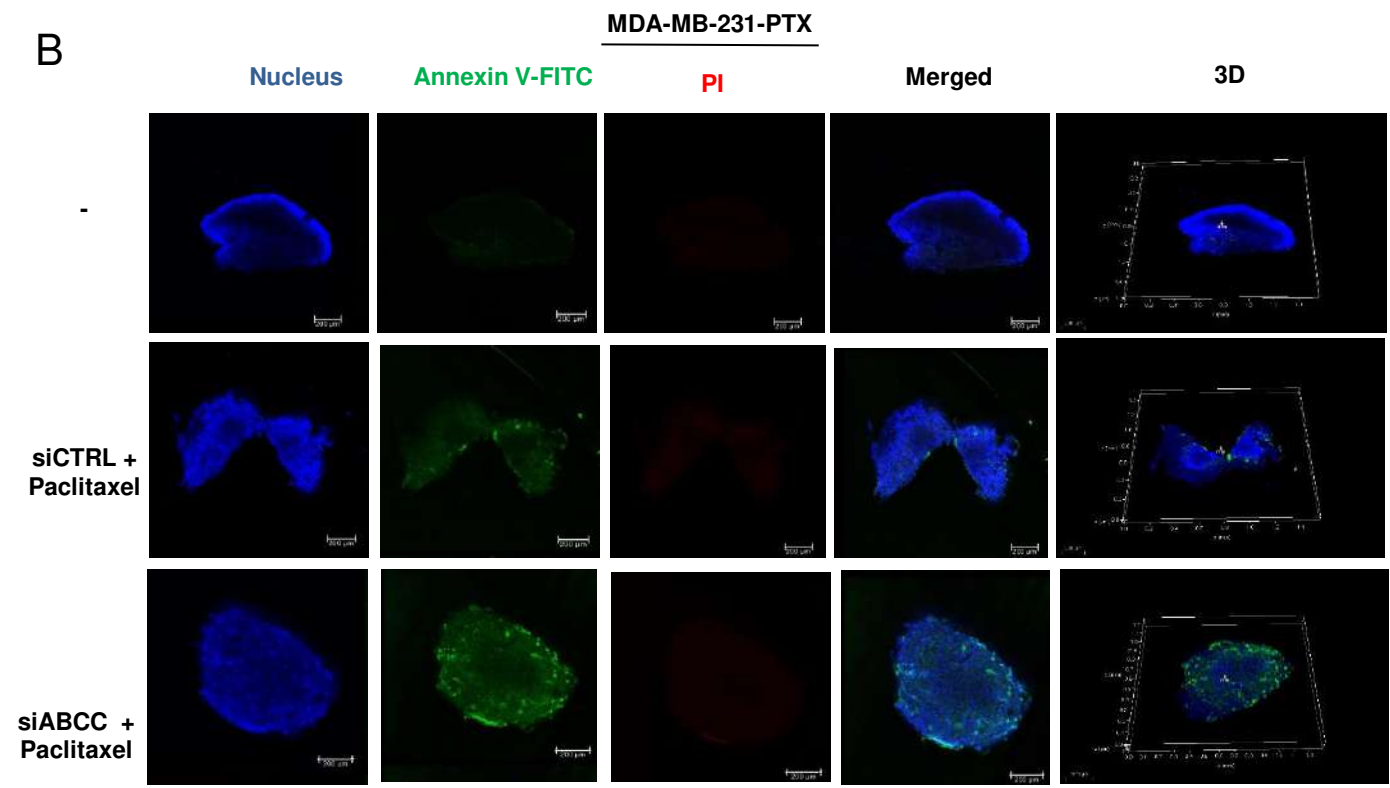


Fig. S10

A549-PTX

C

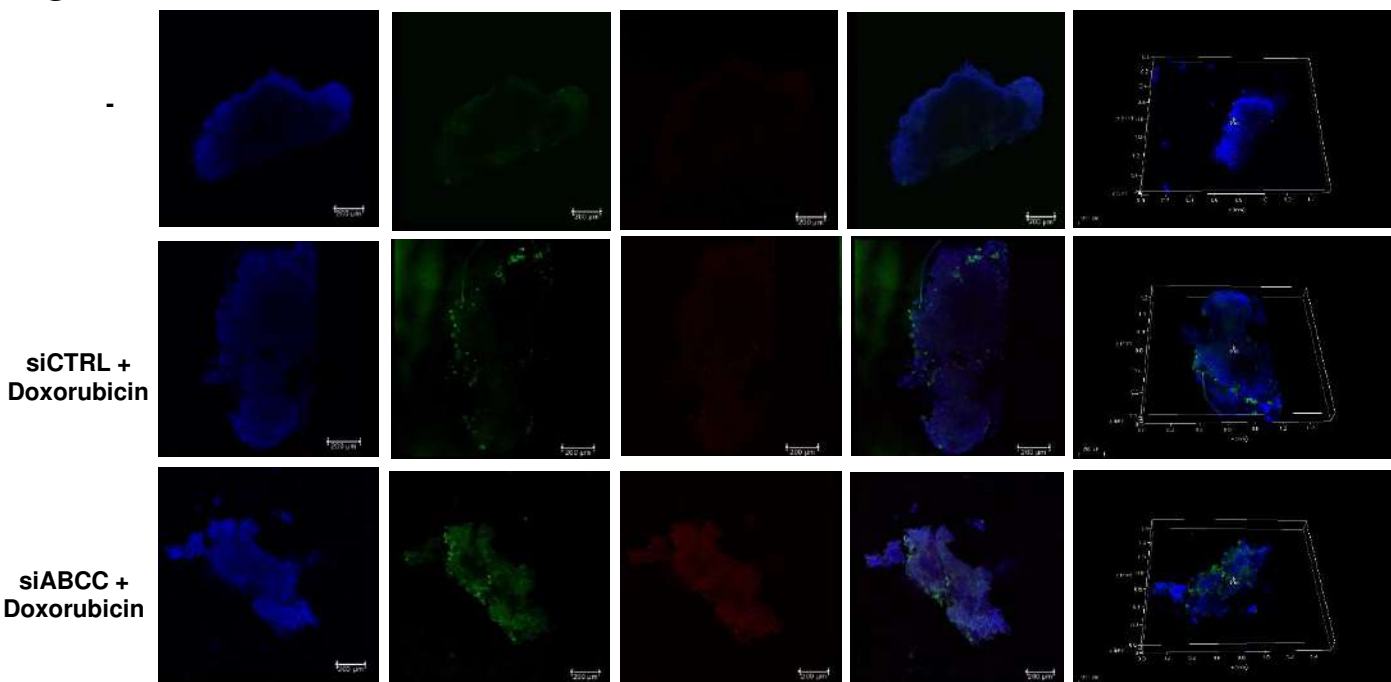
Nucleus

Annexin V-FITC

PI

Merged

3D



MDA-MB-231-PTX

D

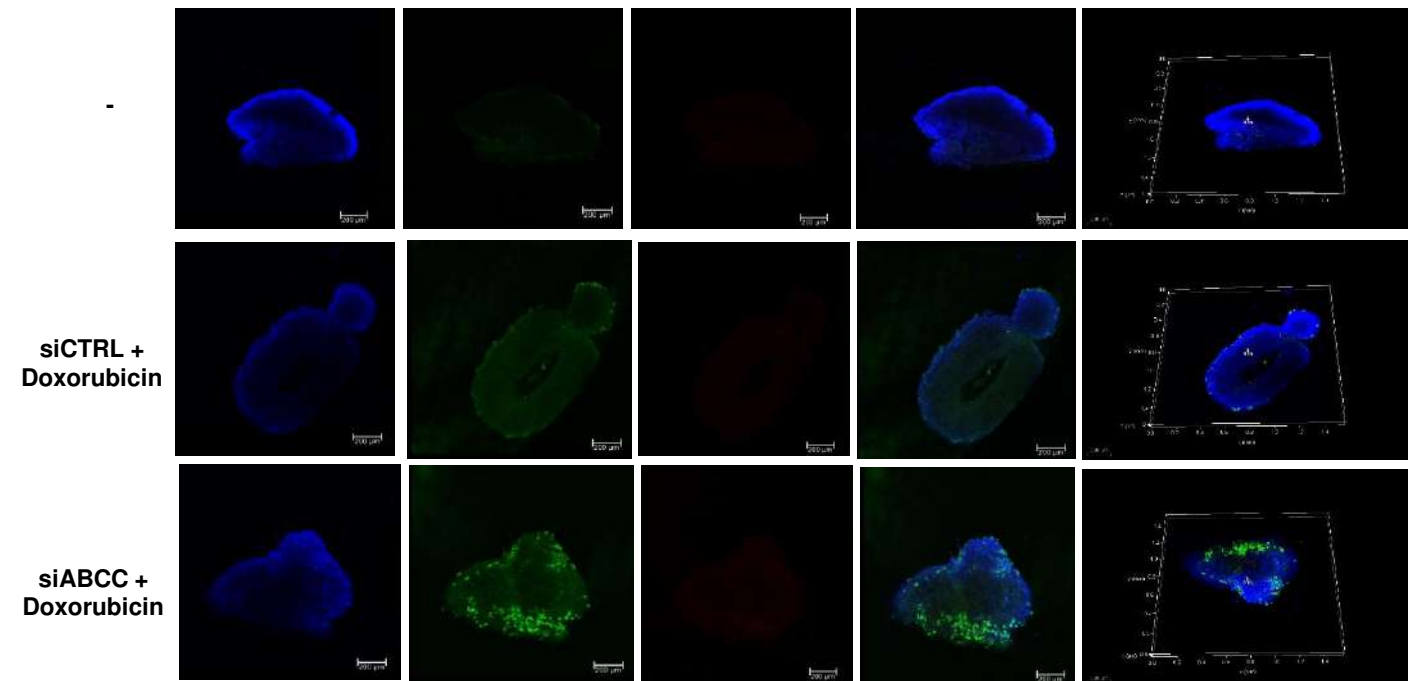
Nucleus

Annexin V-FITC

PI

Merged

3D



The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics

BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JPET-D-25-00257
Full Title:	BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel
Article Type:	Article
Section/Category:	Cellular and Molecular
Keywords:	BRG1; multidrug resistance; ATP-binding cassette (ABC) transporters; lysosomal trapping; paclitaxel
Corresponding Author:	Agnieszka Robaszkiewicz University of Lodz Lodz, POLAND
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	University of Lodz
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Karolina Gronkowska
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Karolina Gronkowska Sylvia Michlewska Tomasz Płoszaj Magdalena Strachowska Adrianna Stępień Maciej Borowiec Andrzej Bednarek Agnieszka Robaszkiewicz
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Multidrug resistance of cancer cells is attributed to drug-induced alteration of numerous intracellular processes. Using clinically relevant models of triple-negative breast and non-small lung cancer cells we previously showed that these cells respond to repeated paclitaxel exposure by inter alia lysosome enrichment in ABCC3, ABCC5 and ABCC10, which contribute to drug sequestration in these organelles and reduced drug cytotoxicity. In this study we provide experimental evidence that transcription of above mentioned ABCC genes is enabled by BRG1-based SWI/SNF chromatin remodeling complex. Pharmacological inhibition of SWI/SNF with PFI3 or ACBI1, the PROTAC degrader of SMARCA2/4, substantially decline transcription of ABCC3, ABCC5 and ABCC10. Similar effect is caused by transient silencing of SMARCA4 (BRG1), but not SMARCA2 (BRM). The deficiency of BRG1 led to extralysosomal distribution of anticancer drugs, their deeper penetration of spheroids and substantial increase in drug cytotoxicity. Interestingly, in BRG1 deficient cell line paclitaxel triggered mutations, which reverted BRG1 truncating deletion in SMARCA4, thereby restoring SWI/SNF ATPase expression in paclitaxel-resistant cells and increasing transcription of ABCC. Acquisition of drug resistance was associated with BRG1 redistribution in the genome, de novo occurrence at the promoters of genes functionally linked to endo-lysosomal system and stronger co-occurrence with EP300. Our study indicates possible target - SWI/SNF complex for anticancer combinatorial interventions in paclitaxel-induced multidrug resistant phenotypes.
Opposed Reviewers:	

BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel

Karolina Gronkowska^{1,2}, Sylwia Michlewska³, Tomasz Płoszaj⁴, Magdalena Strachowska^{1,2},
Adrianna Stępień¹, Maciej Borowiec⁴, Andrzej Bednarek⁵, Agnieszka Robaszkiewicz^{1*}

¹ Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz,
Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland

² Bio-Med-Chem Doctoral School of the University of Lodz and Lodz Institutes of the Polish Academy of Sciences,
University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland

³ Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques, Faculty of Biology and Environmental
Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland.

⁴Department of Clinical Genetics, Medical University of Lodz, Pomorska 251, 92-213 Lodz, Poland

⁵Department of Molecular Carcinogenesis, Medical University of Lodz, Żeligowskiego 7/9, 90-752 Lodz, Poland

*Corresponding author

Agnieszka Robaszkiewicz, Ph.D., D. Sc., associate professor

Department of General Biophysics, University of Lodz

Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland

Phone +48 426354449, email: agnieszka.robaszkiwicz@biol.uni.lodz.pl

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

Abstract:

Multidrug resistance of cancer cells is attributed to drug-induced alteration of numerous intracellular processes. Using clinically relevant models of triple-negative breast and non-small lung cancer cells we previously showed that these cells respond to repeated paclitaxel exposure by inter alia lysosome enrichment in ABCC3, ABCC5 and ABCC10, which contribute to drug sequestration in these organelles and reduced drug cytotoxicity. In this study we provide experimental evidence that transcription of above mentioned ABCC genes is enabled by BRG1-based SWI/SNF chromatin remodeling complex. Pharmacological inhibition of SWI/SNF with PFI3 or ACBI1, the PROTAC degrader of SMARCA2/4, substantially decline transcription of ABCC3, ABCC5 and ABCC10. Similar effect is caused by transient silencing of SMARCA4 (BRG1), but not SMARCA2 (BRM). The deficiency of BRG1 led to extralysosomal distribution of anticancer drugs, their deeper penetration of spheroids and substantial increase in drug cytotoxicity. Interestingly, in BRG1 deficient cell line paclitaxel triggered mutations, which reverted BRG1 truncating deletion in SMARCA4, thereby restoring SWI/SNF ATPase expression in paclitaxel-resistant cells and increasing transcription of ABCC. Acquisition of drug resistance was associated with BRG1 redistribution in the genome, de novo occurrence at the promoters of genes functionally linked to endo-lysosomal system and stronger co-occurrence with EP300. Our study indicates possible target - SWI/SNF complex for anticancer combinatorial interventions in paclitaxel-induced multidrug resistant phenotypes.

37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

Significance Statement:

We provide evidence that BRG1 inhibition with PFI3 and degradation of *SMARCA4* mRNA substantially declines lysosomal drug sequestration and potentiate drug toxicity. Therefore, BRG1 targeting can be considered as candidate for combinatorial anticancer therapy with some standard chemotherapy drugs.

49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Keywords: BRG1, multidrug resistance, ATP-binding cassette (ABC) transporters, lysosomal trapping, paclitaxel

1. Introduction:

1
2 Taxanes are successful in treating a variety of cancers due to a combination of
3 peculiarities, in particular their unique ability to modulate various cellular processes associated
4 with tumor growth and metabolism (apoptosis, angiogenesis, oxidative stress, etc.). This
5 efficacy has been confirmed in the treatment of both solid and disseminated tumors. Three
6 different taxanes are available on the market: paclitaxel (PTX), marketed under the
7 tradenames Taxol®, Anzatax® or Paxene®, the synthetic derivative of PTX - docetaxel (DTX)
8 (Taxotere®) and a recently synthesized cabazitaxel (CTX) (Jevtana®) [1]. PTX is a major first-
9 line drug for the treatment of advanced non-small cell lung, breast and ovarian cancers [2–4].
10 At high concentrations, PTX prevents cell division by promoting an assembly of stable
11 microtubules especially from β -tubulin heterodimers, and inhibits their depolymerization. The
12 exposed cells are arrested in the G2/M-phase of the cell cycle and undergo apoptosis. At low
13 concentrations, apoptosis is induced at G0 and G1/S phase either via Raf-1 kinase activation
14 or p53/p21 depending on the administered dose [2]. However, the development of resistance
15 to paclitaxel leads to treatment failure, tumor recurrence and limits the use of this drug. Major
16 mechanisms of resistance include altered apoptotic pathways, overexpression of pumps that
17 actively transport the drug out of the cells, reduced drug uptake, increased drug metabolism,
18 alteration in the tubulin dynamic, mutations in the β -tubulin gene or expression of β -tubulin
19 isotypes [2,5,6]. Many of these mechanisms occur at the genomic level and involve
20 modification in the signaling routes, which then modulate activity of the subset of transcription
21 factors and the epigenetic transformation of chromatin. Several reports have suggested that
22 DNA methylation and epigenetic silencing of *inter alia* pro-apoptotic genes and tumor
23 suppressors result in resistance acquisition [7].

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40 Acquired paclitaxel resistance *via* the alteration of the cell transcriptome can involve
41 the overexpression of ATP-binding cassette (ABC) transporters that use energy from ATP
42 hydrolysis to translocate substances across the cell membranes. Acquisition of paclitaxel
43 resistance has been linked to the overexpression of ABCB1 in lung cancer cells [8–10], triple
44 negative breast cancer cells [11], ovarian cancer cells [12], ABCC5 in nasopharyngeal
45 carcinoma cells [13] and ABCC10 in lung cancer cells [9]. In our previous study, it was shown
46 that regardless of the alteration in gene expression, paclitaxel induced intracellular
47 redistribution of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 and their enrichment in lysosomes. The use of
48 ABCC inhibitors and the transient silencing of these 3 genes considerably limited the
49 accumulation of doxorubicin and Paclitaxel OregonGreen488 in lysosomes and sensitized
50 cancer cells to various structurally unrelated chemotherapeutics [14]. Since these 3
51 transporters are mostly located in lysosomes in the tested paclitaxel-resistant cell lines, their
52 transcriptional repression could overcome lysosome-mediated drug resistance.
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
Previous studies on the regulation of ABC gene transcription describe the role of transcription factors, epigenetic enzymes and chromatin remodeling in cell adaptations to paclitaxel [13,15–19]. GCN5 acetyltransferase increased the transcription of ABCB1 and ABCG2 PTX-resistant ovarian cancer cells [20], whereas EP300 was responsible for the overexpression of several ABC transporters in PTX- doxorubicin- and cisplatin-resistant breast and lung cancers [21]. The transcription activating role of the latter enzyme was found to be supported by the BRG1-SWI/SNF complex at the subset of E2F-dependent gene promoters in proliferating cells [22,23]. Expression of several ABC transporters such as ABCB1, ABCC2, ABCC11, ABCG1 and ABCG2 in breast cancer cells has been attributed to the activity of BRG1 that was also found at gene promoters of some ABC genes in MDA-MB-231 cells [24]. BRG1 and BRM are the crucial ATP-dependent and enzymatically active components of the chromatin remodeling complex SWI/SNF, they are mutually exclusive with additional subunits combinatorically incorporated to the complex in a context-dependent manner. The diversity of the composition of the remaining subunits enables highly specific interactions of the complexes with activators and repressors of transcription and the recognition of histone modifications, which in turn determine the location of the complexes within the genome and the direction of local chromatin remodeling -i.e. its tightening or loosening. Recent reports indicate that approximately 20% of human cancers contain mutations in the subunits of the SWI/SNF complex [25]. BRG1, encoded by the *SMARCA4* gene, is one of the most frequently altered elements of the complex in cancer cells. Elevated expression of BRG1 occurred in 35% - almost 100% of analyzed primary tumors and was linked with a high proliferation rate. A BRG1-dependent increase in cancer cell division was assigned to the upregulation of the expression of enzymes responsible for fatty acid and lipid biosynthesis, induction of ABC transporter expression and high transcription rate of genes encoding direct drivers of cell proliferation (signaling cascades, checkpoints and DNA replication genes) [23].

43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
Knowing that BRG1 augments transcription of some ABC proteins in response to single doses of various drugs and that this transcription co-regulator occurs at the gene promoters of some ABC genes in non-resistant cancer cells, we tested the possible contribution of this ATPase to ABC-driven paclitaxel resistance in clinically-relevant models of paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer (MDA-MB-231) and non-small cell lung cancer (A549). Particular attention was paid to the role of BRG1 in the regulation of *ABCC3*, *ABCC5* and *ABCC10* gene transcription due to the involvement in lysosomal drug sequestration and hence, cell protection from some anticancer drugs as was previously described in Gronkowska *et al* [14]. Finally, we tested the selective BRG1/BRM inhibitor PFI3 as well as novel *SMARCA2/4* PROTAC degrader - ACBI1 as a potential sensitizer of multidrug resistant cells to standard chemotherapy drugs.

2. Materials and Methods

2.1 Materials:

Non-small-cell lung cancer cell line A549 and breast cancer cell line MCF7 were purchased from ATCC. Breast cancer cell line MDA-MB-231 was purchased from Sigma Aldrich. DMEM High Glucose w/ L-Glutamine w/ Sodium Pyruvate, fetal bovine serum and antibiotics (penicillin and streptomycin) were from Biowest (CytoGen, Zgierz, Poland). KAPA SYBR® FAST Universal (2x), KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2x), oligonucleotides for Real-time PCR, resazurin sodium salt, doxorubicin hydrochloride, daunorubicin hydrochloride, cisplatin, paclitaxel, etoposide, were from Sigma Aldrich (Poznan, Poland). PFI-3 (Cayman Chemical), ACB11 (Cayman Chemical) and Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide were ordered in Biokom (Janki/Warsaw, Poland). siRNA Control (sc-37007) and anti-MRP5 (E-10) (sc-376965) antibodies was purchased from Santa Cruz Biotechnology (AMX, Lodz, Poland). SMARCA4 Silencer Select siRNA (s13141), SMARCA2 Silencer Select siRNA (s536647), Lipofectamine RNAiMAX, OptiMem, Dynabeads™ Protein G, UltraPure™ Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1, v/v) (#15593031), TRI Reagent™, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Hi-Di formamide, SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate, PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#01154870), Pierce™ Protease Inhibitor Tablets (EDTA-free; PIC), Paclitaxel Oregon Green™ 488 conjugate (Flutax-2), LysoTracker™ Deep Red, SlowFade™ Glass Soft-set Antifade Mountant (with DAPI), anti-MRP3 (ABCC3) Polyclonal Antibody (PA5101482), anti-MRP10 (ABCC10) Polyclonal Antibody (PA5101678), Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 546 (#A-11010), PowerUp™ SYBR® Green Master Mix, TaqMan™ Universal Master Mix II, TaqMan™ Gene Expression Assays (FAM-MGB/20X) for ACTB (Hs01064292_g1), GAPDH (Hs02786624_g1), HPRT1 (Hs03929096_g1), ABCB1 (Hs00184500_m1), ABCC1 (Hs01561483_m1), ABCC2 (Hs00960489_m1), ABCC3 (Hs00978452_m1), ABCC4 (Hs00988721_m1), ABCC5 (Hs00981089_m1), ABCC10 (Hs01056200_m1), ABCG2 (Hs01053790_m1) were from Thermofisher Scientific (Thermofisher Scientific, Warsaw, Poland). Anti - Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E) Rabbit mAb (# 9664), anti-BRG1 (D1Q7F) Rabbit mAb (#49360), anti-Histone H3 (1B1B2) Mouse mAb (#14269), anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (#7074), Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (#7076), Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate) (#4412), Anti-mouse IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (PE Conjugate) (#59997S), Anti-rabbit IgG Fab2 Fragment Alexa Fluor® 594 Probes (#8889S) were from Cell Signaling Technologies (LabJOT, Warsaw, Poland). NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep with Sample Purification Beads (#E7104), NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (#E7490), NEBNext® Ultra™ II RNA Library Prep Kit for Illumina® (#E7770),

1 NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep with Sample Purification Beads (#E7103) and
2 NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 3) (#E7710) were from New
3 England Biolabs (LabJOT, Warsaw, Poland). BIOFLOAT FLEX coating solution was
4 purchased from FaCellitate (faCellitate.com). Annexin V Apoptosis Detection Kit with
5 Propidium iodide was purchased from BioLegend (BioCourse.pl, Katowice, Poland). MGIEasy
6 PCR-Free DNA Library Prep Set and DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Kit
7 (FCL SE100) were from Perlan Technologies (Perlan Technologies Poland, Warsaw, Poland)

11 **2.2 Cell Culture and Treatment**

12 A549 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin
13 (50 U/ml and 50 µg/ml, respectively) in 5% CO₂. Initially, MDA-MB-231 cells were cultured in
14 F15 medium supplemented with 15% FBS and penicillin/streptomycin (50 U/ml and 50 µg/ml,
15 respectively) without CO₂ equilibration. After 5 passages, the cells were adapted to grow in
16 DMEM supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin (50 U/ml and 50 µg/ml,
17 respectively) in 5% CO₂. Paclitaxel resistance induction and characteristics of resistant cell
18 lines was described previously [14,21].

19 PFI-3 (2.5 µM) and ACB11 (0.5 µM) were added to cells 72 h before analysis or treatment with
20 anticancer drugs. Depending on the tested parameters anticancer drugs were administrated
21 to cells for 24 or 48h.

22 **2.3 Formation of cell spheroids**

23 Nunc™ Lab-Tek™ chamber slides were coated with faCellitate BIOFLOAT FLEX coating
24 solution according to the manufacturer protocol. After 30 minutes of air-drying of the chambers,
25 within the laminar flow hood, the cells were seeded per well at a density of 20,000 cells. Cells
26 grow in DMEM supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin (50 U/ml and 50 µg/ml,
27 respectively) in 5% CO₂ to allow spheroids formation for 21 days.

28 **2.4 Transient Gene Silencing**

29 Cells seeded per well at a density of 100,000 cells on the 24-well plate, 10,000 cells on Nunc™
30 Lab-Tek™ Chamber Slide or three-week spheroids were transfected using siRNA-RNAiMAX
31 complexes according to the previously described protocol [26]. After 6 h incubation with the
32 complexes, DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics was added to the desired
33 volume and cells were grown for another 48 h to obtain transient gene silencing.

34 **2.5 Real-Time PCR**

35 For mRNA expression evaluation, total RNA was extracted from cells using TRI Reagent™.
36 Afterwards, mRNA was reverse transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse
37

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Transcription Kit. The expression of selected genes was measured in Bio-Rad CFX96 C1000 Touch Real-Time system, using:

1) TaqMan™ gene expression assays and the TaqMan™ universal master mix II, according to the protocol provided by the manufacturer;

2) PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix and the manually designed primer pairs: (GAPDH Forward: 5' TTCTTTTGCCTGCCAGCCGA 3', Reverse 5' GTGACCAGGCGCCCAATACGA 3', ACTB Forward: 5' TGGCACCCAGCACAATGAA 3', Reverse 5' CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA 3', HPRT1 Forward: 5' TGACACTGGCAAAACAATGCA 3', Reverse: 5' GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT 3' BRG1 Forward: 5' AAGAAGACTGAGCCCCGACATTC 3', Reverse 5' CCGTTACTGCTAAGGCCTATGC 3', ABCC3 Forward: 5' TCCTTTGCCAACTTTCTCTGCAACTAT 3', Reverse: 5' CTGGATCATTGTCTGTGACATCCGT 3', ABCC5 Forward: 5' AGAGGTGACCTTTGAGAACGCA 3', Reverse: 5' CTCCAGATAACTCCACCAGACGG 3', ABCC10 Forward: 5' CGGGTTAAGCTTGTGACAGAGC 3', Reverse: 5' AACACCTTGGTGGCAGTGAGCT 3') according to the protocol provided by the manufacturer.

mRNA level of particular genes was first normalized to housekeeping genes. The ratio between the studied and housekeeping genes was assumed to be 1 for control cells.

2.6 Sanger Sequencing

Total RNA was extracted from cells using TRI Reagent™. Afterwards, mRNA was reverse transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. The fragment of BRG1 exon 15 was amplified in gradient thermocycler LifeECO (BIOER) using KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2x) and the manually designed primer pair (Forward: 5' CCGGGGTATGAAGTAGCTCC 3', Reverse 5' GTCCACCTCAGAGACGTCAT 3'). Subsequently, cDNA sequencing was performed using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit according to the previously described procedure [27]. Sequences were analyzed using FinchTV and MEGA11 software.

2.7 RNA sequencing and analysis

Total RNA was isolated using TRI Reagent™. Next, 10 ng of DNA-free total RNA was used to isolate mRNA using NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module. The purified mRNA was used for RNAseq library preparation using NEBNext® Ultra™ II RNA Library Prep Kit for Illumina® (#E7770). Sample indexing was prepared using NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 3) (#E7710). All of the steps were prepared according to the protocols provided by New England Biolabs. Sequencing was performed using the Illumina

1 NextSeq 550 System. Bioinformatical analysis of the obtained data was conducted using
2 UseGalaxy.org (Galaxy version 24.0.rc1), an open platform as previously described [28,29].
3 Venn diagram was created in <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/> from gene
4 lists. Annotation of downregulated genes to gene ontology was carried out in PANTHER
5 version 17.0.
6
7

8 **2.8 Chromatin immunoprecipitation, library preparation and sequencing**

9

10 Chromatin immunoprecipitation was carried out according to the protocol previously described
11 [27]. DNA was extracted using phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1). BRG1 was
12 immunoprecipitated with anti-BRG1 (D1Q7F) Rabbit mAb (#49360) and EP300 with p300
13 (D2X6N) Rabbit mAb in non-resistant and paclitaxel-resistant MDA-MB-231 cells, whereas
14 H3K4me3 with Tri-Methyl-Histone H3 (Lys4) (C42D8) Rabbit mAb in paclitaxel-resistant MDA-
15 MB-231 cells only. Data for tri-methylation of H3 in MDA-MB-231 were taken from Short Reads
16 Achieve (SRA, NCBI) and the following datasets were taken for analysis: SRR4346773 and
17 SRR4346774 (GSM2337951) [30].
18
19
20
21
22
23
24

25 BRG1 binding motifs at the selected gene promoters were amplified using KAPA SYBR®
26 FAST Universal Master Mix, 0.1% DMSO and the following primer pairs: *ABCB1* Forward 5'
27 CCAATCAGCCTCACACAGA 3', Reverse 5' GATTCAGCTGATGCGCGTTT 3'; *ABCC5*
28 Forward: 5' CTTCCGGGTTCAAGCAGTTC 3', Reverse: 5' AAAATACGGCGGGGTGAGG 3',
29 *ABCC10* Forward: 5' TACCCTTGGTACCGCGAGA 3', Reverse: 5'
30 GTAACAGGCACTGAGCACGG 3'. As a control manually designed fragments of promoters
31 do not containing BRG1 binding motifs was used: *ABCC2* Forward 5'
32 AGGTCAAGGCTGCAATGAAT 3', Reverse: 5' CTGTCATCGACCCAACCTTT 3'. Data were
33 normalized to samples containing non-specific IgG.
34
35
36
37
38
39
40

41 1µg of immunoprecipitated DNA fragments was converted into library for sequencing using
42 NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit with Sample Purification Beads for Illumina® and
43 NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 3) for BRG1 and MGIEasy PCR-
44 Free DNA Library Prep Set for EP300 and H3K4me3 according to instruction provided by
45 manufacturers. DNA library was sequenced on NextSeq 550 or DNBSEQ-G400 in the
46 Department of Clinical Genetics, Medical University of Lodz, and data were released as fastq
47 files.
48
49
50
51
52

53 **2.9 Bioinformatic analysis of ChIP-Seq data**

54

55 Adapters were trimmed during FASTQ generation as an option of Illumina pipeline in
56 BaseSpace. All other analyses were performed in Galaxy.org (Galaxy version 24.0.rc1) [29].
57 The read quality was checked with FastQC and reads with Qphred <30 were removed with
58 Trimmomatic (AVGQUAL:30). Reads were mapped with BWA against human genome (hg19).
59
60
61
62
63
64
65

1 Mapped reads were normalized to counts per million (-bamCoverage). Peaks were called with
2 MACS2 at $p < 0.001$. BRG1 and EP300 distribution at H3K4me3 positive TSS (bedtools
3 Intersect intervals; entry: H3K4me3 peaks and TSS 1 bp; required overlap: 1 bp) were
4 generated by -computeMatrix (Score files: -bigwigfiles; output options: reference point, center
5 of regions, --sortUsing mean, --averageTypeBins mean, --missingDataAsZero, --skipZeros),
6 then plotHeatmap with hierarchical clustering. The same method was used for analyzing
7 distribution of EP300 at the BRG1 peak summits. Spearman correlation plot was called –
8 multiBamSummary (by default) and –plotCorrelation (--removeOutliers).
9

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
Blacklist regions for hg19 were downloaded from ENCODE (ENCSR636HFF) [31].

2.10 Western Blot

For protein expression evaluation cells were lysed in RIPA buffer (supplemented with 1 mM PMSF and PIC) and sonicated (Bandelin Sonopuls HD2070); Next, proteins were separated by SDS–PAGE, transferred into a nitrocellulose membrane, and stained with primary antibodies (1:5000) at 4°C overnight. After subsequent staining with HRP-conjugated secondary antibodies (1:5000 for antirabbit and 1:2500 for anti-mouse antibodies; room temperature; 2 h), the signal was developed with the SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate and pictures were acquired using ChemiDoc-IT2 (UVP, Meranco, Poznan, Poland). H3 was used as the control.

2.11 Confocal Microscopy

For the confocal imaging of proteins, cells were seeded on a Nunc™ Lab-Tek™ chamber slide. 2 h before cells fixation LysoTracker™ Deep Red was added to the final volume of 75 nM, and cells were incubated 1 h at 37°C. Cells were fixed with a 1% formaldehyde solution in PBS at room temperature for 15 min, permeabilized and blocked with 1% FBS solution in PBS with 0.1% TritonX-100 at room temperature for 1h. Primary antibodies (1:400) were added in 1% BSA solution in PBS with 0.1% TritonX-100 and incubated at 4 °C overnight. Next, a secondary antibody (1:400) was added in 1% BSA solution in PBS with 0.1% TritonX-100 at room temperature for 2h. After washing, the slides were mounted with SlowFade™ glass soft-set antifade mountant (with DAPI). TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) with a 63x/1.40 objective (HC PL APO CS2, Leica Microsystems, Germany) was used for sample visualization. The samples were imaged with the following wavelength values for excitation and emission: 485 and 500-550 nm for Alexa Fluor® 488, 550 and 570-580 nm for Alexa Fluor® 546, 480 and 570-580 nm for R-phycoerythrin (PE), 660-670 for LysoTracker Deep Red and 405 and 430-480 nm for DAPI. The fluorescence intensity and colocalization was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems, Germany).

1 The scans of cells were deconvolved using 3D-Deconvolution accessible in Leica Application
2 Suite X software (LAS X, Leica Microsystems, Germany).

3
4 For the visualization of drug accumulation:

5
6 1. cells seeded on Nunc™Lab-Tek™chamber slides were treated with anticancer drugs
7 and inhibitors. Next, LysoTracker™ Deep Red (75 nM for 2h), was added to the culture media.
8 After incubation and cell washing with PBS, cells were mounted with SlowFade™ glass soft-
9 set antifade mountant (with DAPI);
10

11
12 2. 3-week old 3D cell cultures were stained with LysoTracker™ Deep Red (75 nM) for 2 h.
13 Next, spheroids was fixed with a 4% formaldehyde solution in PBS, at room temperature for
14 30 min. After fixation the spheroids were washed with PBS and incubated with 1 µg/ml DAPI
15 for 30 min, at room temperature. Spheroids were analysed immediately.
16
17

18
19 TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) with a 63x/1.40 and 10x 0.40 DRY objectives (HC
20 PL APO CS2, Leica Microsystems, Germany) was used for sample visualization. The samples
21 were imaged with the following wavelength values for excitation and emission: 485 and 500-
22 550 nm for Alexa Fluor® 488 conjugated Paclitaxel, 470 and 580-600 for Doxorubicin and 405
23 and 430-480 nm for DAPI. The fluorescence intensity was determined in arbitrary units (a.u.)
24 with Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems, Germany).
25
26
27
28
29

30 31 **2.12 Resazurin Toxicity Assay**

32
33 The day prior to transfection/treatment, cells were seeded at a density of 2,500 cells per well
34 on Nunc® MicroWell™ 384-well optical bottom plates or 5,000 cells per well on 96-well plates.
35 After transfection/incubation with drugs and inhibitors, cells were incubated with resazurin
36 solution (5 µM) in the growth medium at 37 °C for 3h. The fluorescence that corresponds to
37 the metabolic activity of living cells was measured with a fluorescence microplate reader
38 (BioTek Synergy HTX, Biokom, Poland) at excitation 530 and emission 590 nm. The
39 fluorescence value for control cells was assumed to be 100%.
40
41
42
43
44

45 46 **2.13 Annexin V and propidium iodide staining**

47
48 For the visualization of apoptosis/necrosis induction by the combination of drugs and inhibitors,
49 Nunc™Lab-Tek™chamber slides were coated with faCellitate BIOFLOAT FLEX coating
50 solution according to the manufacturer protocol. Cells seeded on coated chamber slides were
51 harvested for a 3-weeks to obtain spheroids formation. Next, cells were treated with anticancer
52 drugs and inhibitor. After washing with PBS, according to the manufacturer protocol Annexin
53 V-FITC and Propidium iodide were added to the cells in binding buffer and incubated for 30
54 min at room temperature. After incubation, spheroids were washed with PBS and incubated
55 with 1µg/ml DAPI for 30 min at room temperature. Spheroids were stored in PBS.
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Subsequently, for the imaging of the samples, the confocal laser scanning microscopy platform
2 TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) with a 10x objective (HC PL APO CS2, Leica
3 Microsystems, Germany) was used. The samples were imaged with the following wavelength
4 values for excitation and emission 485 and 500-550 nm for AnnexinV-FITC, 450 and 610-620
5 for Propidium iodide and 405 and 430-480 nm for DAPI, using Leica Application Suite X (LAS
6 X, Leica Microsystems). The level of baseline fluorescence was established individually for
7 each experiment. Fluorescence intensity was determined as the arbitrary units (a.u.) with Leica
8 Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems, Germany).
9

10 11 12 13 **2.14 Clinical data analysis**

14 The correlations between SMARCA4 and some ABC gene expression in TCGA Pan-Cancer
15 (PANCAN) dataset of 12 839 samples was explored in UCSC Xena Functional Genomics
16 Explorer. Samples with nulls were removed and data for SMARCA4 expression, which
17 comprised $\log_2(\text{norm_value}+1)$ between 9.6 and 14, were sub-grouped into SMARCA4 low
18 ($\log_2(\text{norm_value}+1) < 10.7$) and SMARCA4 medium and high ($\log_2(\text{norm_value}+1) > 10.7$).
19 The threshold was set to include most of deleterious somatic mutation (SNP and INDEL; MC3
20 public version) in SMARCA4 low subgroup.
21
22
23
24
25
26
27

28 **2.15 Statistical Analysis**

29 Data are shown as mean \pm standard deviation (SD). Parametric or non-parametric test was
30 conducted after testing Gaussian distribution of data with the Shapiro–Wilk test. Student's t
31 test or the Mann–Whitney test was used to calculate statistically significant differences
32 between two samples, while one-way analysis of variance (ANOVA) or Kruskal-Wallis test
33 followed by corresponding post hoc test was carried out to compare multiple samples.
34 Statistics were calculated using GraphPad Prism 8.01 software. Statistically significant
35 differences were marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$.
36
37
38
39
40
41
42

43 **3. Results**

44 **3.1 BRG1 is enriched at the promoters of genes functionally linked to endo-lysosomal 45 system and some ABC transporters**

46 Bearing in mind the documented involvement of BRG1 in the transcription of some ABC
47 proteins in 3 triple-negative breast cancer cell lines and ADAADiN prevention of single dose,
48 drug-induced ABC overexpression [24], use was made of the TCGA Pan-Cancer (PANCAN)
49 dataset of RNA and was compared to the mRNA level of SMARCA4 with several ABC genes
50 associated with drug resistance (Fig. 1A). We divided data according to SMARCA4 expression
51 into 2 subgroups, which corresponded to low and moderate/high expression. As expected, the
52 low mRNA level of SMARCA4 was associated with deleterious mutations in some cancer
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 samples. Additionally, it also correlated with low mRNA levels of *ABCC1*, *ABCC5* and
2 *ABCC10*, but inversely with *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCC3* and *ABCG2*. This suggests that BRG1
3 contributes to the transcriptional regulation of some ABC genes in various cancers.
4

5 To confirm the role of BRG1 in the transcription control of the ABC gene subset, the impact of
6 BRG1 transient silencing on the mRNA level in 3 cell lines was tested, this differed in the status
7 of *SMARCA4* (Fig.1B). According to the TCGA database of cancer cell lines, MDA-MB-231
8 cells carry the wild-type and hence, the fully functional *SMARCA4* transcript. In contrast, the
9 A549 cell line harbors homozygous truncating nonsense mutations leading to BRG1 protein
10 loss [32]. The breast cancer MCF7 line is characterized by the fusion of the *SMARCA4* gene
11 with *CARM1*, making this transcript non-functional [33]. siBRG1 significantly decreased the
12 expression of *ABCC3* in cells with the wild-type *SMARCA4* but did not cause any substantial
13 difference in cells with *SMARCA4* mutations.
14
15
16
17
18
19
20

21 In search for the molecular and functional link between BRG1 and the ABC gene transcription
22 in MDA-MB-231, BRG1 ChIP-Seq was performed (Fig. 1C). The MACS2 peak calling revealed
23 BRG1 enrichment at the promoter of *ABCC3* and *ABCC5*, but not *ABCC2*, which remained
24 unchanged in the cells transiently transfected with siBRG1. The occurrence of BRG1 at the
25 promoter of *ABCC5* did not render gene transcription dependency on BRG1-SWI/SNF activity
26 as shown in Fig. 1B. BRG1 was found at the promoters of genes annotated to key cellular
27 processes such as replication, transcription, mitotic division, DNA repair, signal transduction,
28 regulation of apoptosis, histone modifications and many others (Fig. 1D) but also for intra-Golgi
29 vesicle mediated transport and protein targeting to lysosomes, which could impact ABC
30 distribution and partitioning within the endolysosomal system and plasma membrane.
31
32
33
34
35
36
37
38

39 **3.2 BRG1 defines the profile of ABC gene expression in paclitaxel-resistant A549 and** 40 **MDA-MB-231 cell lines** 41

42 To identify the ABC genes that can be *bona fide* players in the multidrug resistance of
43 paclitaxel-resistant phenotypes, gene transcription was measured in non-resistant and drug-
44 resistant phenotypes by RNA-Seq, initially assuming A549-PTX as BRG1 deficient and as a
45 control for BRG1-independent gene transcription. For this purpose, normalized (FPKM) counts
46 were juxtaposed for particular mRNAs. To have considerable gene numbers and BRG1-
47 enriched sequences, the list of ABC genes taken into account was extended, all of which have
48 been linked to drug resistance in the literature. As shown in Fig. 1E, both cell lines were
49 characterized by relatively high abundance of *ABCA2*, *ABCA7*, *ABCB6*, *ABCB9*, *ABCC3*
50 mRNA, which responded to cell treatment with paclitaxel with their levels remaining unchanged
51 even when comparing with non- versus paclitaxel-resistant cell lines.
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

In search for the possible BRG1 contribution to the transcription of ABC genes in paclitaxel-resistant cells, MDA-MB-231 with the wild-type *SMARCA4* and A549 with *SMARCA4* deleterious mutation were used. The induction of cell resistance to paclitaxel and the characteristics of the acquired phenotype was described in Strachowska *et al* [21] and Gronkowska *et al* [14]. Adaptation of the MDA-MB-231 to paclitaxel did not change the expression of BRG1 (Figure S1A-B). Surprisingly, BRG1 mRNA and protein in paclitaxel-resistant A549 cells was found (Figure S1C-D). Sanger sequencing of the *SMARCA4* fragment that spans the c.2184_2206del23 deletion, causing a change in the reading frame, the premature appearance of the STOP codon and lack of protein, indicated the additional deletion of 7 nucleotides and the insertion of 2 nucleotides in the *SMARCA4* sequence before the deletion site (Fig. S1F). The changes of the nucleotide sequence induced by paclitaxel led to reversal mutation that restored the BRG1 expression in paclitaxel-resistant A549 cells. Since the considered mutation did not occur in any of the BRG1 functional domains, the shortened protein bound to chromatin as confirmed by ChIP-qPCR (Fig. S1E). The enzyme was considerably enriched at the promoters of *ABCB1*, *ABCC3* and *ABCC10* in the drug-resistant phenotype of A549 cell line.

To select genes controlled by BRG1, the transcriptomes of BRG1 proficient (siCTRL) and deficient (siBRG1) paclitaxel-resistant phenotypes by RNA-Seq were compared. Differential gene expression showed that ATP-ase regulated the expression of 7,945 genes in A549-PTX, 19,858 genes in MDA-MB-231-PTX, and shared 4,109 genes of BRG1-dependent genes (Fig. 1F). The annotated ontology of the BRG1-controlled genes, common for both resistant cell lines, also indicated a significant portion of genes that encoded proteins involved in active transmembrane transport (Fig. 1G). This group included several ABC family transporters with known roles in resistance to chemotherapeutics such as doxorubicin, paclitaxel, cisplatin, etoposide and methotrexate (Fig. 1H). The number of ABC genes that were highly transcribed in MDA-MB-231-PTX declined in response to BRG1 silencing, whereas the opposite effect was observed for weakly expressed genes. The impact of ATP-ase on ABC expression in A549-PTX was more diverse, but the deficiency of BRG1 was followed by declining transcription of *ABCB1*, *ABCC5*, *ABCC1* and *ABCC10* which are important for drug efflux or sequestration in intracellular organelles. Significantly, BRG1 emerged as transcription co-activator of the 3 genes involved in lysosomal drug trapping, *ABCC3*, *ABCC5* and *ABCC10*, in both paclitaxel-resistant cell lines. This was further confirmed by real-time PCR and western blot (Fig. 1I-J). In addition, the transcription of *ABCB1* that contributed to lysosomal drug sequestration and increased in response to paclitaxel was also controlled by BRG1 in A549-PTX. Interestingly, silencing of BRM does not reduce the expression of ABC5 and ABCC10

transporters (Fig. S1G). This is all evidence that BRG1 may be crucial for the expression of the ABC genes which protect cells against some anticancer drugs.

3.3 BRG1 redistribution in the genome and *de novo* recruitment to gene promoters in the paclitaxel-resistant cell links this enzyme with endolysosomal organization and transport

Cellular adaptation to paclitaxel was followed by BRG1 redistribution in the genome (Fig. 2A-C). Analysis of ChIP-Seq data from non-resistant and resistant MDA-MB-231 cells indicated the recruitment of BRG1 to chromatin since the number of MACS2 computed peaks increased from 15202 to 47231 respectively, with a minimum FDR cutoff for peak detection < 0.001 (Sup. Table 2). However, the proportion of BRG1 enriched gene promoters declined from ~21% to ~11%, whereas its binding to enhancers listed in the Vista database increased to ~0.7%. The observed changes in gene regulatory regions were associated with the shift of 7% ATPase peaks from intergenic to intragenic genome fragments (Fig. 2A and 2B). Gene promoters of paclitaxel-resistant MDA-MB-231 cells were characterized by the altered profile of BRG1 distribution (Fig. 2C and 2D). The considerable extrusion of the enzyme from TSS was followed by peak enrichment in regions between 5 – 20 kbp from the nearest TSS. It may suggest BRG1 enhanced interaction with distal regulatory elements, whereas the depression in BRG1 occurrence at TSS may be linked to the formation of a transcription initiation complex as a consequence of paclitaxel-triggered transcription activation of numerous genes.

BRG1 co-occurred with EP300 at the promoters of some transcriptionally active genes, as described in previous papers [22,23] (Fig. 2D-4E). These were assigned as genomic fragments spanning TSS \pm 2 kbp and were hallmarked by the trimethylation of H3K4. Interestingly, the promoter of ABCC5, which is transcriptionally controlled by BRG1 only in the drug-resistant phenotype, was similarly enriched in BRG1 and EP300 and characterized by a similar profile of H3K4 trimethylation in both cell conditions (Fig. 2D). This suggests that transcription dependence on BRG1 may be determined by another, still unknown factor. As mentioned previously, this can be linked to the reorganization of proximal promoters during gene activation and loading of transcription initiation factors. The Spearman correlation coefficient for BRG1 co-distribution with H3K4me3 declined from 0.7 to 0.61 during the acquisition of drug resistance, suggesting chromatin extrusion or translocation to more distal genomic regions as shown in Fig. 2C. However, the co-occurrence with EP300 increased from 0.59 to 0.64, possibly to facilitate EP300-driven gene transcription (Fig. 2F).

Although the relative BRG1 occurrence declined at the gene promoters that were normalized to total peak number, the number of BRG1-enriched promoters was higher in the paclitaxel-resistant phenotype (Fig. 2G). Annotation of ontology to the genes controlled by promoters

1 (that were characterized by de novo BRG1 enrichment after numerous cell exposures to
2 paclitaxel), disclosed processes that were involved in cell response to genotoxic stress,
3 endosome to lysosome transport, lysosome organization and ER to Golgi vesicle-mediated
4 transport (Fig. 2H-2I). The latter processes can contribute to the observed trafficking of
5 ABCC3, ABCC5 and ABCC10 to lysosomes in paclitaxel-resistant phenotypes. Differential
6 expression of genes transcribed in BRG1 proficient and deficient paclitaxel-resistant MDA-MB-
7 231 cells confirmed the role of ATP-ase in the transcription enhancement of numerous genes
8 assigned to endolysosomal GO terms (Fig. 2I).

13 **3.4 BRG1 guides drug distribution to lysosomes and declines paclitaxel-resistant cell** 14 **sensitivity to drugs**

17 Bearing in mind that BRG1 controls the transcription of ABC genes which were found to be
18 substantially enriched in the lysosomes of paclitaxel-resistant cells, BRG1 deficiency in the
19 decline of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 abundance in these organelles was tested by using
20 the immune staining of ABCs and their confocal imaging against lysosomes and DNA in cells
21 with normal (siCTRL) and knockdown BRG1 (siBRG1). The silencing of BRG1 caused visible
22 and significant reduction of ABCC3 and ABCC10 levels inside cells (Fig. 3A, 3B), and reduced
23 their lysosomal localization, quantified by measuring protein colocalization with lysosomes
24 (Fig. 3C). No changes in the expression or intracellular localization of these proteins were
25 observed after BRM silencing (Fig S2A). It was significant that the BRG1 level had no impact
26 on lysosome content in the paclitaxel-resistant cells (Fig. S2B). Confocal microscopy with a
27 deconvolution algorithm allowed the visualization of the decline in ABCC5 level in the lysosome
28 membrane that was caused by BRG1 silencing in both paclitaxel-resistant cell lines (Fig. 3D).

31 To check the functional impact of BRG1-dependent expression of the ABC transporters which
32 are enriched in lysosomes of paclitaxel-resistant cells on intracellular drug distribution, we
33 compared the colocalization of doxorubicin and paclitaxel OregonGreen with lysosomes in
34 BRG1 proficient and deficient cells using confocal microscopy (Fig. 3E, Fig. S2C). Silencing of
35 the enzyme visibly declined the drug accumulation in lysosomes, quantified as colocalization
36 of drug and lysosome fluorescence (Fig. 3F, Fig. S2D). Previously documented roles of
37 ABCC3, ABCC5 and ABCC10 in lysosome drug accumulation [14] led to the conclusion that
38 the BRG1-dependent transcription of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 was responsible for the
39 distribution of their substrates into lysosomes in both paclitaxel resistant breast and lung
40 cancer cells. This also led to the hypothesis that BRG1 may affect the cell response to
41 chemotherapeutics and cause lysosome associated chemoresistance. This was tested by
42 comparing the viability of cells which differed in BRG1 abundance and were exposed to
43 chemotherapeutics of various acidity. This feature of the tested drugs defined the mode of their

1 passive or ABC-dependent influx to lysosomes. The silencing of BRG1 sensitized cells of both
2 lines to all chemotherapeutics tested (Fig. 3G), increased considerably with these acidic drugs
3 that do not enter lysosomes by passive diffusion.
4

5 The impact of BRG1 on drug penetration was also tested in cell spheroids. 3D cultures of MDA-
6 PTX and A549-PTX cells were characterized by the accumulation of doxorubicin and paclitaxel
7 OregonGreen in the peripheral layer, whereas BRG1 silencing resulted in drugs reaching the
8 inner spheroid layers (Fig. 3H, S2E). This suggests that BRG1-dependent drug trapping in
9 lysosomes protects the deeper parts of the spheroids from drug cytotoxicity. This conclusion
10 is supported by a previous finding, where lysosome neutralization or inhibition of ABCC
11 reduced spheroid penetration by doxorubicin and paclitaxel OregonGreen as well as
12 increasing the overall number of apoptotic cells inside these spheroids [14].
13
14
15
16
17
18
19

20 **3.5 SWI/SNF targeting with PFI3 and ACBI1 decreases lysosome-associated ABCC in** 21 **PTX-resistant cancer cell lines** 22

23
24 Since BRG1 is responsible for the overexpression of lysosomal pool of ABC transporters and
25 increased chemoresistance of paclitaxel-resistant cells, the BRG1/BRM inhibitor - PFI3 and
26 SMARCA2/4 PROTAC degrader - ACBI1 were tested for their likely potential to sensitize
27 paclitaxel-resistant cell to chemotherapy. The ability of ACBI1 to induce degradation of BRG1
28 was confirmed by Western Blot (Fig S3A). SWI/SNF inhibitor was found potent to decline both
29 the mRNA and protein level of the three considered multidrug resistance (MDR) transporters
30 (Fig. 4A-D). However, BRG1/BRM degradation with ACBI1 reduced expression of ABCC3 and
31 ABCC5 (Fig. 4H-K), but increased ABCC10. The reduced co-occurrence of ABCC10 and
32 ABCC3 with lysosomal marker (Fig 4 E-G, 4L-N, Fig. S4 A-B Fig. S4 D-E) after PFI3 and ABI1,
33 as well as ABCC5 with LAMP1 (Fig 4O) after PFI3 was visualized and quantified by confocal
34 microscopy in paclitaxel-resistant lines (Fig. 4E-F).
35
36
37
38
39
40
41
42

43 In non-resistant MDA-MB-231 and A549 only highly expressed ABCC3 was declined after cell
44 treatment with PFI3 and ABI1, respectively (Fig. S3 B-E).
45
46

47 PFI3 and ABCI1 altered the intracellular distribution of doxorubicin and paclitaxel
48 OregonGreen by retaining a substantial drug concentration outside lysosomes. This was
49 confirmed by measuring the drug accumulation and drug-lysosome colocalization (Fig. 5A-F,
50 S5A-C). The SWI/SNF targeting molecules also slightly elevated the total drug accumulation
51 inside paclitaxel-resistant cells. Particularly, PFI3 phenocopied the effect of BRG1 silencing on
52 lysosomal delocalization of paclitaxel OregonGreen and doxorubicin (Fig. 3E-F Fig. S2B-C).
53 PFI3 and ABI1 allowed also deeper drug penetration in spheroids, whereas intact 3D cultures
54 were characterized by drug accumulation inside outer cell layers (Fig 5G).
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

3.6 PFI3 and ACBI1 augments the toxicity of anticancer drugs in PTX-resistant cancer cell lines

The observed increase in the drug concentration inside cells and the impairment of drug sequestration in lysosomes could be responsible for the altered cytotoxicity of anticancer drugs in SWI/SNF-treated cancer cells in 3D (Fig.6A) and 2D cultures (Fig 6D). In spheroids, the combination of doxorubicin or paclitaxel with PFI3 and ABCI1 was more potent in apoptosis induction than drugs alone as shown in the confocal images and quantification of Annexin V green fluorescence (Fig. 6A-C). Importantly, Annexin V-positive cells were equally distributed across all depths of the spheroids that were exposed to the combination of PFI3 or ABI1 and drugs, whereas apoptotic cells were localized in the peripheral layers similarly to drugs in cells proficient in SWI/SNF activity. The significant induction of cell necrosis was only observed in spheroids exposed to doxorubicin, and further intensification of necrotic cell death as well as apoptotic commitment was caused by ABI1. On the contrary, PFI3 substantially enhanced apoptosis in spheroids as well as in 2D culture treated with paclitaxel (Fig. 6D). PROTAC degrader sensitized 2D model of paclitaxel-resistant cancer cells especially to doxorubicin but also to lower doses of cisplatin and etoposide when added 48 h prior to chemotherapeutics (Fig.6E). SWI/SNF inhibitor moderately increased drug toxicity in the culture of adherent cells (Fig.6F).

All these results indicate that SWI/SNF targeting is effective for sensitizing paclitaxel-resistant cancer cells to chemotherapeutic agents for the 2 studied cells lines. This may be attributed to the reduced expression of ABC transporters and prevention of the lysosomal trapping of the drugs. From clinical perspective the combination of ABI1 with doxorubicin seems worth of further investigation for the treatment of paclitaxel-resistant triple-negative breast cancers.

4. Discussion

The expression profile of resistance proteins, which are responsible for the failure of chemotherapy in cancer treatment, can change with disease progression [34]. The epithelial-mesenchymal transition associated with tumor progression has been shown to increase the expression of ABC transporters [35]. Due to the important role of ABC transporters in the occurrence of this phenomenon, they are a target for the development of combined therapies aimed at sensitizing cancer cells to standard chemotherapeutics. Overcoming multidrug resistance, which is associated with the expression of ABC transporter family proteins, is a challenge and none of the 3 generations of ABC inhibitors, (particularly in the case of ABCB1), have provided satisfying results in clinical trials and all have failed to become FDA approved drugs. Our current study indicates that inhibition of SWI/SNF with PFI3 or degradation of SWI/SNF ATPases with PROTAC allows to substantially increase drug toxicity due to

1 simultaneous reduction of several ABC transporters in paclitaxel-resistant phenotypes of the
2 chosen lung and breast cancers. SWI/SNF targeting increased overall drug accumulation may
3 be due to reduced drug uptake by lysosomes associated with a decrease in lysosomal ABC
4 transporters and thus reduced exocytosis of chemotherapeutic drug-loaded lysosomes [36].
5 Another explanation is the inhibition of the expression or activity of drug transporters located
6 in the plasma membrane of paclitaxel-resistant phenotypes, such as *ABCC1* in A549-PTX.
7 Since these compounds target both ATPases, some genes related to drug transport may be
8 upregulated by BRM and thus downregulated in response to SWI/SNF targeting. These finding
9 are particularly important in light of studies, which document the scarce sensitizing impact of
10 single inhibition of ABCB1, ABCG2 or some of the ABCC subfamily to chemotherapeutics and
11 poor drug accumulation inside drug-resistant cells [21].
12
13
14
15
16
17
18

19 The identification of an upstream mechanism responsible for transcription of several ABC
20 genes under chemotoxic stress could provide new targets to limit the drug efflux from resistant
21 cancer cells and, hence, a new approach for combined and improved chemotherapy.
22 Experimental evidence is provided here that considers the role of BRG1 in transcriptional
23 control of ABC genes that are overexpressed in paclitaxel-resistant cell lines. Specifically, the
24 focus was on the impact of BRG1 on *ABCC3*, *ABCC5* and *ABCC10*, which are enriched to
25 lysosomes in paclitaxel-resistant cells, and the last 2 genes that are overexpressed once the
26 cell is exposed to several doses of paclitaxel. The functional analysis of these 3 proteins that
27 occur in lysosomes, disclosed their role in the sequestration of doxorubicin and paclitaxel
28 OregonGreen, hence these membrane transporters are capable of limiting drug cytotoxicity.
29 The active promoters of these genes are characterized by H3K4 trimethylation and occurrence
30 of BRG1 and EP300. Such a complex previously described by us and others is capable of
31 chromatin decondensation and defines transcription permissive environment because of
32 extrusion of acetylated nucleosomes [22]. The functional interaction between BRG1 and
33 EP300 can be also confirmed by the fact that EP300 bromodomain inhibitor I-CBP112
34 substantially decline transcription of ABC genes in drug-resistant cell lines. Furthermore,
35 development of resistance to paclitaxel increased the number of BRG1-bound promoters of
36 genes linked to endolysosomal and ER-Golgi protein transport, which may also define the
37 profile of ABC proteins in lysosomes and their enrichment in these organelles. Although BRG1
38 was *de novo* recruited to the promoter of *TFEB* gene, which encodes the master regulator of
39 lysosome biogenesis during MDA-MB-231 cell adaptation to paclitaxel and the BRG1 silencing
40 in resistant cells that caused substantial decline in *TFEB* gene transcription, the number of
41 lysosomes estimated in confocal images remained unchanged [37]. This can be explained by
42 the fact that regulation of *TFEB* occurs predominantly by post-translational modifications such
43 as phosphorylation, acetylation, SUMOylating, PARylation, and glycosylation, which allowed
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 the cell to respond quickly to nutrient fluctuations but also to stress [38]. And the adaptation-
2 induced increase in TFEB abundance may not determine further enhance in lysosome
3 biogenesis. Moreover, other BRG1-dependent genes that regulate endolysosomal pathways
4 need to be taken into consideration while explaining this drug trapping in lysosomes. In
5 particular, the mechanism that drives ABCC5 and ABCC10 trafficking to lysosomes and
6 ABCC3 redistribution to these organelles in paclitaxel-resistant cells remains unknown. This
7 was discussed in a previous paper [14], where the topological inversion of the plasma
8 membrane ABCB1 via endocytosis resulting in the transporter actively pumping agents into
9 lysosomes was proposed. This may also be true for ABCC3, but neither ABCC5 nor ABCC10
10 was detected in the plasma membrane of the non-resistant or paclitaxel-resistant cells. Hence,
11 the protein sorting from Golgi to the endolysosomal system could be taken into consideration.
12 Although N-acetylglucosamine-1-phosphodiester α -N-acetyl-glucosaminidase declined in
13 response to BRG1 silencing, the other 2 crucial elements of the mannose-6-phosphate (M6P)
14 pathway that is responsible for the transport of hydrolytic enzymes to lysosomes: the Mannose-
15 6 phosphate receptor and GlcNAc-1-phosphotransferase (GNPTAB and GNPTG), were
16 differently regulated by BRG1 in paclitaxel-resistant cell lines. Furthermore, all 3 GGAs (Golgi-
17 localized, γ -ear-containing, Arf (ADP-ribosylation factor)-binding proteins), which are a family
18 of ubiquitously expressed, Arf-dependent, clathrin adaptors responsible for the sorting of
19 mannose-6-phosphate receptors (MPRs) between the trans-Golgi network (TGN) and
20 endosomes, declined considerably in BRG1-deficient cells. The mechanism of lysosome
21 enrichment in ABCC3, ABCC5 and ABCC10 remains unsolved and needs further experimental
22 verification.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

37 In line with our study, some attempts have already been made to use BRG1-targeted therapies
38 to sensitize cancer cells to chemotherapy. PFI-3 exerted a DNA damage-sensitizing effect by
39 directly blocking SWI/SNF's chromatin binding, leading to defects in DSB repair and
40 aberrations in the damage checkpoints in A549 and HT29 cells. This resulted in the increase
41 of cell death primarily via necrosis and senescence after doxorubicin treatment [39].
42 Furthermore, PFI-3 and Structurally Related Analogs of PFI-3 (SRAPs) sensitized LN229
43 glioblastoma cells and patient- derived glioblastoma cells: GBM6, GBMX10, and GBMX16, to
44 chemotherapeutic drugs such as temozolomide and carmustine *via* changes in the expression
45 of genes implicated in the glucose metabolism [40,41]. It was also showed that the reduction
46 of BRG1 activity by using ADAADi (Active DNA-dependent ATPase A Domain inhibitor)
47 increased the chemosensitivity of MDA-MB-231 cells to 5-fluorouracil, cisplatin,
48 cyclophosphamide, doxorubicin, gemtacin and paclitaxel by reducing the expression of
49 ABC transporters and preventing their overexpression induced by a single dose of anticancer
50 drugs [24]. Not much is known about the pharmacokinetics of PFI-3 and ADAADi *in vivo*, so
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

their possible application in anticancer therapies will require further investigation. Importantly, these 2 compounds are not selective for BRG1, hence their use should be considered in a context-specific manner. PFI-3 targets the bromodomains of BRG1 and BRM, whereas ADAADi interacts with ATP-dependent chromatin remodeling proteins through a motif that is present in the conserved helicase domain. However variable responses were observed in different cell lines [42]. BRG1-specific effects of PFI-3 on lysosomal drug sequestration and ABCC enrichment in these organelles in paclitaxel-resistant cells was confirmed by BRG1 silencing, as well as by very low or no-impact of these compounds on the studied parameters in non-resistant cells. Hence, PFI-3 and other possible BRG1/BRM inhibitors emerged as candidates for anticancer approaches combined with chemotherapy drugs in the subset of BRG1-proficient cancers that developed multidrug resistance by BRG1-dependent drug trapping in lysosomes. Even less is known about pharmacokinetics and possible side effects of SMARCA2, SMARCA4 and PBRM1 degrader – ACBI1, which emerged here as potent interrupter of multidrug resistance in the studied cell lines. Former papers described anti-proliferative and pro-apoptotic activity of this compound in the culture of SK-MEL-5 melanoma cells [43]. In light of our findings this compound can be considered for an anticancer treatment modality that combines two or more therapeutic agents. Lysosome targeted drug combinations have been tested recently *in vitro* due to the role that these organelles have shown in passive and active trapping of chemotherapeutics [44]. Numerous chemical agents and natural compounds increase lysosomal enzyme activity (including cathepsins) and lysosomal membrane permeability (LMP) thereby leading to lysosome damage, release of lysosomal proteases and the so-called “lysosomal pathway of apoptosis” [45,46].

The importance of *SMARCA4* loss or overexpression during cancer initiation and progression has been debated, and the meaning for both modalities can be found in the literature [25,47]. The truncating mutations, fusions and homozygous deletion of *SMARCA4* co-occurred more frequently with *KRAS*, *STK11*, and *KEAP1* mutations and are associated with shortest survival times of patients with non-small lung cancers ($P < 0.001$) [48]. On the contrary, analysis of the genomic data from the TCGA database of breast cancer patients showed <2% mutation frequency in invasive breast carcinomas, whereas the elevated expression of BRG1 occurred in 35-100% of analyzed primary tumors and was responsible for the high proliferation rate and was also a predictive biomarker for metastases risk [23]. However, the reversal of missense or truncating mutations has not been documented in the literature. The repeated exposure of a non-small lung cancer cell line with the *SMARCA4* truncating mutation caused a gain of missense mutation, which resulted in the inversion of the stop codon, restoration of mRNA translation and re-occurrence of BRG1. Since the initially truncating mutation occurred outside/beyond the enzyme functional domains, the short deletion in protein structure did not

1 affect BRG1 activity or structure and the enzyme emerged functional, capable of controlling
2 some ABC gene transcription and facilitating cell adaptation to paclitaxel in the environment.
3 The transient deficiency of BRG1 in paclitaxel-resistant A549 cells sensitized these cells to a
4 wide range of anticancer drugs. This implies the need to carefully testing SMARCA4 status,
5 particularly when considering synthetic lethal therapy in SMARCA4 mutated cancers.
6 Alteration in the BRG1 levels in cancer cells may drive their adaptation to particular conditions
7 and promote transformation and progression of specific cancer types [49]. Furthermore,
8 development of drug resistance is associated with considerable BRG1 redistribution in the
9 genome of MDA-MB-231, which may support the gain of preferable transcriptome profile and
10 desired phenotype. Although BRG1 was found at some ABCC promoters in non-resistant and
11 resistant phenotypes, the activity of this enzyme varied. This implies the need for better
12 understanding of the molecular mechanisms that determine gene transcription-dependence
13 on BRG1, already difficult due to the multivalent DNA and chromatin-defined binding of BRG1
14 to histones as well as a relatively long list of SWI/SNF subunits and transcription co-factors
15 that define BRG1 activity and interaction with particular gene promoters or enhancers [50].
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 In summary, pharmacological inhibition or degradation of SWI/SNF as well as BRG1 silencing
26 leads to extralysosomal distribution of anticancer drugs, their deeper penetration of spheroids
27 and substantial increase in drug cytotoxicity. Our study provides new target - SWI/SNF
28 complex, and particularly SMARCA4 that encodes BRG1, for anticancer combinatorial
29 interventions in paclitaxel-induced multidrug resistant phenotypes.
30
31
32
33
34

35 **Glossary:** ABC - ATP-binding cassette, ADAADi - Active DNA-dependent ATPase A Domain
36 inhibitor, CTX - cabazitaxel, DTX - docetaxel, LMP - lysosomal membrane permeability, MDR
37 - multidrug resistance, PTX - paclitaxel. SRAP - Structurally Related Analog of PFI-3
38
39

40 **Acknowledgments**

41 Graphical abstract was created with BioRender.com, agreement number: OF275Q4A5Q.
42
43
44

45 **Author contributions**

46 Karolina Gronkowska: Investigation, Validation, Formal analysis, Writing – original draft. Sylwia
47 Michlewska: Investigation, Visualization, Tomasz Płoszaj: Investigation, Data curation.
48 Magdalena Strachowska: Investigation. Adrianna Stępień: Investigation. Maciej Borowiec:
49 Resources, Writing – review & editing. Andrzej Bednarek: Resources, Writing – review &
50 editing. Agnieszka Robaszkiewicz: Conceptualization, Validation, Investigation, Data curation,
51 Resources, Funding acquisition, Project administration, Writing – original draft, Writing –
52 review & editing.
53
54
55
56
57
58

59 **Declaration of competing interest**

60
61
62
63
64
65

The authors declare no conflict of interest.

Data availability

Data underlying the results presented in this manuscript are provided within the Supplementary Data. Original raw data files containing sequence reads and quality scores were submitted to the NCBI Sequence Read Archive (SRA) database under the BioProject accession numbers: PRJNA1095909 and PRJNA1096152.

Funding

This research was funded by National Centre for Research and Development, grant number: LIDER/22/0122/L-10/18/NCBR/2019.

References:

- [1] L. Mosca, A. Ilari, F. Fazi, Y.G. Assaraf, G. Colotti, Taxanes in cancer treatment: Activity, chemoresistance and its overcoming., *Drug Resist Updat* 54 (2021) 100742. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2020.100742>.
- [2] N.C. Kampan, M.T. Madondo, O.M. McNally, M. Quinn, M. Plebanski, Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer, *Biomed Res Int* 2015 (2015) 413076. <https://doi.org/10.1155/2015/413076>.
- [3] F. Zang, Y. Rao, X. Zhu, Z. Wu, H. Jiang, Shikonin suppresses NEAT1 and Akt signaling in treating paclitaxel-resistant non-small cell of lung cancer., *Mol Med* 26 (2020) 28. <https://doi.org/10.1186/s10020-020-00152-8>.
- [4] J. Pu, J. Shen, Z. Zhong, M. Yanling, J. Gao, KANK1 regulates paclitaxel resistance in lung adenocarcinoma A549 cells., *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 48 (2020) 639–647. <https://doi.org/10.1080/21691401.2020.1728287>.
- [5] S.M. Maloney, C.A. Hoover, L. V Morejon-Lasso, J.R. Prospero, Mechanisms of Taxane Resistance., *Cancers (Basel)* 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/cancers12113323>.
- [6] J. Škubník, V. Pavlíčková, T. Ruml, S. Rimpelová, Current Perspectives on Taxanes: Focus on Their Bioactivity, Delivery and Combination Therapy., *Plants (Basel)* 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/plants10030569>.
- [7] F.U. Vaidya, A. Sufiyan Chhipa, V. Mishra, V.K. Gupta, S.G. Rawat, A. Kumar, C. Pathak, Molecular and cellular paradigms of multidrug resistance in cancer, *Cancer Rep* 5 (2022) e1291. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cnr2.1291>.
- [8] Q. ZHANG, Y. SONG, X. CHENG, Z. XU, O.A. MATTHEW, J.I.A. WANG, Z. SUN, X. ZHANG, Apatinib Reverses Paclitaxel-resistant Lung Cancer Cells (A549) Through Blocking the Function of ABCB1 Transporter, *Anticancer Res* 39 (2019) 5461 LP – 5471. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13739>.
- [9] T. Oguri, H. Ozasa, T. Uemura, Y. Bessho, M. Miyazaki, K. Maeno, H. Maeda, S. Sato, R. Ueda, MRP7/ABCC10 expression is a predictive biomarker for the resistance to paclitaxel in non-small cell lung cancer., *Mol Cancer Ther* 7 (2008) 1150–1155. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-2088>.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- [10] C. Melguizo, J. Prados, R. Luque, R. Ortiz, O. Caba, P.J. Alvarez, B. Gonzalez, A. Aranega, Modulation of MDR1 and MRP3 gene expression in lung cancer cells after paclitaxel and carboplatin exposure., *International Journal of Molecular Sciences* file:///C:/Users/Karolina/Downloads/34347777.Nbib 13 (2012) 16624–16635. <https://doi.org/10.3390/ijms131216624>.
- [11] A.A. SPROUSE, B.-S. HERBERT, Resveratrol Augments Paclitaxel Treatment in MDA-MB-231 and Paclitaxel-resistant MDA-MB-231 Breast Cancer Cells, *Anticancer Res* 34 (2014) 5363 LP – 5374.
- [12] J.R. McCorkle, J.W. Gorski, J. Liu, M.B. Riggs, A.B. McDowell, N. Lin, C. Wang, F.R. Ueland, J.M. Kolesar, Lapatinib and poziotinib overcome ABCB1-mediated paclitaxel resistance in ovarian cancer., *PLoS One* 16 (2021) e0254205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254205>.
- [13] Y. Hou, Q. Zhu, Z. Li, Y. Peng, X. Yu, B. Yuan, Y. Liu, Y. Liu, L. Yin, Y. Peng, Z. Jiang, J. Li, B. Xie, Y. Duan, G. Tan, K. Gulina, Z. Gong, L. Sun, X. Fan, X. Li, The FOXM1–ABCC5 axis contributes to paclitaxel resistance in nasopharyngeal carcinoma cells, *Cell Death Dis* 8 (2017) e2659–e2659. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.53>.
- [14] K. Gronkowska, S. Michlewska, A. Robaszekiewicz, Activity of Lysosomal ABCC3, ABCC5 and ABCC10 is Responsible for Lysosomal Sequestration of Doxorubicin and Paclitaxel-Oregongreen488 in Paclitaxel-Resistant Cancer Cell Lines., *Cell Physiol Biochem* 57 (2023) 360–378. <https://doi.org/10.33594/000000663>.
- [15] Y. Hou, Z. Dong, W. Zhong, L. Yin, X. Li, G. Kuerban, H. Huang, FOXM1 Promotes Drug Resistance in Cervical Cancer Cells by Regulating ABCC5 Gene Transcription., *Biomed Res Int* 2022 (2022) 3032590. <https://doi.org/10.1155/2022/3032590>.
- [16] C. Huang, X. Zhang, L. Jiang, L. Zhang, M. Xiang, H. Ren, FoxM1 Induced Paclitaxel Resistance via Activation of the FoxM1/PHB1/RAF-MEK-ERK Pathway and Enhancement of the ABCA2 Transporter, *Mol Ther Oncolytics* 14 (2019) 196–212. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.omto.2019.05.005>.
- [17] Y. Li, J. Sun, S. Gao, H. Hu, P. Xie, HOXB4 knockdown enhances the cytotoxic effect of paclitaxel and cisplatin by downregulating ABC transporters in ovarian cancer cells, *Gene* 663 (2018) 9–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.033>.
- [18] X. Si, Z. Gao, F. Xu, Y. Zheng, SOX2 upregulates side population cells and enhances their chemoresistant ability by transactivating ABCC1 expression contributing to intrinsic resistance to paclitaxel in melanoma., *Mol Carcinog* 59 (2020) 257–264. <https://doi.org/10.1002/mc.23148>.
- [19] P. Mukherjee, A. Gupta, D. Chattopadhyay, U. Chatterji, Modulation of SOX2 expression delineates an end-point for paclitaxel-effectiveness in breast cancer stem cells, *Sci Rep* 7 (2017) 9170. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08971-2>.
- [20] A. Kohli, S.-L. Huang, T.-C. Chang, C.C.-K. Chao, N.-K. Sun, H1.0 induces paclitaxel-resistance genes expression in ovarian cancer cells by recruiting GCN5 and androgen receptor, *Cancer Sci* 113 (2022) 2616–2626. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/cas.15448>.
- [21] M. Strachowska, K. Gronkowska, M. Sobczak, M. Grodzicka, S. Michlewska, K. Kołacz, T. Sarkar, J. Korszun, M. Ionov, A. Robaszekiewicz, I-CBP112 declines overexpression of ATP-

1 binding cassette transporters and sensitized drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines
2 to chemotherapy drugs, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 168 (2023) 115798.
3 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115798>.

- 4 [22] J. Pietrzak, T. Płoszaj, Ł. Pułaski, A. Robaszkiewicz, EP300-HDAC1-SWI/SNF functional unit
5 defines transcription of some DNA repair enzymes during differentiation of human
6 macrophages, *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 1862 (2019) 198–208.
7 <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.10.019>.
- 8 [23] M. Sobczak, J. Pietrzak, P. Tomasz, A. Robaszkiewicz, BRG1 Activates Proliferation and
9 Transcription of Cell Cycle-Dependent Genes in Breast Cancer Cells, *Cancers (Basel)* 12 (2020)
10 1–18. <https://doi.org/10.3390/cancers12020349>.
- 11 [24] Q. Wu, S. Sharma, H. Cui, S.E. LeBlanc, H. Zhang, R. Muthuswami, J.A. Nickerson, A.N.
12 Imbalzano, Targeting the chromatin remodeling enzyme BRG1 increases the efficacy of
13 chemotherapy drugs in breast cancer cells, *Oncotarget* 7 (2016) 27158–27175.
14 <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8384>.
- 15 [25] Q. Wu, J.B. Lian, J.L. Stein, G.S. Stein, J.A. Nickerson, A.N. Imbalzano, The BRG1 ATPase of
16 human SWI/SNF chromatin remodeling enzymes as a driver of cancer., *Epigenomics* 9 (2017)
17 919–931. <https://doi.org/10.2217/epi-2017-0034>.
- 18 [26] M. Sobczak, M. Strachowska, K. Gronkowska, A. Robaszkiewicz, Activation of ABCC Genes by
19 Cisplatin Depends on the CoREST Occurrence at Their Promoters in A549 and MDA-MB-231
20 Cell Lines, *Cancers (Basel)* 14 (2022) 894. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14040894/S1>.
- 21 [27] E. Wiśnik, T. Płoszaj, A. Robaszkiewicz, Downregulation of PARP1 transcription by promoter-
22 associated E2F4-RBL2-HDAC1-BRM complex contributes to repression of pluripotency stem
23 cell factors in human monocytes, *Sci Rep* 7 (2017) 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10307-z>.
- 24 [28] M. Strachowska, K. Gronkowska, S. Michlewska, A. Robaszkiewicz, CBP/p300 Bromodomain
25 Inhibitor-I-CBP112 Declines Transcription of the Key ABC Transporters and Sensitizes Cancer
26 Cells to Chemotherapy Drugs, *Cancers (Basel)* 13 (2021).
27 <https://doi.org/10.3390/CANCERS13184614>.
- 28 [29] The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022
29 update, *Nucleic Acids Res* 50 (2022) W345–W351. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac247>.
- 30 [30] J.R. Dobson, D. Hong, A.R. Barutcu, H. Wu, A.N. Imbalzano, J.B. Lian, J.L. Stein, A.J. van Wijnen,
31 J.A. Nickerson, G.S. Stein, Identifying Nuclear Matrix-Attached DNA Across the Genome, *J Cell
32 Physiol* 232 (2017) 1295–1305. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcp.25596>.
- 33 [31] H.M. Amemiya, A. Kundaje, A.P. Boyle, The ENCODE Blacklist: Identification of Problematic
34 Regions of the Genome, *Sci Rep* 9 (2019) 9354. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45839-z>.
- 35 [32] E. Errichiello, N. Mustafa, A. Vetro, L.D. Notarangelo, H. de Jonge, B. Rinaldi, D. Vergani, S.R.
36 Giglio, P. Morbini, O. Zuffardi, SMARCA4 inactivating mutations cause concomitant Coffin–
37 Siris syndrome, microphthalmia and small-cell carcinoma of the ovary hypercalcaemic type, *J
38 Pathol* 243 (2017) 9–15. <https://doi.org/10.1002/PATH.4926>.
- 39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- [33] S. Kangaspeska, S. Hultsch, H. Edgren, D. Nicorici, A. Murumägi, O. Kallioniemi, Reanalysis of RNA-Sequencing Data Reveals Several Additional Fusion Genes with Multiple Isoforms, *PLoS One* 7 (2012). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0048745>.
- [34] W. Muriithi, L.W. Macharia, C.P. Heming, J.L. Echevarria, A. Nyachio, P.N. Filho, V.M. Neto, ABC transporters and the hallmarks of cancer: roles in cancer aggressiveness beyond multidrug resistance, *Cancer Biol Med* 17 (2020) 253–269. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0284>.
- [35] M. Saxena, M.A. Stephens, H. Pathak, A. Rangarajan, Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters, *Cell Death Dis* 2 (2011) e179–e179. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.61>.
- [36] B. Zhitomirsky, Y.G. Assaraf, Lysosomal accumulation of anticancer drugs triggers lysosomal exocytosis, *Oncotarget* 8 (2017) 45117. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.15155>.
- [37] S. Bala, G. Szabo, TFEB, a master regulator of lysosome biogenesis and autophagy, is a new player in alcoholic liver disease., *Dig Med Res* 1 (2018). <https://doi.org/10.21037/dmr.2018.09.03>.
- [38] B. Franco-Juárez, C. Coronel-Cruz, B. Hernández-Ochoa, S. Gómez-Manzo, N. Cárdenas-Rodríguez, R. Arreguin-Espinosa, C. Bandala, L.M. Canseco-Ávila, D. Ortega-Cuellar, TFEB; Beyond Its Role as an Autophagy and Lysosomes Regulator, *Cells* 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/cells11193153>.
- [39] D. Lee, D.-Y. Lee, Y.-S. Hwang, H.-R. Seo, S.-A. Lee, J. Kwon, The Bromodomain Inhibitor PFI-3 Sensitizes Cancer Cells to DNA Damage by Targeting SWI/SNF, *Molecular Cancer Research* 19 (2021) 900–912. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-20-0289>.
- [40] D. Ganguly, M. Sims, C. Cai, M. Fan, L.M. Pfeffer, Chromatin Remodeling Factor BRG1 Regulates Stemness and Chemosensitivity of Glioma Initiating Cells, *Stem Cells* 36 (2018) 1804–1815. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/stem.2909>.
- [41] Y. He, C. Yang, Y. Wang, J.R. Sacher, M.M. Sims, L.M. Pfeffer, D.D. Miller, Novel structural-related analogs of PFI-3 (SRAPs) that target the BRG1 catalytic subunit of the SWI/SNF complex increase the activity of temozolomide in glioblastoma cells, *Bioorg Med Chem* 53 (2022) 116533. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116533>.
- [42] R. Rakesh, U.B. Chanana, S. Hussain, S. Sharma, K. Goel, D. Bisht, K. Patne, P.B. Swer, J.W. Hockensmith, R. Muthuswami, Altering mammalian transcription networking with ADAADi: An inhibitor of ATP-dependent chromatin remodeling., *PLoS One* 16 (2021) e0251354. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251354>.
- [43] W. Farnaby, M. Koegl, M.J. Roy, C. Whitworth, E. Diers, N. Trainor, D. Zollman, S. Steurer, J. Karolyi-Oezguer, C. Riedmueller, T. Gmaschitz, J. Wachter, C. Dank, M. Galant, B. Sharps, K. Rumpel, E. Traxler, T. Gerstberger, R. Schnitzer, O. Petermann, P. Greb, H. Weinstabl, G. Bader, A. Zoepfel, A. Weiss-Puxbaum, K. Ehrenhöfer-Wölfer, S. Wöhrle, G. Boehmelt, J. Rinnenthal, H. Arnhof, N. Wiechens, M.-Y. Wu, T. Owen-Hughes, P. Ettmayer, M. Pearson, D.B. McConnell, A. Ciulli, BAF complex vulnerabilities in cancer demonstrated via structure-based PROTAC design., *Nat Chem Biol* 15 (2019) 672–680. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0294-6>.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
- [44] S. Suzuki, M. Ogawa, M. Miyazaki, K. Ota, H. Kazama, A. Hirota, N. Takano, M. Hiramoto, K. Miyazawa, Lysosome-targeted drug combination induces multiple organelle dysfunctions and non-canonical death in pancreatic cancer cells, *Oncol Rep* 47 (2022) 40. <https://doi.org/10.3892/or.2021.8251>.
- [45] W. Trybus, E. Trybus, T. Król, Lysosomes as a Target of Anticancer Therapy, *Int J Mol Sci* 24 (2023). <https://doi.org/10.3390/ijms24032176>.
- [46] K.S. Allemailem, A. Almatroudi, F. Alrumaihi, S.A. Almatroodi, M.O. Alkurbi, G.T. Basfar, A.H. Rahmani, A.A. Khan, Novel Approaches of Dysregulating Lysosome Functions in Cancer Cells by Specific Drugs and Its Nanoformulations: A Smart Approach of Modern Therapeutics., *Int J Nanomedicine* 16 (2021) 5065–5098. <https://doi.org/10.2147/IJN.S321343>.
- [47] M. Wanior, A. Krämer, S. Knapp, A.C. Joerger, Exploiting vulnerabilities of SWI/SNF chromatin remodelling complexes for cancer therapy., *Oncogene* 40 (2021) 3637–3654. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01781-x>.
- [48] A.J. Schoenfeld, C. Bandlamudi, J.A. Lavery, J. Montecalvo, A. Namakydoust, H. Rizvi, J. Egger, C.P. Concepcion, S. Paul, M.E. Arcila, Y. Daneshbod, J. Chang, J.L. Sauter, A. Beras, M. Ladanyi, T. Jacks, C.M. Rudin, B.S. Taylor, M.T.A. Donoghue, G. Heller, M.D. Hellmann, N. Rekhtman, G.J. Riely, The Genomic Landscape of SMARCA4 Alterations and Associations with Outcomes in Patients with Lung Cancer., *Clin Cancer Res* 26 (2020) 5701–5708. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-1825>.
- [49] Z. Li, J. Xia, M. Fang, Y. Xu, Epigenetic regulation of lung cancer cell proliferation and migration by the chromatin remodeling protein BRG1., *Oncogenesis* 8 (2019) 66. <https://doi.org/10.1038/s41389-019-0174-7>.
- [50] T. Bieluszewski, S. Prakash, T. Roulé, D. Wagner, The Role and Activity of SWI/SNF Chromatin Remodelers., *Annu Rev Plant Biol* 74 (2023) 139–163. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102820-093218>.

Figure captions

Figure 1 BRG1 co-activates transcription of some multidrug resistance-relevant ABC transporters in paclitaxel-resistant cell lines

43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

(A) mRNA level of *SMARCA4* and its truncating deletions correlate with transcription yield of some transmembrane drug carriers in cancer cells according to clinical data. Visual Spreadsheet of UCSC Xena Functional Genomics Explorer compares co-expression of *SMARCA4* and some multidrug resistance-relevant ABC genes based on TCGA Pan-Cancer (PANCAN). Samples with $\log_2(\text{norm_value}+1) < 10.7$ were assigned as *SMARCA4* low. (B) Deficiency of BRG1 declines transcription of some ABC genes only in *SMARCA4* wild-type cell lines. The impact of siBRG1 72 h after cell transfection on the studied ABC gene transcription in various *SMARCA4* genotypes was analysed by real-time PCR. Normalized mRNA level of each gene was assumed as 1 in siCTRL. MDA-MB-231 served as *SMARCA4* proficient (BRG1 functional), A549 as *SMARCA4* deficient (BRG1 truncated, non-functional) and MCF7 as *SMARCA4* fusion (BRG1-CARM1 fusion, non-functional). The difference between siCTRL and

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

siBRG1 was analyzed by Student's t-test with Welsch correction, and “*” when $p < 0.05$, whereas “ns” when $p > 0.05$. (C) BRG1 is enriched at the promoters of ABCC genes, regardless of their transcriptional dependence on BRG1. BRG1 occurrence at the genomic locations spanning TSS of *ABCC3*, *ABCC5* and *ABCC2* in MDA-MB-231 cells was visualized in USCS Genome Browser and BigWig file was derived from MACS2 peak calling. P indicates cutoff for peak detection, when BRG1 was statistically overrepresented at the considered gene promoters. *ABCC2* served as a negative control. (D) BRG1-enriched promoters (± 2 kbp from TSS) represent genes functionally linked to various intracellular processes including protein trafficking to endomembrane system. Ontology of genes characterized by BRG1 occurrence at their promoters (minimum FDR (q-value) cutoff for peak detection set at 0.05) in MDA-MB-231 cells was annotated to biological processes in Panther using statistical overrepresentation test. Genes listed in boxes represent two GO terms (GO:0006891 and GO: 0006622) associated with intracellular vesicle-mediated exchange system of membrane components comprising Golgi apparatus and endolysosomal system. (E) Acquired resistance to paclitaxel changes transcription profile of ABC genes that are functionally linked to multidrug resistance. Normalized gene expression between mapped reads of RNA-Seq datasets from basal (non-resistant; marked as “-”) and paclitaxel-resistant (“Ptx”) cells was generated in CuffLinks using GTEx Gene as a template. Results are shown as a heatmap of normalized gene transcription (FPKM). (F-G) Transient silencing of BRG1 downregulates transcription of a common gene subset, which represent molecular function of transmembrane transporter activity (GO:0022857) in paclitaxel-resistant MDA-MB-251 (MDA-PTX) and A549 (A549-PTX) cell lines. (F) Venn diagram of genes characterized by transcription decline in response to BRG1 silencing ($\text{Log}_2\text{FC} < -0.5$; differential gene expression was generated in CuffDiff using RNA-Seq datasets from BRG1 proficient – siCTRL and deficient – siBRG1 paclitaxel-resistant cell lines) were created using <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/> (G) GO terms (molecular function) were assigned to the common gene sets of MDA-PTX and A549-PTX in Panther using statistical overrepresentation test. (H) BRG1 silencing alters transcription of ABC genes, which can contribute to multidrug resistance in cells exposed to several cycles of paclitaxel treatment. Heatmap of differential gene expression presents Log_2FC generated in CuffDiff based on RNA-Seq data from BRG1 proficient – siCTRL and deficient – siBRG1 paclitaxel-resistant cells. Bolded genes are characterized by relatively high, unchanged expression or substantial transcription increase caused by paclitaxel. (I) mRNA level of ABC transporters was compared between control and BRG1-deficient samples by real-time PCR. Transcription level was normalized first to housekeeping genes (*ACTB*, *GAPDH* and *HPRT1*) and, then, mRNA level of control was assumed as 1. The difference between two means was tested with Student's t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$ * and ** when $p < 0.01$. (J) Effect of transient BRG1 silencing on *ABCC3*, *ABCC5* and

1 ABCC10 protein levels. The lysates of paclitaxel-resistant cells transiently silenced siCTRL
2 and siBRG1 were analyzed by Western Blot. BRG1 was used as a control for silencing efficacy.
3 Histone H3 was used as a loading control.
4

5 **Figure 2 BRG1 redistribution in the genome and de novo recruitment to gene promoters**
6 **in the paclitaxel-resistant cell links this enzyme with endolysosomal organization and**
7 **transport**
8
9

10
11 (A-B) Resistance to paclitaxel changes proportion of BRG1 occurrence at the gene promoters.
12 BRG1 peaks were quantified in the following genomic regions: (A) promoters – regions ± 2 kbp
13 from transcription start site (TSS) and enhancers – derived from UCSC table vistaEnhancers,
14 (B) genes (intergenic regions) – derived from UCSC table gtexGene V8. (C) BRG1 shifts from
15 TSS proximal to distal regions in response to repeated MDA-MB-231 cell exposure to
16 paclitaxel. BRG1 peaks were quantified with respect to the TSS by bedtools ClosestBed, while
17 taking MACS2 peak summits of BRG1 and TSS derived from UCSC table gtexGene V8.
18 Counts were normalized to peak number at -1 kbp. (D) Gained resistance to paclitaxel is
19 associated with BRG1 spreading at the gene transcription start site. BRG1 occurrence in the
20 region spanning TSS (± 0.5 kbp) was monitored by plotting a profile and heatmap of BRG1
21 peaks against TSS as a reference point (computeMatrix: plotHeatmap; regions sorted in
22 descending order by mean without clustering). (E) BRG1, EP300 and H3K4me3 are enriched
23 at the promoter of *ABCC5* gene regardless of MDA-MB-231 cell resistance to paclitaxel.
24 Genome coverage (as BigWig derived from -bamCoverage) with the two proteins and histone
25 modification around TSS of *ABCC5* was visualized in USCS Genome Browser. (F) BRG1 and
26 EP300 are less centered at the transcriptionally active TSS in paclitaxel-resistant cells. The
27 distribution of these two enzymes at H3K4m3 positive TSS in MDA-MB-231 non- versus
28 paclitaxel-resistant was counted (-computeMatrix) and visualized (-plotHeatmap) in the region
29 spanning TSS ± 2.5 kbp. Regions were clustered with respect to H3K4me3 intensity. (G)
30 resistance to paclitaxel declines BRG1 correlation with H3K4me3, but enhances co-occurrence
31 with EP300. BRG1, EP300 and H3K4me3 genomic co-distribution was calculated as
32 Spearman correlation coefficient (-multiBigWigSummary and -plotCorrelation; genomic
33 regions were taken as H3K4me3 peaks that overlap TSS). (H) Paclitaxel resistance of MDA-
34 MB-231 is associated with substantial recruitment of BRG1 to new subset of gene promoters.
35 Gene promoters (TSS ± 2 kbp) characterized by BRG1 peaks in non-resistant and paclitaxel-
36 resistant phenotypes were plotted in venn diagram. Extruded, *de novo* and remained
37 promoters refer to promoters enriched BRG1 in non-resistant cells only, in paclitaxel-resistant
38 cells, and in both cell phenotypes, respectively. The possible enzyme shift in the considered
39 regions were not taken into consideration. (I) BRG1 is recruited *de novo* to promoters of genes,
40 which are functionally linked to numerous processes including ER-Golgi-endosome-lysosome
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

transport. Gene ontology (GO: biological process complete) of BRG1 *de novo* enriched promoters in paclitaxel-resistant MDA-MB-231 cells was assigned in Panther using statistical overrepresentation test

Figure 3 BRG1 drives overexpression of lysosomally localized ABC-transporters in PTX-resistant cell lines, which are crucial for drug sequestration and reduced drug cytotoxicity

(A-D) BRG1 confers overrepresentation of some ABCC proteins in lysosomes of paclitaxel-resistant cancer cells. (A) ABC transporter expression and localization 72 h after cell transfection with siCTRL and siBRG1 were visualized by immunocytochemistry followed by confocal microscopy. Green fluorescence derived from Alexafluor488-conjugated secondary antibody corresponds to ABC transporters appearance in cells. DNA was stained with DAPI (blue). Lysosomes were stained with LysoTracker (red). The fluorescence intensity (B) and colocalization (C) was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student's t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$ (D) Red fluorescence of ABC transporters is derived from R-phycoerythrin-labelled secondary antibody and LAMP1- green fluorescence is derived from Alexafluor488-conjugated secondary antibody. The scans of lysosomes were deconvolved using 3D-Deconvolution accessible in Leica Application Suite X software (LAS X, Leica Microsystems, Germany). (E) BRG1 causes lysosomal sequestration of paclitaxel Oregon Green in lysosomes of paclitaxel-resistant cancer cell lines. Colocalization of fluorescently labelled paclitaxel and lysosomes was compared between BRG1 proficient and deficient cells. Paclitaxel is marked in green (Oregon Green 488), lysosomes in red (LysoTracker Deep Red), DNA in blue (DAPI). The colocalization (F) was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student's t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$ (G) BRG1 confers multidrug resistance in cells exposed to several doses of paclitaxel. Sensitivity to doxorubicin, daunorubicin, paclitaxel, cisplatin and etoposide was compared between control and BRG1 silenced ptx-resistant cell lines. Viability was measured with resazurin-based assay. Metabolic activity of control cells was assumed as 100%. (H) Paclitaxel Oregon Green accumulation in lysosomes of paclitaxel-resistant cells grown in 3D cultures requires BRG1. Control and BRG1 silenced paclitaxel-resistant A549 cell line spheroids were scanned for intracellular paclitaxel Oregon Green distribution. The drug is marked in green, DNA in blue, lysosomes in red (staining as described in E). The fluorescence intensity plot at spheroid cross section was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

Figure 4 SWI/SNF targeting with PFI-3 and ACBI1 reduces expression on ABCC transporters overrepresented in lysosomes of paclitaxel-resistant cells

(A-D, H-K) The lack of SWI/SNF activity declines transcription and intracellular abundance of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 in paclitaxel-resistant phenotypes. mRNA level of *ABCC3*, *ABCC5* and *ABCC10* was compared by real-time PCR in paclitaxel-resistant MDA-MB-231 (A) and A549 (C) cells exposed and not to PFI3 (2.5 uM, 72h) and paclitaxel-resistant MDA-MB-231 (H) and A549 (J) cells exposed and not to ACBI1 (0.5 uM, 72h). Transcription level was normalized first to housekeeping genes (*ACTB*, *GAPDH* and *HPRT1*) and for control sample was assumed as 1. The difference between two means was tested with Student's t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$. (B,D) Impact of PFI3 on ABCC10 protein level in paclitaxel-resistant MDA-MB-231 (B) and A549 (D) cell lysates was tested by Western Blot. (I,K) Effect on ACBI1-targeted SWI/SNF subunits degradation on ABCC3 protein level in paclitaxel-resistant MDA-MB-231 (I) and A549 (K) cell lysates was tested by Western Blot. Histone H3 was used as a loading control. (E, L) Expression and localization of ABC transporters was visualized by immunocytostaining followed by confocal microscopy in non-treated vs PFI3 (E) and ACBI1 (L) -targeted cells. Green fluorescence of ABC transporters derived from Alexafluor488-conjugated secondary antibody, blue fluorescence of DNA from DAPI, whereas lysosomal red fluorescence from LysoTracker Deep Red. The fluorescence intensity (F,M) and colocalization (G,N) was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student's t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$. (O) Confocal microscopy imaging of lysosomal membrane proteins in control and PFI3-treated MDA-MB-231-PTX cells. ABC transporters were visualized by immunocytostaining followed by confocal microscopy. Red fluorescence of ABC transporters is derived from R-phycoerythrin-labelled secondary antibody and green fluorescence of LAMP1 is derived from Alexafluor488-conjugated secondary antibody. The scans of lysosomes were deconvolved using 3D-Deconvolution accessible in Leica Application Suite X software (LAS X, Leica Microsystems, Germany).

49
50
51
52

Figure 5 SWI/SNF targeting with PFI-3 and ACBI1 decreases drug accumulation in lysosomes of paclitaxel-resistant cancer cells

53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

(A,D) SWI/SNF-targeting uncouples paclitaxel Oregon Green accumulation in lysosomes of paclitaxel-resistant cells. Confocal imaging was used to study the impact of SWI/SNF inhibitor – PFI3 (2.5 uM, 24h) (A) and ACBI1 (D) on intracellular localization of fluorescently labelled paclitaxel. The drug is marked green (Oregon Green 488), DNA in blue (DAPI) and lysosomes in red (LysoTracker Deep Red). The fluorescence intensity of paclitaxel Oregon Green (B, E)

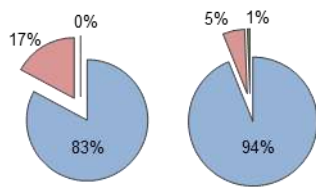
1 and colocalization between the drug and lysosomes (C,F) was determined in arbitrary units
2 (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with
3 Student's t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$ *, **
4 when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$ (G) Doxorubicin accumulation in lysosomes of paclitaxel-
5 resistant cells grown in 3D cultures after PFI3-treatment. Control and inhibitor-treated
6 paclitaxel-resistant MDA-MB-231 cell line spheroids were scanned for intracellular Doxorubicin
7 distribution. The autofluorescent drug is marked in red, DNA in blue, lysosomes in green. The
8 fluorescence intensity plot at spheroid cross section was determined in arbitrary units (a.u.)
9 with Leica Application Suite X.

15 **Figure 6 PFI3 and ACBI1 augments the toxicity of anticancer drugs in PTX-resistant** 16 **cancer cell lines**

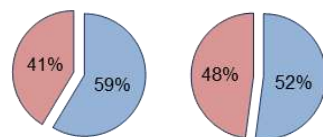
19 (A) SWI/SNF-targeting increases paclitaxel-resistant cell death in a spheroid model of
20 anticancer treatment. 3-week spheroids were firstly incubated with PFI3 or ABCI1 for 72 h and
21 then paclitaxel and doxorubicin were added for 48 h. Externalization of phosphatidylserine,
22 which marks apoptotic cells, was monitored by confocal microscopy after cell staining with
23 FITC-conjugated annexin V (green). DNA of necrotic cells (with disrupted membrane integrity)
24 was stained with Propidium Iodide (red). DNA was stained with DAPI (blue). (B, C) The
25 fluorescence intensity was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X.
26 The difference between two means was tested with Student's t-test, and statistically significant
27 differences are marked with * when $p < 0.05$ *, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$. (D) PFI3
28 (2.5 μ M, 72h) enhances apoptosis induced doxorubicin and paclitaxel in A549-PTX cells.
29 Confocal imaging using Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) was used to compare
30 the intensity of caspase 3 fluorescence between PFI3-treated and non-treated cells. The
31 impact of ACBI1 (0.5 μ M, 48 h) (E) and PFI3 (2.5 μ M, 48 h) on the toxicity of some anticancer
32 therapeutics. Cell viability was quantified with resazurin-based assay 24 after cell treatment
33 with drugs. Cell viability with drug alone was assumed as 100%.

A Non-resistant → Pacli-resistant

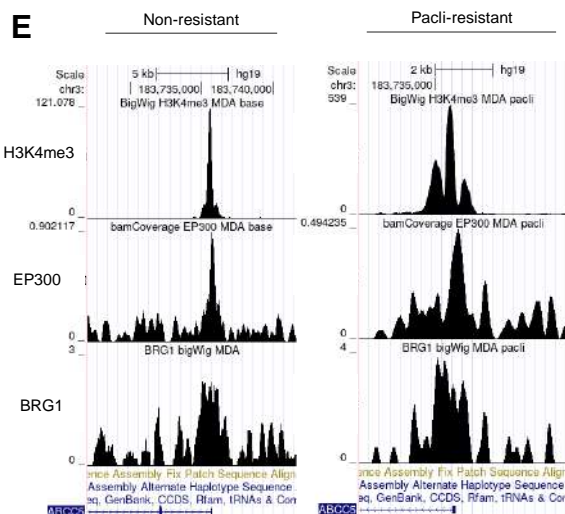
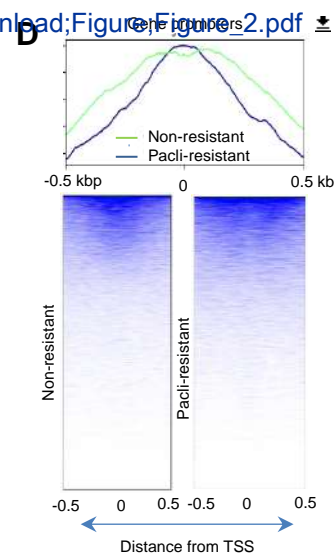
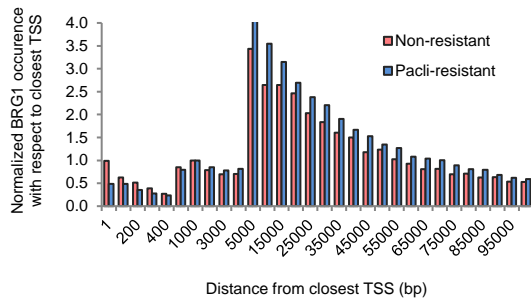
Unknown Promoters Enhancers



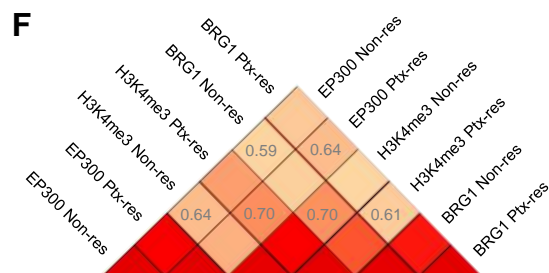
B Intergenic Intragenic



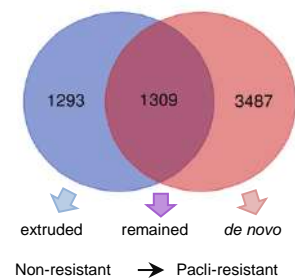
C



F

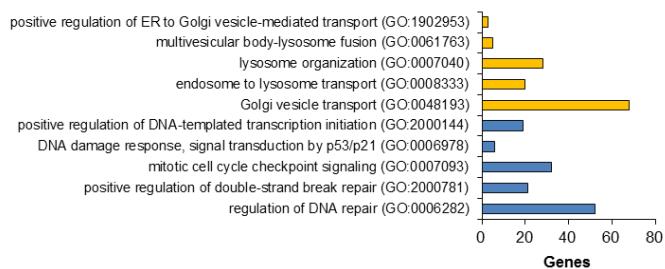


G BRG1 at TSS ± 2 kbp

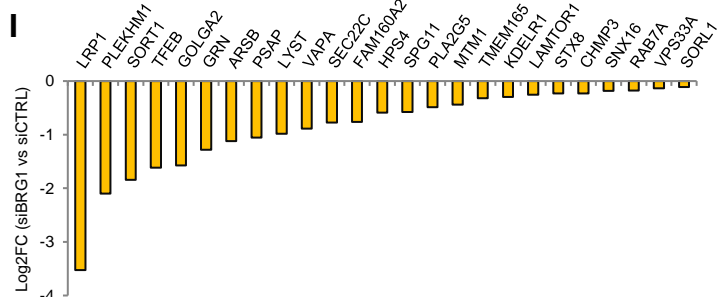


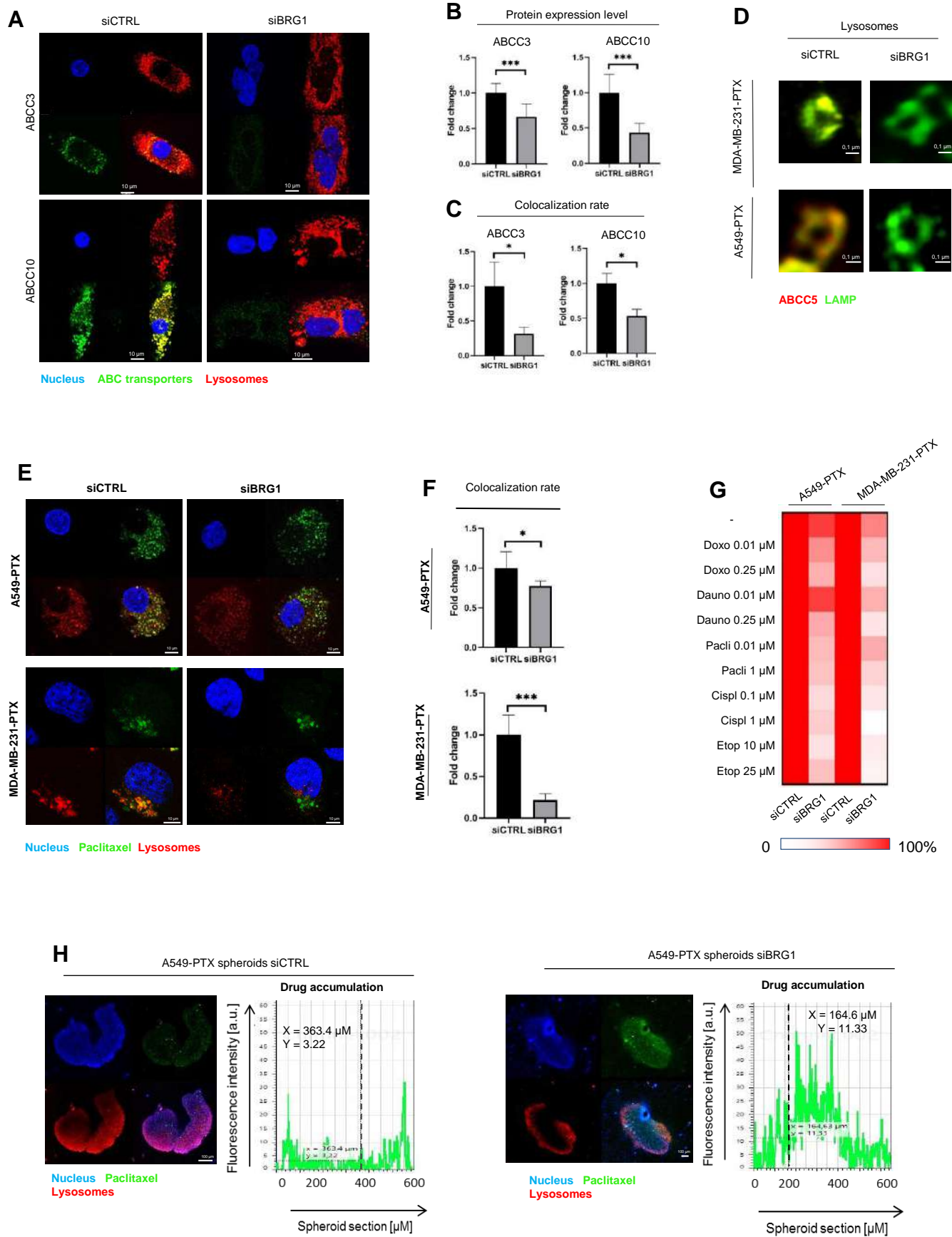
H

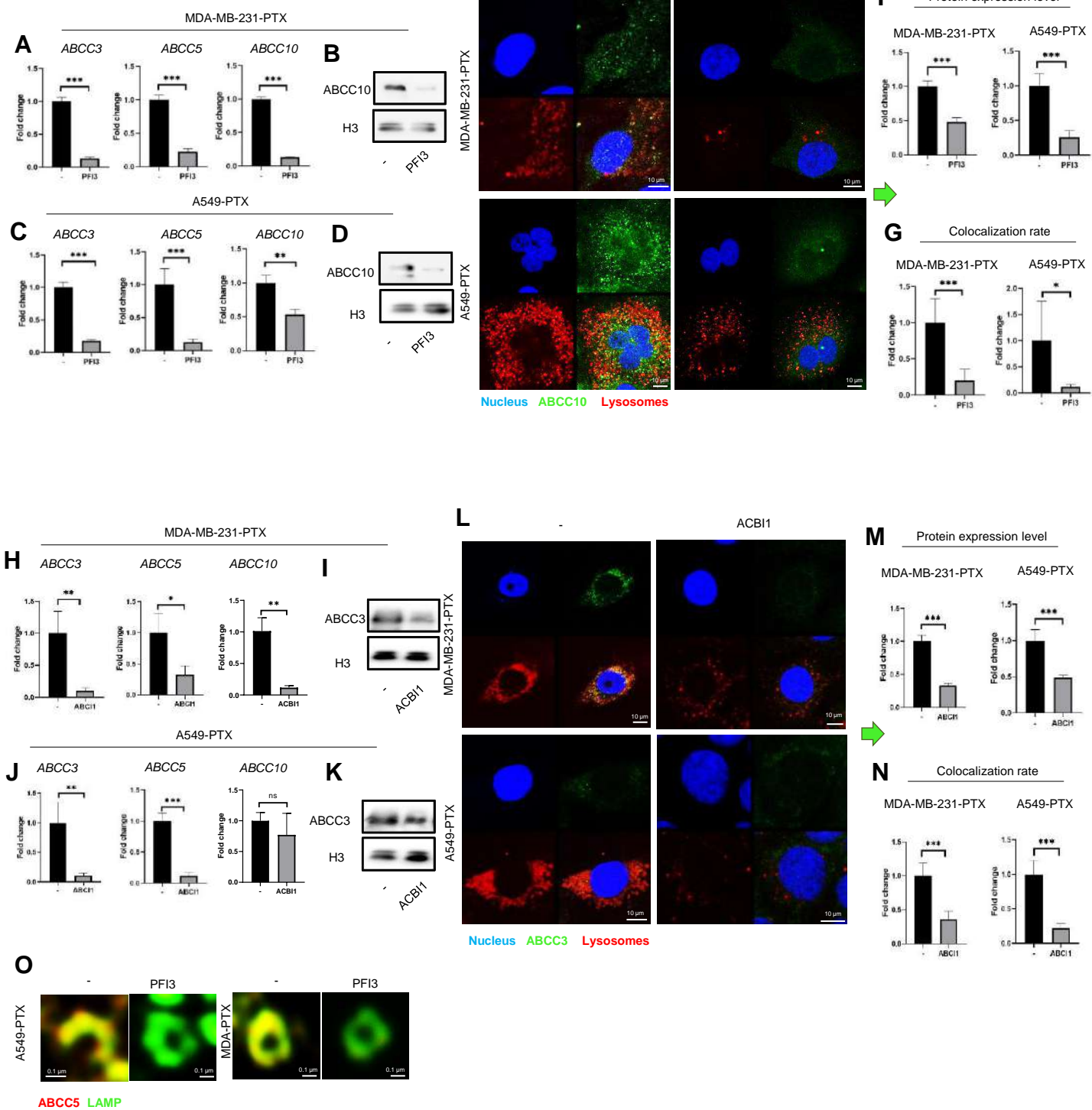
GO: BRG1 *de novo* occurrence in pacli-resistant

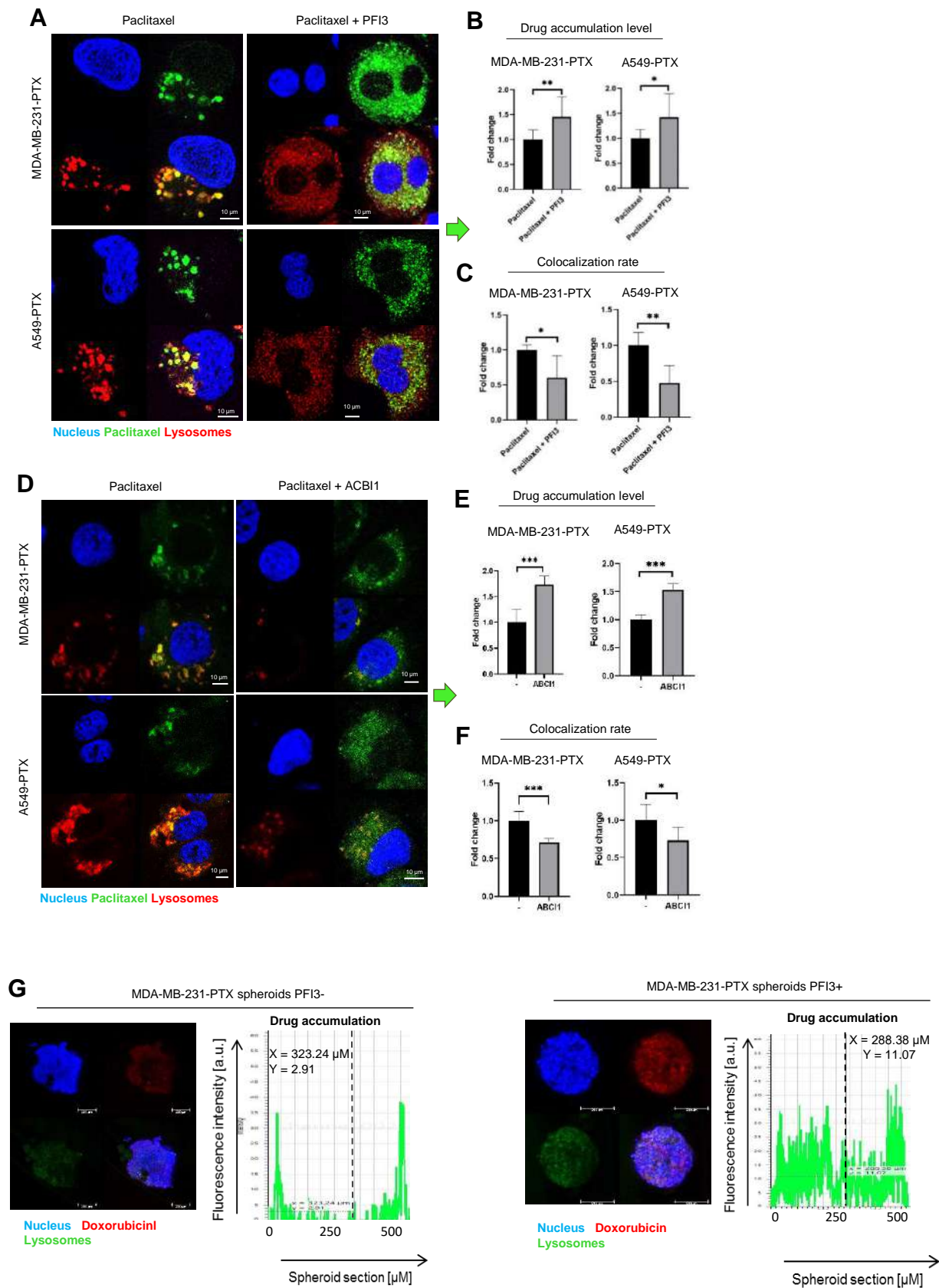


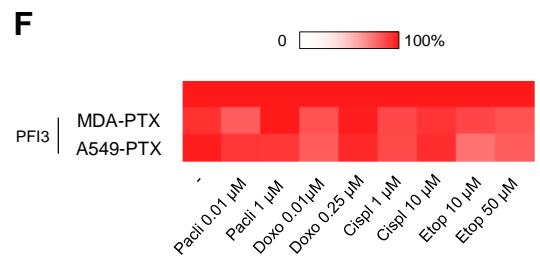
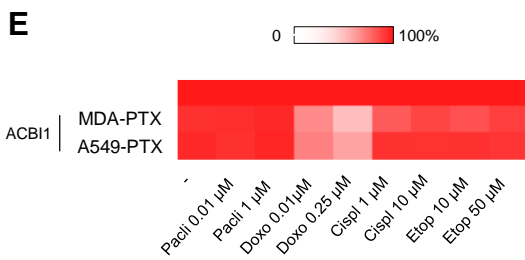
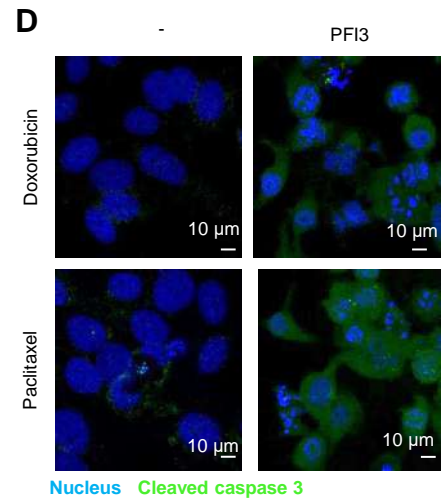
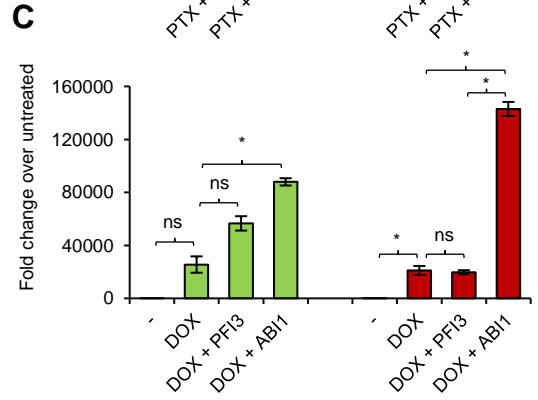
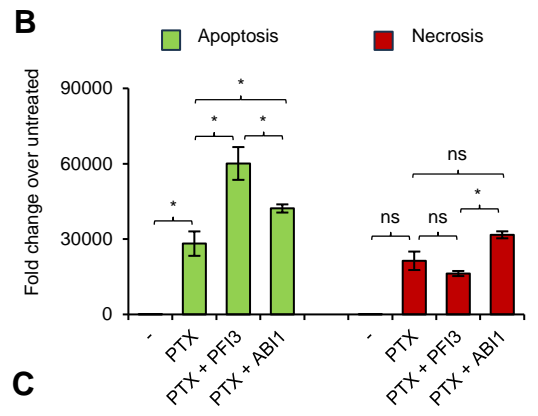
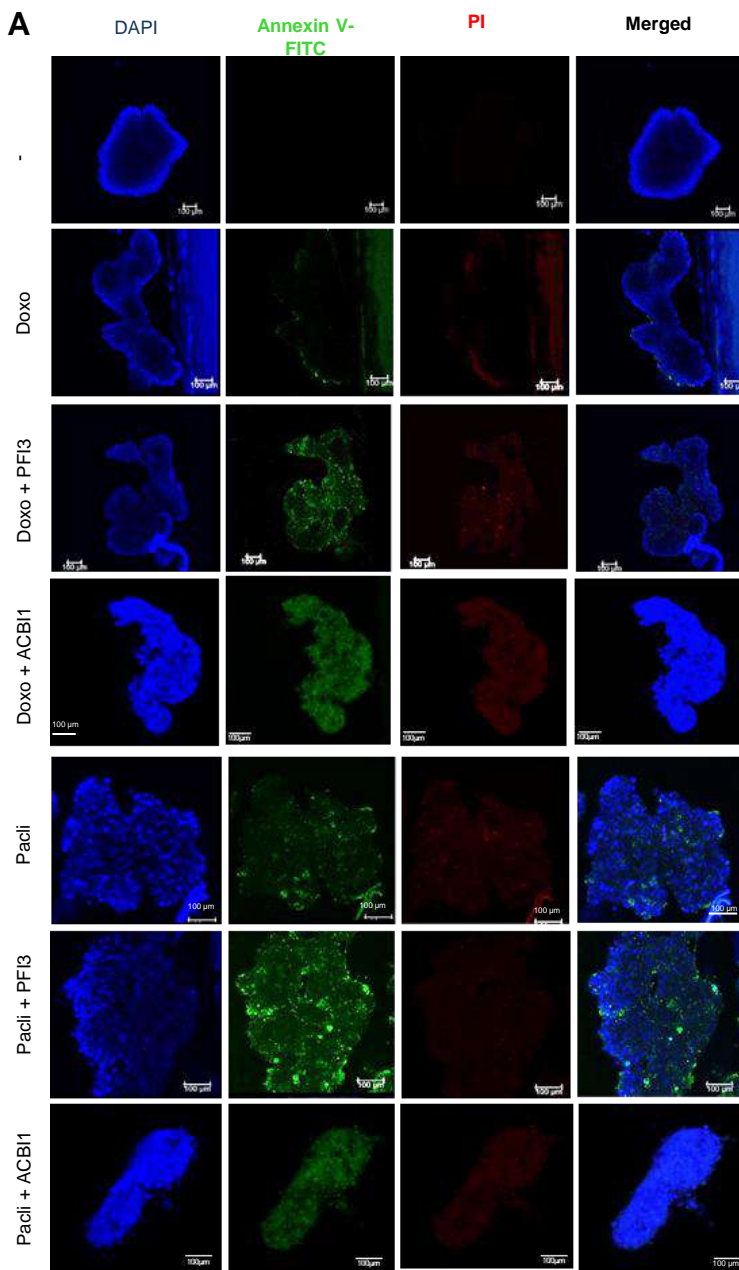
I











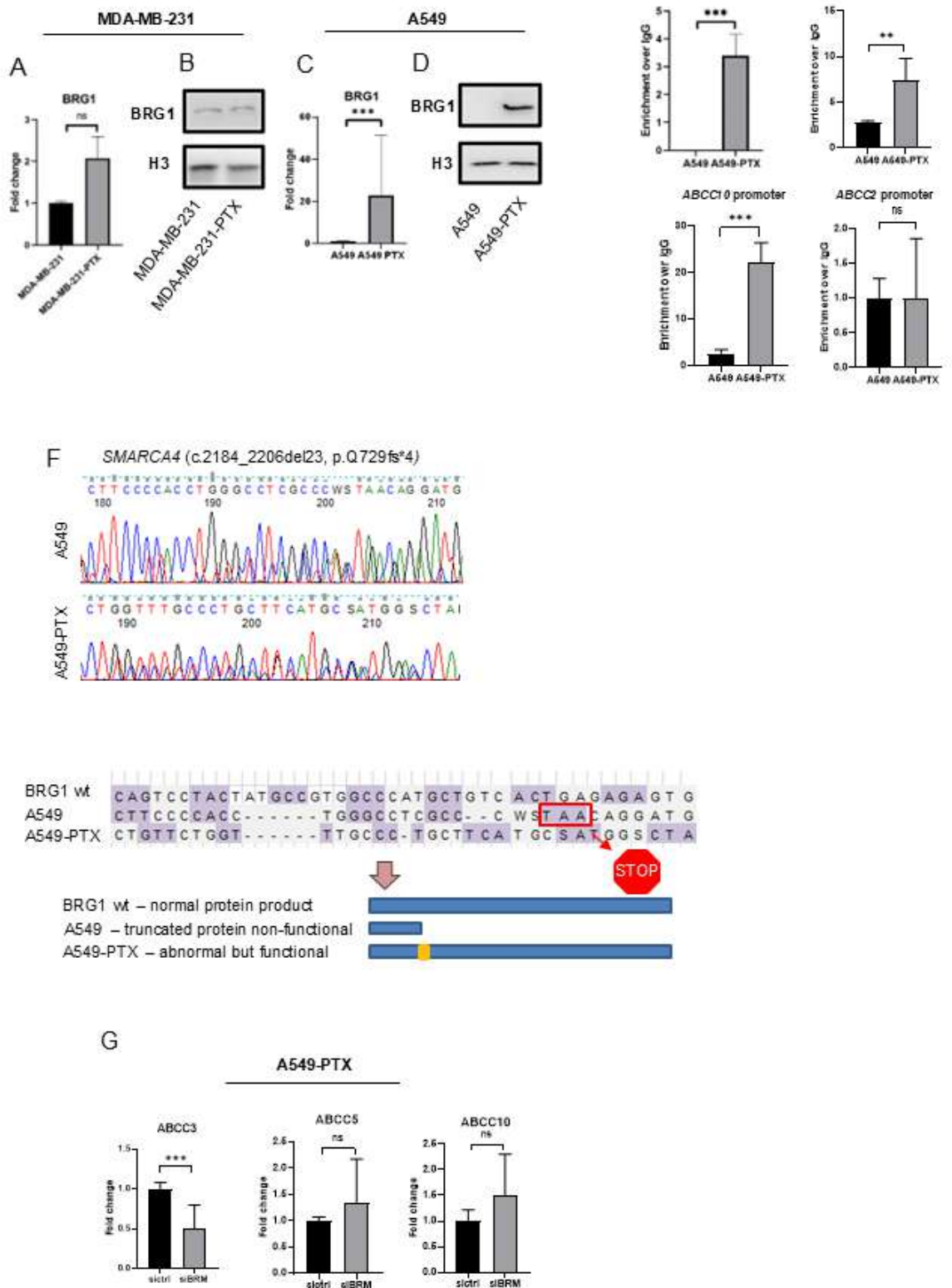


Figure S1 Paclitaxel-induced changes in the nucleotide sequence of *SMARCA4* led to reversal mutation that restored expression of functional BRG1 in paclitaxel-resistant A549 cells (A, C) mRNA level of BRG1 was compared in non-resistant and ptx-resistant MDA-MB-231 (A) and A549 (C) cell lines by real-time PCR. Transcription level was normalized first to housekeeping genes (*ACTB*, *GAPDH* and *HPRT1*) and, then, mRNA level in basal cell lines was assumed as 1. The difference between two means was tested with Student's t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$ *, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$. (B, D) Protein level of BRG1 was compared in lysates of non-resistant and ptx-resistant MDA-MB-231 (B) and A549 (D) cells by western blot. Histone H3 was used as a loading control. (E) Recruitment of BRG1 to the promoters of *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCC5* and *ABCC10* in two A549 phenotypes was monitored by ChIP-qPCR. Raw IP values were normalized first to input, then to the corresponding IgG controls. The difference between two means was tested with Student's t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$ *, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$ (F) Sanger sequencing results presented in Finch TV and aligned in MEGA11. (G) mRNA level of ABC transporters was compared between control and BRM-deficient samples by real-time PCR. Transcription level was normalized first to housekeeping genes (*ACTB*, *GAPDH* and *HPRT1*) and, then, mRNA level of control was assumed as 1. The difference between two means was tested with Student's t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$ * and ** when $p < 0.01$.

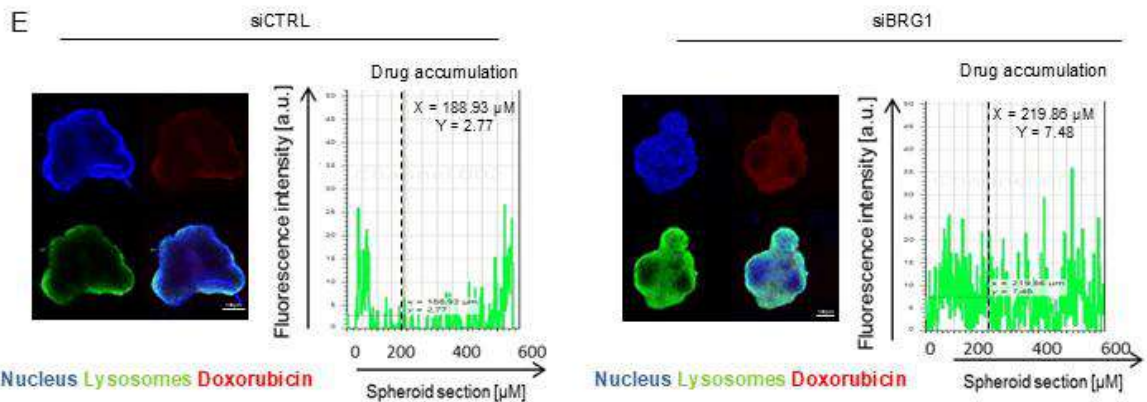
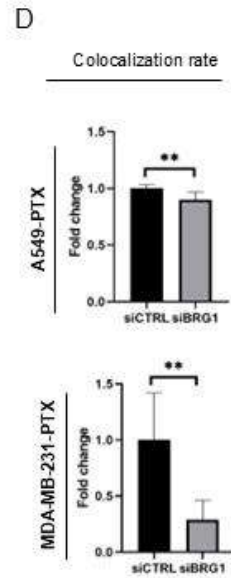
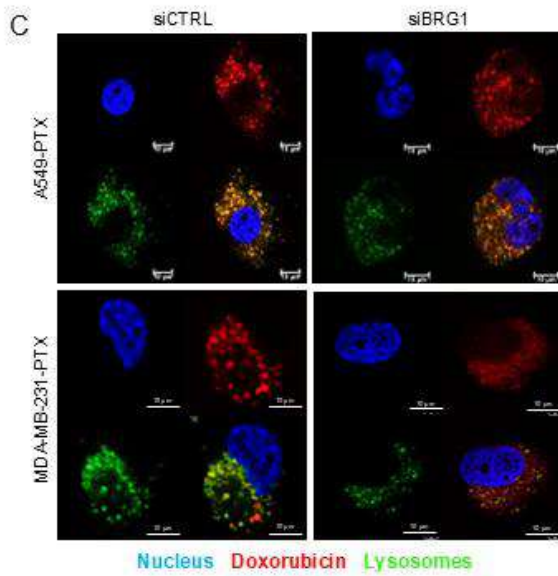
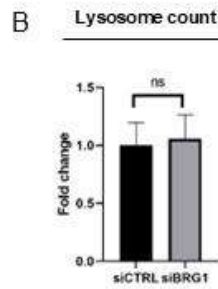
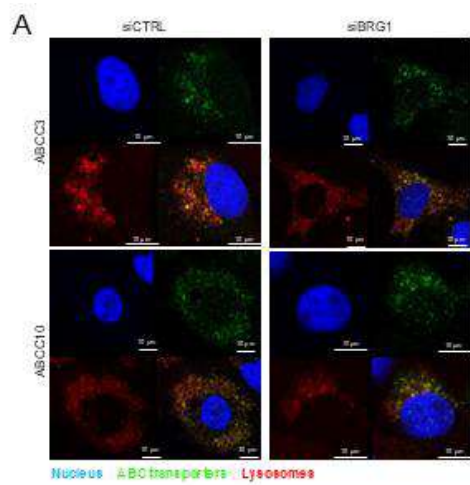


Figure S2 BRG1 drives overexpression of ABC-transporters, which are enriched in lysosomes of PTX-resistant cell lines and crucial for reduced drug cytotoxicity due to drug sequestration in these organelles (A) ABC transporter expression and localization 72 h after cell transfection with siCTRL and siBRG1 were visualized by immunocytochemistry followed by confocal microscopy. Green fluorescence derived from Alexafluor488-conjugated secondary antibody corresponds to ABC transporters appearance in cells. DNA was stained with DAPI (blue). Lysosomes were stained with LysoTracker (red). (B) Lysosome count was compared between control cells and transiently silenced BRG1. The fluorescence intensity of lysosomal marker LysoTracker Deep Red was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student's t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$ (C) BRG1 causes lysosomal sequestration of doxorubicin in paclitaxel-resistant cancer cell lines. Colocalization of doxorubicin and lysosomes was compared between BRG1 proficient and deficient cells. Autofluorescent doxorubicin is marked in red, lysosomes in green (LysoTracker Deep Red), DNA in blue (DAPI). The fluorescence intensity and colocalization of doxorubicin (D) and Paclitaxel Oregon Green (D) was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student's t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$. (E) Doxorubicin accumulation in lysosomes of paclitaxel-resistant cells requires BRG1. Cells were grown for 3-weeks in 3D cultures. Control and BRG1 silenced paclitaxel-resistant A549 cell line spheroids were scanned for intracellular doxorubicin distribution. The autofluorescent drug is marked in red, DNA stained DAPI is blue, LysoTracker Deep Red stained lysosomes are green. The fluorescence intensity plot at spheroid cross section was created in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X.

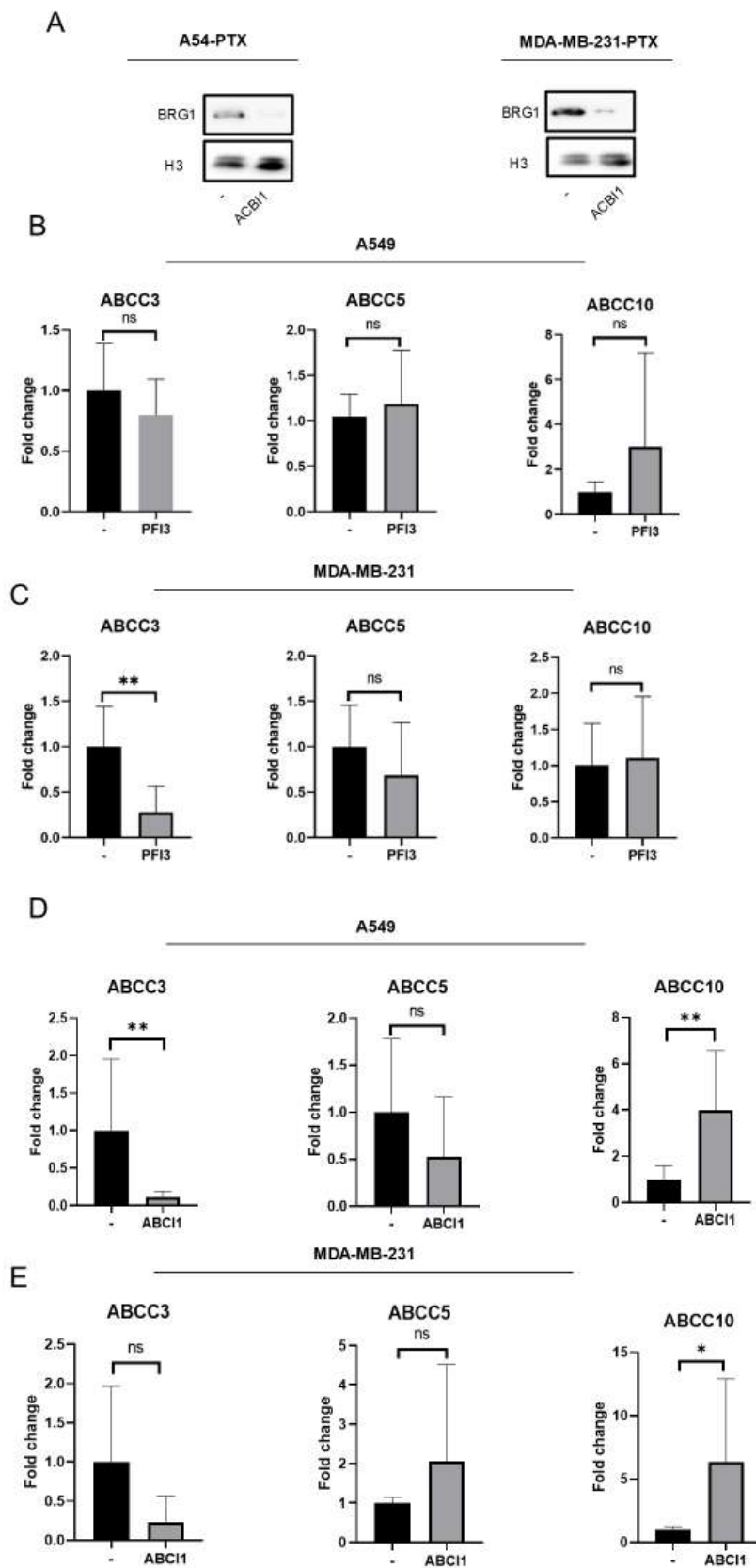


Figure S3 SWI/SNF-targeting with PFI-3 and ACB11 does not substantially reduces expression of ABCC5 and ABCC10 in A549 and MDA-MB-231 cells (A)Western Blot representation of BRG1 degradation after ACB11 treatment. H3 was used as a loading control. (B-E) The impact of SWI/SNF inhibitor – PFI3 (B,C) and SWI/SNF subunits degrader-ACB11(D,E) on mRNA level of ABCC3, ABCC5 and ABCC10 was studied by real-time PCR. Cells were exposed to PFI3 at the concentration of 2.5 μ M for 72h. Transcription level was normalized first to housekeeping genes (ACTB, GAPDH and HPRT1) and for control sample was assumed as 1. The difference between two means was tested with Student's t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$ *, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$.

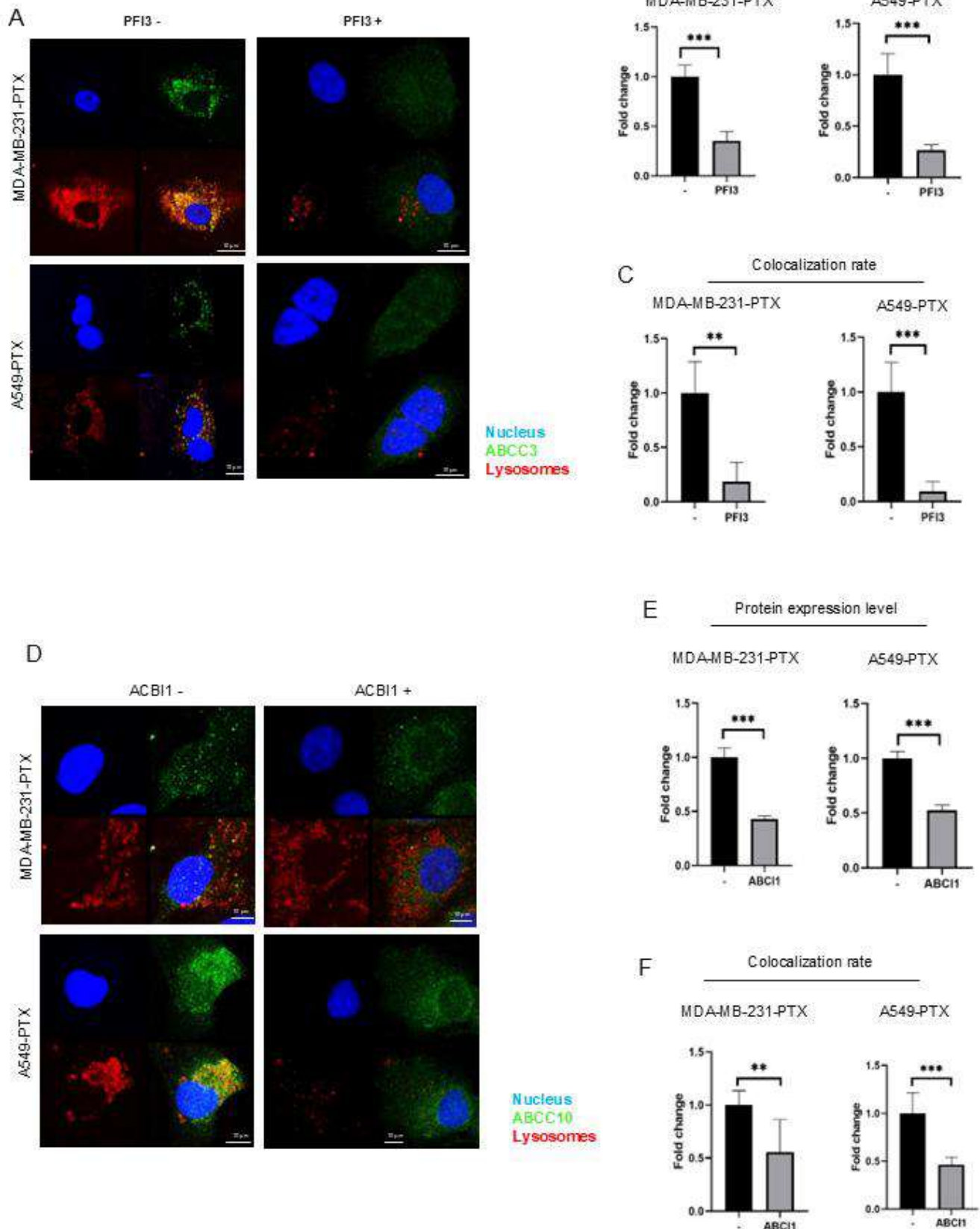


Figure S4 SWI/SNF-targeting with PFI-3 and ACB11 reduces expression of ABCC transporters overrepresented in lysosomes of paclitaxel-resistant cells (A, D) ABC transporters expression and localization was visualized by immunocytochemistry followed by confocal microscopy in non-treated vs PFI3 (A) and ACB11 (D)-treated cells. Green fluorescence of Alexafluor488-conjugated secondary antibody represents ABCC transporters, blue fluorescence of DAPI - DNA, whereas lysosomal red fluorescence is from LysoTracker Deep Red. The fluorescence intensity (B, E) and colocalization (C, F) was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student's t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$.

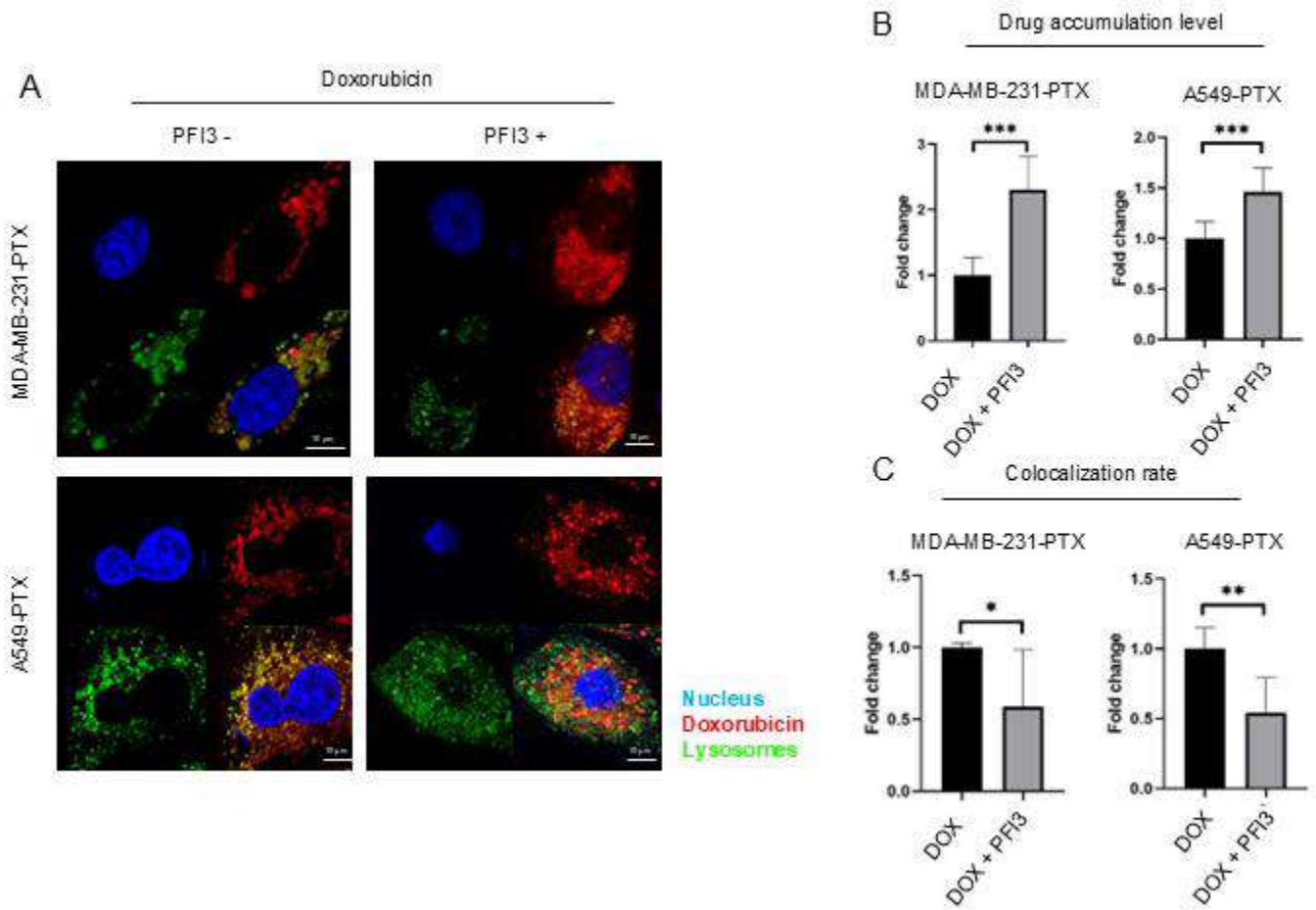


Figure S5 Inhibition of SW/SNF with PFI-3 decreases doxorubicin lysosomal uptake (A-C) PFI3 uncouples doxorubicin accumulation in lysosomes of paclitaxel-resistant cells. (A) Intracellular localization of doxorubicin was analysed by confocal imaging in PFI3 treated (2.5 μ M, 72h) and untreated cells. The autofluorescent drug is marked in red, DNA in blue (DAPI) and lysosomes in green (LysoTracker Deep Red). The fluorescence intensity of paclitaxel Oregon Green (B) and colocalization between the drug and lysosomes (C) was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student's t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$

HIF1A, BRG1, and p300 interaction confers paclitaxel-induced drug resistance by enabling the overexpression of ABCC genes

Karolina Gronkowska,^{1,2} Kinga Kołacz-Milewska,^{1,2} Sylwia Michlewska,³ Tomasz Płoszaj,⁴ Maciej Borowiec,⁴ and Agnieszka Robaszkiewicz¹

¹Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland; ²Bio-Med-Chem Doctoral School of the University of Lodz and Lodz Institutes of the Polish Academy of Sciences, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland; ³Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland; ⁴Department of Clinical Genetics, Medical University of Lodz, Pomorska 251, 92-213 Lodz, Poland

The development of resistance to paclitaxel (PTX), which is a vital anticancer drug treating breast and lung cancers, can cause treatment failure and limit further use of taxanes and similar drugs. As previously documented, PTX-induced irresponsiveness to chemotherapy involves the overexpression of ABCC3, ABCC5, and ABCC10 members of the ATP-binding cassette (ABC) transmembrane proteins, which are enriched in the lysosomes of drug-resistant cells where anticancer drugs are actively trapped. In this paper, the role of HIF1A in a BRG1-p300-dependent overexpression of 3 ABCC genes in drug resistant cells was examined. Although motive spacing analysis of BRG1 enriched regions indicated that HIF1A, ISL1, MAF, and ZNF76 could be possible BRG1 co-regulators, *bona fide* co-operation with BRG1 and the contribution to drug resistance was only confirmed for HIF1A. HIF1A deficiency abolished the transcription promoting effect of BRG1 and p300, thereby suggesting that this protein acts as the master regulator of ABCC transcription. Analysis of The Cancer Genome Atlas (TCGA) and The Genotype-Tissue Expression (GTEx) databases confirmed a likely role of HIF1A-BRG1-p300 overexpression in the taxanes resistance of cancer patients and the possible biomarker function of this protein in cancer responses to chemotherapy. Therefore, the complex comprising BRG1-EP300-HIF1A can be considered for further clinical investigation and planning for patient therapy.

INTRODUCTION

Paclitaxel (PTX) is a vital anticancer medication to treat breast and lung cancers, which are of high incidence, with as many as 2.48 million and 2.29 million new cases, respectively. It is also used for treatment of ovarian and pancreatic cancers.¹ The mechanisms of the anticancer action of PTX include the stabilization of microtubules and subsequent cell arrest, inhibition of the TLR4 signaling pathway followed by an upregulation of pro-apoptotic BAX/BAK and the downregulation of anti-apoptotic Bcl-2 proteins and activa-

tion of endoplasmic reticulum stress leading to apoptotic cell death.² Even though PTX is one of the most effective and frequently used drugs for the treatment of different tumors, its efficiency is limited due to the development of cancer cell resistance. The major mechanisms that mediate PTX resistance include altered apoptotic pathways, changes in drug transporter expression, increased drug metabolism, alteration in the tubulin dynamics, mutations in the β -tubulin gene, as well as cell cycle changes (particularly in the late G2/M phase).³⁻⁵

PTX-induced alteration in the profile of drug transporter expression comprises *inter alia* the overexpression and intracellular redistribution of the ATP-binding cassette (ABC) proteins that use energy from the hydrolysis of ATP to actively translocate substances across cell membranes. The surface of resistant cancer cells is characterized by a high abundance of ABC transporters pumping PTX out of the cell to develop chemotherapeutic resistance⁶ which is linked to the overexpression of ABCB1,⁷⁻¹² ABCC3,^{12,13} ABCC5,¹⁴ and ABCC10.⁸ In our recent paper, we documented the enrichment of ABCC3, ABCC5, and ABCC10 in the lysosomes of PTX-resistant cells, complementing the overexpression of these proteins and facilitating drug sequestration inside the organelles, thereby limiting cancer cell vulnerability to chemotherapeutics.¹⁵ Increased transcription of these 3 transporters results from the BRG1 redistribution in the genome (a *de novo* occurrence at the promoters of genes functionally linked to the endo-lysosomal system and ABCC transporters) and its stronger co-occurrence with p300¹⁶ acetyltransferase. This enzyme

Received 26 February 2025; accepted 2 September 2025;
<https://doi.org/10.1016/j.omton.2025.201049>

Correspondence: Karolina Gronkowska, Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland.

E-mail: karolina.gronkowska@edu.uni.lodz.pl

Correspondence: Agnieszka Robaszkiewicz, Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland.

E-mail: agnieszka.robaszkiewicz@biol.uni.lodz.pl



promotes transcriptional activity by acting as a “bridge” linking the DNA-bound transcription factors to basal transcription machinery through direct interactions with the general transcription factors TFIID, TFIIB, and RNA polymerase II, thus promoting pre-initiation complex (PIC) assembly. This enzyme also acetylates histones through the histone acetyltransferase domain leading to chromatin remodeling and the relaxation of the chromatin structure to enable transcription.¹⁷ BRG1, an active subunit of the SWI/SNF chromatin-remodeling complex, enables the p300-dependent transcription of genes from their E2F/CpG-driven promoters. In dividing cells, BRG1 directly activates gene transcription by evicting p300-modified nucleosomes from the promoters.¹⁸ The direct role of BRG1 in the transcriptional co-activation of some ABC transporters in breast cancer cells,¹⁹ hepatocellular carcinoma,²⁰ as well as in PTX-resistant breast and lung cancer cells¹⁶ were reported. Pharmacological inhibition or the transient silencing of this enzyme increased the cytoplasmic and nuclear concentrations of drugs, thereby restoring the chemosensitivity of drug-resistant cells. Similarly, p300 targeting with small molecular inhibitors phenocopied BRG1 deficiency and repressed the ABCC genes that confer multi-drug resistance in breast, lung, and liver cancer cells²¹ and also in PTX-resistant phenotypes. However, the mechanistic aspects of BRG1 and p300-driven overexpression of ABCC genes have not been explained and there has been no identification of the molecular factor responsible for their recruitment to the gene promoters in the PTX-resistant cell. Although co-activators mediate transcription factor function, they lack the DNA-binding capacity to a specific motif. How they engage target loci remains a question.²² Both enzymes are characterized by the bromodomain in their structure that allows to read nucleosome acetylation, thereby enabling their interaction with transcriptionally permissive chromatin regions. However, recent reports document that p300-chromatin binding requires multiple transcription factor (TF)-interaction domains that would need cooperation with specific transcription factors to target gene promoters. These transcription factors remain unknown for the 3 ABCC genes. A recent study utilizing systematic evolution of ligands by exponential enrichment sequencing (SELEX-seq), nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, and molecular modeling, disclosed the role of the AT-hook, linker, and bromodomain of BRG1 in selective binding to DNA. The arginines (Arg1443 and Arg1445) of the AT-hook interacted with an AT-rich minor groove, whereas the tyrosines (Thr1459, Tyr1498, and Tyr1519) of the bromodomain bound to a major groove of the SELEX-DNA consensus sequence: 5⁰-CCTCAATTAATCTC-3⁰.²³ However, in cells, BRG1 was found at the GC-rich motifs for E2F transcription factors together with p300; therefore, as previously postulated, context-dependent association of BRG1 with gene promoters override the preference of the enzyme to AT-rich DNA fragments.

Previous studies on the regulation of ABC gene transcription described some transcription factors and linked their role in ABC transcription control to PTX-induced drug resistance. For example, FOXM1 was shown to regulate transcription of *ABCC5* in PTX-resistant nasopharyngeal carcinoma cells¹⁴ and

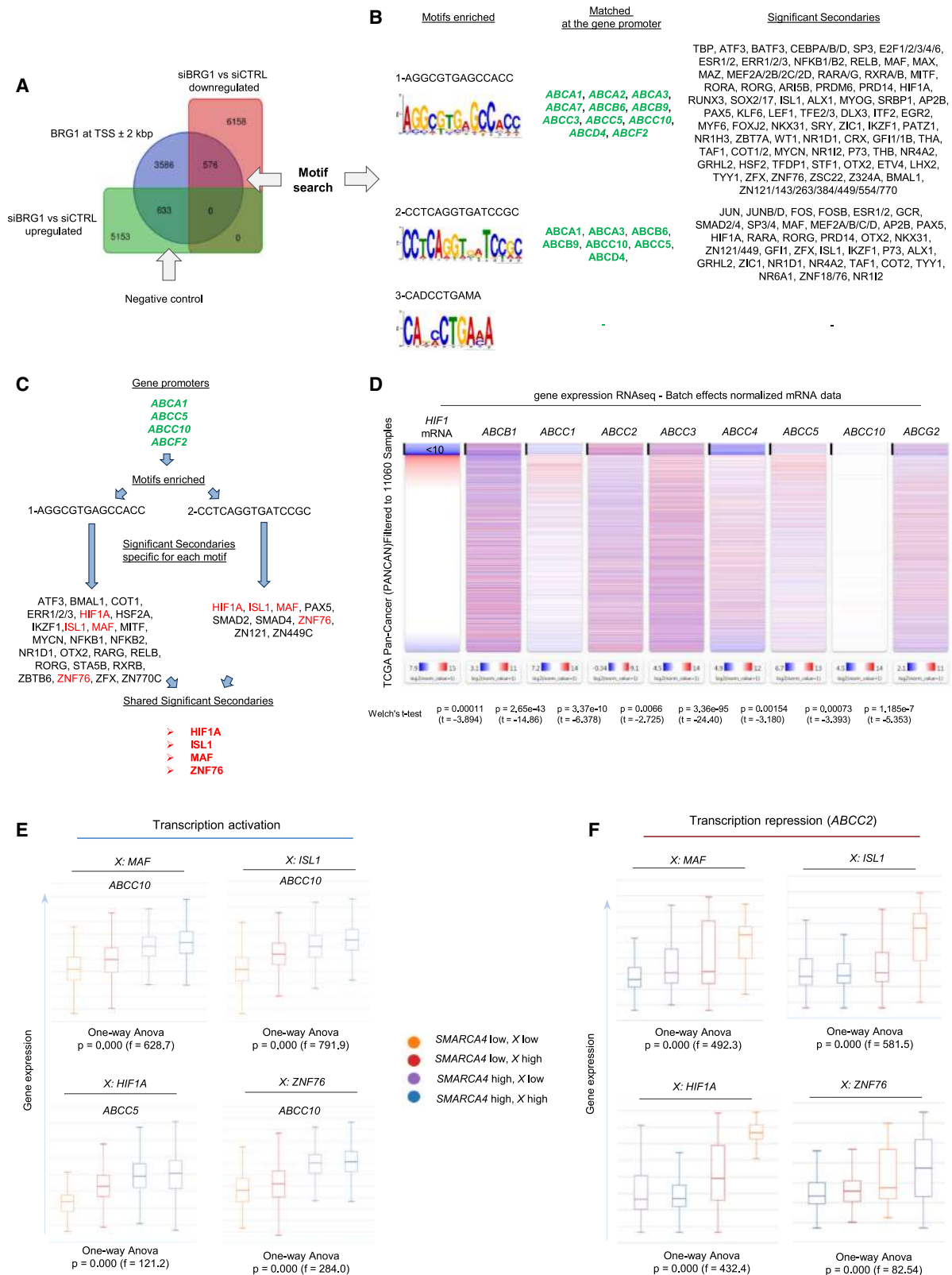
PTX-resistant cervical cancer cells²⁴ as well as *ABCA2* in PTX-treated pancreatic cancer cell lines.²⁵ Homeobox B4 (HOXB4) was involved in the regulation of *ABCB1*, *ABCC1*, and *ABCG2* expression in PTX- and cisplatin-resistant ovarian cancer cells²⁶; SOX2 in the activation of *ABCC1* transcription in melanoma cells²⁷; and *ABCG2* in breast cancer stem cells (CSCs),²⁸ with none of these transcription factors mechanistically associated with BRG1- or p300-dependent chromatin remodeling at the promoters of key ABC genes.

To gain more complete insight to the transcription control of *ABCC3*, *ABCC5*, and *ABCC10*, which share their overexpression dependence on BRG1 and p300, previously published NGS data from BRG1 chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) experiments and bioinformatic analysis was used to identify the possible co-regulators of BRG1 and p300 at the well-defined gene promoters described in Gronkowska et al.¹⁵ Emerging candidates were validated firstly for their co-activatory role in BRG1-p300-dependent transcription of the 3 ABCC genes, then by the confirmed contribution of the identified transcription co-activator in lysosomal drug sequestration and cell resistance to standard chemotherapy drugs in PTX-resistant phenotypes. Moreover, based on the data deposited in TCGA and GTEx databases, the predictive aspects of the identified regulatory unit for cancer patient survival and treatment outcomes were concluded.

RESULTS

Two motifs emerge at the promoters of genes transcriptionally co-activated by BRG1

Motifs were identified in the search for the possible co-factors of BRG1 that direct the enzyme to certain promoters and enabled or enhanced the BRG1-dependent gene transcription in PTX-resistant MDA-MB-231. These were enriched among BRG1 peaks occurring at the gene promoters that were positively controlled by this enzyme. For this purpose, the use of the differential gene expression analysis of RNA sequencing (RNA-seq) data was made, where mRNA profiles of cells proficient (siCTRL) and deficient (siBRG1) in BRG1 were compared and the ChIP-seq data indicated the BRG1 enrichment at the gene promoters (Figure 1A). From these 2 datasets we chose sequences of BRG1 peaks at the promoters of genes that were downregulated after silencing of the enzyme as templates for motif search, whereas the sequences of BRG1 peaks at the promoters of genes upregulated after silencing of the enzyme served as a control. Analysis of motif enrichment in XSTREME provided 3 motifs, sequenced between 10 and 15 nucleotides in length (Figure 1B). The first motif 5⁰-AGGCGTGAGC CACC-3⁰ matched 11 promoters and the second motif 5⁰-AGGCG TGAGCCACC-3⁰, matched 7 promoters of ABC genes, highly expressed in non-resistant and PTX-resistant MDA-MB-231 or considerably overexpressed as a consequence of cell adaptation to PTX. These 2 motifs were also found at the promoters of *ABCC3*, *ABCC5*, and *ABCC10*, and were functionally linked to lysosomal drug sequestration. The third motif 5⁰-CADCCTGAMA-3⁰ did not match any of ABC promoters with false discovery rate(q) < 0.01. Therefore, the first 2 motifs emerged as adequate candidates for use for a further search



(legend on next page)

for BRG1 co-factors or proteins forming gene regulatory complexes with BRG1. The search of similarities in the 2 considered motifs and the known transcription factor binding motifs, resulted in a relatively short list of transcription factors without any proteins in common, but included *inter alia* T-cell transcription factor EB (TFEB) acting as master regulator of lysosome biogenesis. A more comprehensive list of possible BRG1 co-regulators was generated during motif spacing analysis. Some of the emerged transcription factors have been reported as physically and functionally interacting partners of BRG1 at the gene promoters. To tighten the list of significant secondaries, motif spacing analysis was limited to promoters of ABC genes which were upregulated in PTX-resistant MDA-MB-231 (Figure 1C). This approach led to the identification of motif specific and shared transcription factors that were represented by HIF1A, ISL1, MAF, and ZNF76. According to recent literature,^{29–37} these proteins play a role in the drug resistance of various cancer types. In the search for any preliminary evidence on the functional impact of these 4 factors on ABC gene transcription we made use of TCGA Pan-Cancer (PANCAN) dataset and searched for correlation between the mRNA level of *HIF1A*, *ISL1*, *MAF* or *ZNF76*, and ABC genes (Figures 1D, S1A, and S1B). A low level of *MAF* transcription correlated strongly with the low transcription of *ABCB1*, *ABCC2*, and *ABCG2* but with high levels of *ABCC1* and *ABCC10* mRNA (Figure S1A). A similar profile of interdependence was observed for *ZNF76*, the low transcription of which was associated with low mRNA levels of *ABCB1*, *ABCC4*, *ABCG2*, and *ABCC10*, but increased transcription of *ABCC1* and *ABCC5* (Figure S1A). These 2 transcription factors correlated with ABC transcription inversely to BRG1. In contrast, low *HIF1A* or *ISL1* alone, was followed by high expression of *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCC4*, and *ABCG2* and low expression of *ABCC1*, *ABCC5*, and *ABCC10* (Figures 1D and S2).

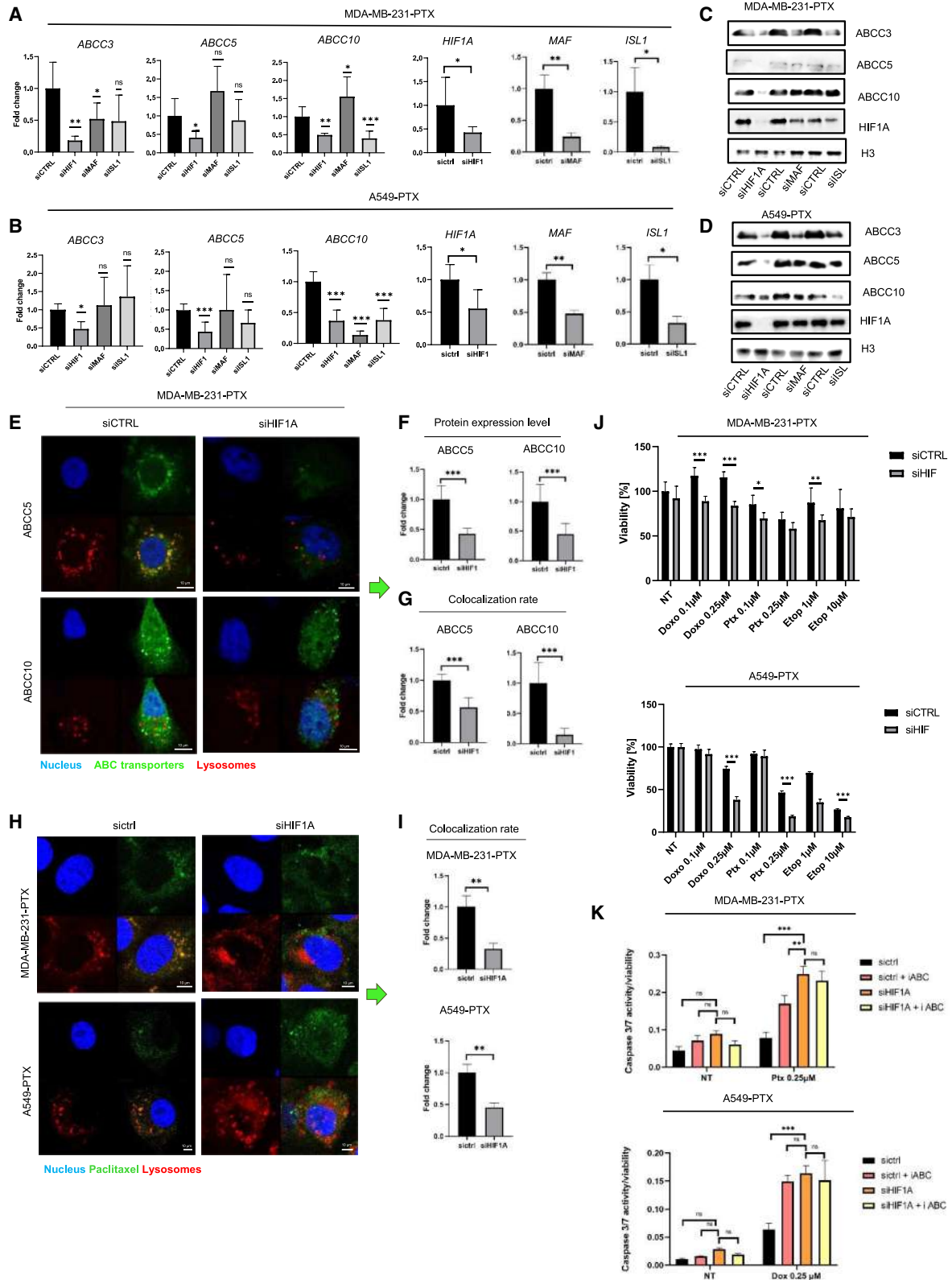
To determine the mutual interdependence between the transcription of the 4 transcription factors and *SMARCA4* and ABC genes, the mRNA level was further subdivided into 4 groups according to the transcription factor and BRG1 expression (Figures 1E, 1F, S3, and S4). As a readout, downregulated genes in the *SMARCA4* low samples (*ABCC1*, *ABCC5*, and *ABCC10*) and upregulated (*ABCC2*) in the *SMARCA4* low samples were taken. A possible impact of

BRG1 on their expression was named as transcription co-activation and transcription co-repression respectively, while it was assumed that BRG1 directly controlled their transcription, based on results from the cell lines (Figures 1E, 1F, S3, and S4). In most cases, *SMARCA4* low/TF low samples were characterized by a low mRNA level of genes where BRG1 likely acted as co-activator of their transcription. A higher abundance of BRG1 or transcription factor was usually followed by a higher mRNA level of *ABCC1*, *ABCC5*, and *ABCC10* (with single exceptions) and their joint impact on gene transcription was additive (Figure 1E). However, at the BRG1-repressed genes the transcription of *HIF1A*, *MAF*, and *ISL1*, (but not *ZNF96*), was associated with strongly enhanced *ABCC2* expression in the absence of BRG1 (Figure 1F). Based on a very narrow window of *SMARCA4* low versus moderate and high transcription, it can be concluded that all 4 considered transcription factors could contribute to the regulation of BRG1-dependent gene transcription, but the molecular mechanism requires further investigation. Since the mRNA level similarly correlates with the mRNA of the exemplary ABC genes depending on *SMARCA4* expression, it seems unlikely that these 4 proteins simultaneously and directly bound promoters and regulated ABC gene transcription, so another factor that links all 4 proteins should be considered as the BRG1 partner. The expression of *HIF1A*, *MAF*, *ISL1*, and *ZNF96* is linked to the expression of ABC transporters; therefore, these transcription factors should be taken into consideration as possible modulators of multidrug resistance.

In summary, motif spacing analysis of the 2 identified BRG1-enriched sequences provided us with 4 transcription factors, which may serve as a starting point for the molecular explanation of BRG1-dependent overexpression of ABC genes in PTX-resistant cells. The subgrouping transcription factor expression (with respect to the *SMARCA4* level), had an apparent possible interconnection that emerged in the transcription co-activation of *ABCC5* and *ABCC10*. This was even more evident for genes that were likely co-repressed by BRG1 and transcription factors where the low expression of *SMARCA4* and TFs was associated with an elevated expression of the exemplary *ABCC2*.

Figure 1. MAF, ZNF76, HIF1A, and ISL1 emerge as possible transcription co-activators of BRG1-dependent ABC genes in human cancers

(A) Venn diagram schematic representation of BRG1 peaks at the gene promoters, which were taken for the search of BRG1-specific motifs. BRG1-enriched gene promoters (TSS ± 2 kbp) were plotted against genes considerably activated and downregulated by BRG1 ($1 < \log_2 FC < 1$; CuffDiff on RNA-seq data derived from BRG1 proficient – siCTRL and deficient – siBRG1 MDA-MB-231-PTX; as in Figure 2F and Table S2). BRG1 peaks at the promoters of genes transcriptionally co-activated by this enzyme served as input, whereas BRG1 peaks at the promoters of genes suppressed by BRG1 served as negative control. (B) Two BRG1-bound motifs occur at the promoters of transcriptionally active ABC genes in PTX-resistant MDA-MB-231 cells. BRG1-enriched motifs were searched in XSTREME for the subset of BRG1 peaks described in (A) as input and control sequences, which were extracted from hg19 using bedtools getfasta. HOCOMOCO Human (v11 core) was selected as input motifs. The three STREME motifs (1–3) were taken for further analysis. The occurrence of identified STREME motifs at the promoters of considered ABC genes was checked in FIMO, but only gene promoters with $q < 0.01$ are listed. Third STREME motif did not match to any ABC gene promoter at $q < 0.01$. The list of secondary known HOCOMOCO Human (v11 core) motifs for transcription factors with significantly enriched spacings (Significant Secondaries), which may indicate formation of protein complexes with BRG1, were generated in SpaMo. (C) Motif spacing analysis described in (B) limited to promoters of ABC genes, which respond to BRG1 silencing. Bolded gene IDs indicate transcription factors that are common for both STREME motifs. (D) Exemplary correlation between mRNA level of HIF1A and some ABC genes in human cancers. Pan-Cancer (PANCAN) dataset was used to compute the mRNA level of selected ABC genes with respect to HIF1A transcription yield in Xena Functional Genomics Explorer. (E and F) *ISL1*, *MAF*, *ZNF76*, and *HIF1* may co-regulate transcription of exemplary *ABCC* genes with BRG1. (E) Low mRNA levels of *SMARCA4* and considered transcription factors (X) correlate with low transcription of *ABCC5* and *ABCC10* genes, thereby suggesting the co-activating role of BRG1 and Xs. On the contrary, in (F), low mRNA levels of *SMARCA4* and Xs correlate with high transcription of *ABCC2*, thereby indicating co-repressing mode of functional interdependence between BRG1 and Xs.



(legend on next page)

HIF1A co-regulates BRG1-dependent overexpression of ABC genes, which contribute to lysosomal drug sequestration in PTX-resistant cell lines

To identify a *bona fide* BRG1 co-regulator responsible for the overexpression of the BRG1-dependent ABCC transporters that were associated with the occurrence of PTX resistance, shared transcription factors from Figure 1C were transiently silenced. The measurement of mRNA and protein levels were set by real-time PCR and western blot, respectively, as an initial readout of the transcriptional activity of the transcription factors. Only the silencing of HIF1A substantially downregulated the transcription of *ABCC3*, *ABCC5*, and *ABCC10* (Figures 2A and 2B) in PTX-resistant cells, while showing a lack of action on basal cells (Figures S5A and S5B). These data are consistent with the TCGA PANCAN dataset analysis where low HIF1 transcription was accompanied by low expression of *inter alia* *ABCC5* and *ABCC10* (Figure 1D). The impact of HIF1A on the protein level was also confirmed by western blot, where the decline in *ABCC3* and *ABCC10* proteins were observed in HIF1A-deficient cells to the highest extent (Figures 2C and 2D). The immunostaining of *ABCC5* and *ABCC10* and their confocal imaging allowed the visualization of their substantial loss in HIF1A-silenced cells and their withdrawal from lysosomes where their co-localization with lysosome markers significantly decreased (Figures 2E–2G and S6A–S6C). To check the functional impact of HIF1A-dependent expression of the ABC transporters that are enriched in lysosomes of PTX-resistant cells, we compared the colocalization of PTX Oregon Green (Figure 2H) and doxorubicin (Figure S6D) with lysosomes in HIF1A-proficient and -deficient cells using confocal microscopy. HIF1A deficiency substantially declined the drug's accumulation in lysosomes, as shown by quantification of drug colocalization with lysosomal probe, LysoTracker (Figures 2I and S6E). This led us to the hypothesis that HIF1A may affect the cell response to chemotherapeutics and cause chemoresistance mediated by lysosomes. To test such an option, we compared the viability of cells that differed in HIF1A level and were exposed to chemotherapeutics. HIF1A depletion sensitized cells of both lines to doxorubicin, PTX, and etoposide

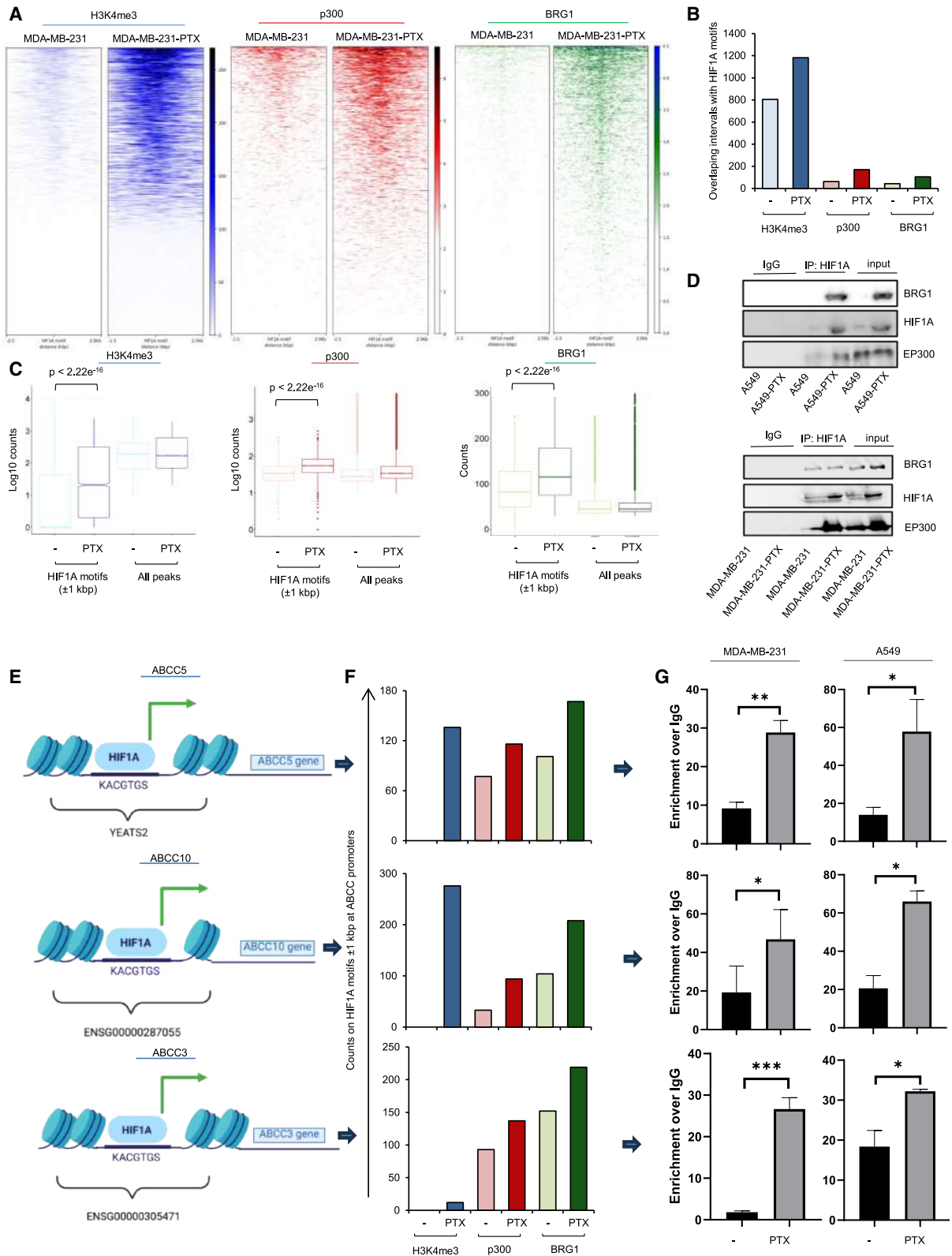
(Figure 2J). This finding suggests that targeting of HIF1A sensitizes PTX-resistant cancer cells to some chemotherapeutics. Bearing in mind that lysosomes protected resistant phenotypes from doxorubicin and PTX as shown in our previous study¹⁵ and that *ABCC3*, *ABCC5*, and *ABCC10* contributed to their sequestration inside lysosomes, we can conclude that HIF1A-dependent overexpression of the three transporters are crucial for lysosome-mediated resistance of cells to drugs, which are actively transported to these organelles by ABCC proteins.

To confirm that increased toxicity of PTX in HIF1A-silenced cells is caused mostly by downregulation of ABC transporter expression, we compared caspase 3/7 activity among the following samples: siCtrl, siCtrl + iABC, siHIF1A, and siHIF1A + iABC treated and untreated with the drug (Figure 2K). In A549 cells resistant to PTX, the silencing of HIF1A, their pretreatment with iABC, and combination of siHIF1A/iABC before PTX resulted in similar cell sensitization to the drug. This suggests that HIF1A and targets of applied ABCC inhibitor act in the same regulatory circuit. In MDA-MB-231, HIF1A silencing emerged more potent than iABC in cell sensitization to the drug; hence, some additional, anti-apoptotic mechanism driven by HIF1A in these cells is possible, but the synergistic effect of siHIF1A combination with iABC was not observed when compared to siHIF1A alone. This allows to conclude that considerable extent of the observed, HIF1A-dependent resistance is mediated by ABCC proteins.

Interestingly, PTX-resistant lines were characterized by increased HIF1A expression at the mRNA level (Figure S6F) as well as increased HIF1A protein levels (Figure S6G). Bearing in mind that HIF1A abundance is also controlled by proteasome, we made use of MG132, a proteasome inhibitor, to test if repeated cell exposure to PTX alters the proteasome-dependent degradation of the considered transcription factor (Figure S6H). In basal cell line, we confirmed the contribution of proteasome to HIF1A degradation, whereas resistant cells showed comparable HIF1A level regardless of their exposure to MG132. This suggests that elevated HIF1A in

Figure 2. HIF1A-EP300-BRG1 functional crosstalk on the chromatin defines transcription of ABCC transporters in PTX-resistant breast and lung cancer cells

(A–D) HIF1A is responsible for overexpression of *ABCC3*, *ABCC5* and *ABCC10* in PTX-resistant MDA-MB-231 and A549 cells. (A and B) mRNA level of *ABCC3*, *ABCC5*, and *ABCC10* was compared in cells 72 h after their transfection with siCTRL, siHIF1A, siMAF, and siSL1 by real-time PCR in PTX-resistant MDA-MB-231 (A) and A549 (B) cells. Raw values were normalized first to housekeeping genes (*ACTB*, *GAPDH*, and *HPRT1*), and then the ratio was assumed as 1 in control sample. The difference between two means was tested with Student's t test, and statistically significant differences are marked as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (C and D) Effect of HIF1A, MAF, and ISL1 transient silencing on *ABCC3* and *ABCC10* protein level was studied by western blot in PTX-resistant MDA-MB-231 (C) and A549 (D) cells. Histone H3 was used as a loading control. (E) The expression and intracellular localization of *ABCC5* and *ABCC10* in HIF1A proficient and deficient MDA-MB-231-PTX cells were analyzed by immunocytochemistry followed by confocal microscopy. Green fluorescence corresponds to *ABCC5* and *ABCC10*, DNA was stained with DAPI (blue), whereas lysosomes with LysoTracker (red). (F and G) The green fluorescence intensity, which corresponds to intracellular *ABCC5* and *ABCC10* protein abundance (F), and colocalization between *ABCC5* or *ABCC10* and lysosomes (G) were determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student's t test, and statistically significant differences are marked as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (H) HIF1A causes lysosomal sequestration of PTX Oregon Green in lysosomes of PTX-resistant cancer cell lines. Colocalization of fluorescently labeled PTX and lysosomes was compared between HIF1A proficient and deficient cells. PTX is marked in green (Oregon Green 488), lysosomes in red (LysoTracker Deep Red), DNA in blue (DAPI). (I) The colocalization was determined in a.u. with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student's t test, and statistically significant differences are marked as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (J) The toxicity of anticancer therapeutics was compared in HIF1A proficient (siCTRL) and deficient (siHIF1A) cells. Cells were transfected 24 h before administration of drugs for the following 48 h. Cell viability was quantified with resazurin-based assay. Cell viability with drug alone/in control, drug untreated cells was assumed as 100%. (K) The impact of HIF1A silencing (siHIF1A), iABC (MK571, 25 μ M) and their combination on PTX- or doxorubicin-induced apoptosis (0.25 μ M for each drug) was compared by measuring caspase 3/7 activity with Caspase-Glo 3/7 Reagent. Caspase 3/7 activity was normalized to the relative fraction of living cells, which were quantified with resazurin assay.



(legend on next page)

resistant cells is caused by enhanced gene transcription and restricted proteasomal degradation. In the case of the PTX-resistant A549 line, an additional increase in the expression of EP300, which is a known coregulator of HIF1A that is required for its *trans*-activation, was observed³⁸ (Figure S6G).

BRG1 and p300 associate with HIF1A and are enriched at HRE motifs in promoters of transcriptionally active ABCC genes, crucial for PTX-induced cancer drug resistance

The distribution of the 2 epigenetic enzymes at the HIF1A motifs in non-resistant and PTX-resistant MDA-MB-231 cells were compared. For this purpose, we first identified the HIF1A binding profile across all the genome based on the TF-binding matrix deposited in JASPAR database and then limited the set of derived coordinates to gene promoters assumed to be TSS ± 2 kbp. As shown in Figure 3A, BRG1, p300, and H3K4me3 were considerably enriched in the genomic regions spanning HIF1A binding sequences ± 2.5 kbp in the resistant phenotype. Among them, BRG1 emerged the most sharply centered on the sites for HIF1A, whereas another 2 chromatin components were diffused in the proximity of HIF1A motifs.

To determine whether the acquisition of drug resistance is accompanied by an increased number of HIF1A motifs characterized by the occurrence of BRG1, p300, and H3K4me3, we counted overlapping intervals of HIF1A ± 1 kbp at the gene promoters and MACS2-derived peaks of the 3 considered chromatin proteins¹⁶ (Figure 3B). Among 4,617 promoters featured with the motif for HIF1A, approximately 800 were found positive for H3K4me3 that marks promoters of transcriptionally active genes and their number increased up to $\sim 1,200$ after repeated cell challenging with PTX. Similar changes were observed for BRG1 and p300, but the percentage of BRG1- and p300-promoters remained relatively low in resistant cells (<5%). Because such an evaluation of HIF1A motifs was based on the binary method and strongly depended on MACS2-associated statistics during peak calling, coverage of HIF1A binding sites ± 1 kbp with the mapped reads of 3 ChIP-seq-derived datasets of considered chromatin features were generated. It was aligned with the coverage of MACS2 peaks in corresponding samples (Figure 3C). H3K4me3, BRG1, and p300 were significantly enriched at the HIF1A motifs in PTX-resistant cells when compared to the non-resistant phenotype. The latter 2 proteins were even

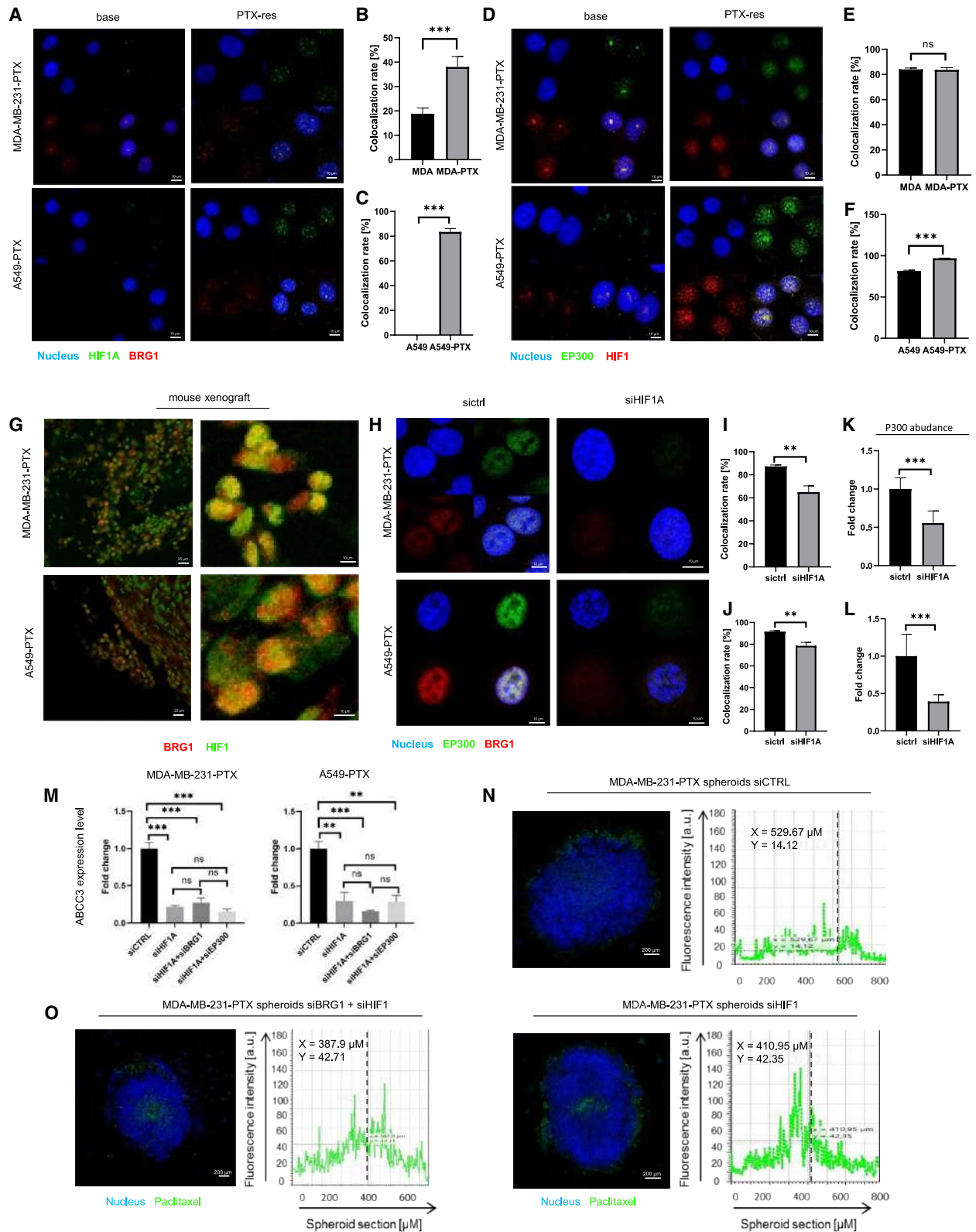
more abundant around HIF1A binding sites than at identified peaks in PTX-resistant cells. This suggests that PTX-induced drug resistance is associated with a more transcriptionally permissive chromatin structure at the subset of gene promoters characterized by the occurrence of the HIF1A motif, which is followed by significant enrichment of p300 and BRG1.

By co-immunoprecipitation, evidence was provided for the physical interaction between HIF1A, BRG1, and p300 in A549 and MDA-MB-231 PTX-resistant cell lines (Figure 3D). In non-resistant cells with relatively low HIF1A, precipitation of this protein detected small amounts of p300 in both cell lines and BRG1 in MDA-MB-231 cells, thereby suggesting that some HIF1A-p300-BRG1 complexes might pre-exist with the interaction between these 3 proteins substantially enhanced in response to taxane-induced stress and likely due to increase in the complex components. HIF1A is substantially elevated in resistant phenotypes of both cell lines, with p300 in MDA-MB-231 and BRG1 in A549 cells.

Bearing in mind the transcriptional dependence of *ABCC3*, *ABCC5*, and *ABCC10* on HIF1A presence in PTX-resistant phenotypes, the binding motif “KACGTGS” for transcription factors at the promoters of these genes was identified (Figure 3E). Although the promoter of *ABCC2* is characterized by the occurrence of the considered motif, this gene remains HIF1A-independent and its transcription declines during the development of drug resistance. Therefore, *ABCC2* served as a control (Figure S7A). In contrast to *ABCC2*, trimethylation of H3K4 increased at the promoters of the 3 exemplary HIF1A-dependent genes: *ABCC3*, *ABCC5*, and *ABCC10* (Figures 3F and S7B), and was followed by a considerable higher abundance of p300 and BRG1 in PTX-resistant MDA-MB-231 cells. To verify the possible formation of the HIF1A-p300-BRG1 complex at the HIF1A-dependent promoters of *ABCC3*, *ABCC5*, and *ABCC10*, chromatin immunoprecipitation (ChIP) followed by a DNA quantification with real-time PCR (ChIP-qPCR) was performed (Figures 3G and S7C). It was confirmed that the development of cell resistance to PTX is associated with recruitment of HIF1A to binding motifs in the proximity to transcription start site (TSS) of *ABCC3*, *ABCC5*, and *ABCC10*, but not of *ABCC2*. This indicates that HIF1A, BRG1, and p300 create a regulatory entity to facilitate overexpression of some of the *ABCC* genes which are responsible for the resistance of PTX-treated cells.

Figure 3. BRG1 and p300 associate with HIF1A and are enriched at HRE motifs in promoters of transcriptionally active ABCC genes

(A) The heatmap distribution of H3K4me3, p300, and BRG1 in the window of 2.5 kbp around HIF1A binding motif (HRE) at the gene promoters in non-resistant and PTX-resistant MDA-MB-231. (B) The occurrence of H3K4me3, p300, and BRG1 at the promoters characterized by HIF1A binding motif with respect to PTX resistance. Histone modification and proteins were counted by computing overlapping intervals of their enriched regions in the genome and HRE-positive promoters. (C) The abundance of the mapped reads of the three considered chromatin features around HIF1A binding motif (± 1 kbp) and at the MACS2-derived peaks of H3K4me3, p300, and BRG1 in non-resistant and PTX-resistant cells. (D) HIF1A physically interacts with EP300 and BRG1 in PTX-resistant A549 and MDA-MB-231 cells. HIF1A, EP300 and BRG1 were detected by western blot in HIF1A co-immunoprecipitates. IgG served as an isotypic control. (E) Diagrams presenting HIF1A binding motif (“KACGTGS”) at the promoters of *ABCC10*, *ABCC5*, and *ABCC3* with respect to their transcription start site (TSS). (F) Column chart presents mapped reads of H3K4me3, p300, and BRG1 counted on HRE motif (± 1 kbp) the promoters of *ABCC10*, *ABCC5*, and *ABCC3* in resistant and non-resistant cells. (G) HIF1A is enriched at the promoters of *ABCC3*, *ABCC5*, and *ABCC10* in PTX-resistant A549 and MDA-MB-231 phenotypes. The abundance of HIF1A at the gene promoters was compared and quantified by ChIP-qPCR in basal and PTX-resistant cell lines. Raw values were normalized to IgG. The difference between two means was tested with Student's t test, and statistically significant differences are marked as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.



(legend on next page)

HIF1A-p300-BRG1 co-occur on the chromatin genome-wide in PTX-resistant breast and lung cancers

To further confirm and visualize the extent of the HIF1A-BRG1 and HIF1A-p300 interaction genome-wide, the co-distribution of these proteins on the chromatin by confocal microscopy was tested. As shown in Figures 4A–4E, HIF1A co-localized with BRG1 (Figures 4A–4C) and with p300 (Figures 4D–4F) in PTX-resistant phenotypes of both considered cell lines in 2D cell cultures. The visual co-occurrence of the protein couples was underpinned by the quantification of the fluorescence overlap between the 2 considered fluorescent dyes in the area of the nucleus and compared to the result for non-resistant cells (Figures 4B, 4C, 4E, and 4F). In PTX-resistant A549 cells, HIF1A strongly colocalized with p300 and BRG1, but in breast cancer model, the drug-resistant phenotype showed enhanced colocalization of HIF1A with only BRG1. However, the increased recruitment of HIF1A to DNA (HIF1A-DAPI colocalization) was followed by also higher abundance of p300 on the chromatin (p300-DAPI colocalization) (Figure S7D). The lack of substantially intensified HIF1-p300 interaction quantified by colocalization of these two proteins in PTX-resistant versus non-resistant cells may result from nuclear redistribution of p300 and HIF1A between nuclei and nuclear chromatin. A considerable amount of these two proteins was found in the nuclei in basal cells, but translocated to nuclear DNA during acquiring the drug resistance.

Similarly, the relatively strong co-distribution of BRG1 and HIF1A was observed in tissue sections prepared from the PTX-resistant tumors that were grown from the MDA-MB-231-PTX cells injected under the skin of athymic mice (Figure 4G).

Given the occurrence of increased HIF1A expression in PTX-resistant lines as well as the increased co-occurrence of BRG1 and EP300 with HIF1A on chromatin, we hypothesized that HIF1A may be crucial for recruiting BRG1/EP300 complex. To verify this idea, we tested the impact of HIF1A silencing on the occurrence of chromatin-bound EP300 and BRG1 (Figure 4H).

Indeed, the deficiency of HIF1A significantly decreased co-localization of these two proteins (Figures 4I and 4J) as well as considerably declined the fraction of EP300 and BRG1 in the nuclear area (Figures 4K, 4L, and S7E). These results confirm the role of HIF1A in the recruitment of EP300 and BRG1 to chromatin in PTX-resistant cells.

HIF1A co-operates with BRG1 and p300 to drive drug sequestration in lysosomes and multidrug resistance in PTX-treated cells

Knowing that HIF1A, EP300, and BRG1 regulate expression of the ABC transporters that are enriched in lysosomes of PTX-resistant cancer cell lines, we checked if these proteins work cooperatively or if their effect is independent of each other and synergistic. The double silencing of HIF1A and BRG1 or EP300 decline transcription of the three genes similarly to single silencing of HIF1A (Figures 4M and S7E). Moreover, we analyze the functional impact of single HIF1A and double HIF1A/BRG1 silencing on drug penetration was also tested in 3D cultures of MDA-PTX cells exposed to PTX Oregon Green. In HIF1A proficient cells, the drug accumulated in the peripheral layer, whereas HIF1A silencing allowed the drugs to reach the inner spheroid layers (Figure 4N). As described in the previous paper by Gronkowska et al., the inhibition of ABC or neutralization of lysosome activity, as well as the deficiency of BRG1 activity, enables drug accumulation inside spheroids.^{15,16} In line with these findings, HIF1A limits drug penetration by upregulating the expression of factors that are responsible for drug transport across membranes. Importantly, the effect of double silencing of HIF1A and BRG1 does not differ from single HIF1A silencing, and a synergistic effect was not observed, thereby confirming that HIF1A/BRG1/p300 act in the same pathway that drives cancer cell resistance via lysosomal drug sequestration (Figure 4O).

Elevated expression of HIF1A, p300, and BRG1 in cancers define clinical outcomes and prognosis

To test the possible expression interdependence between *HIF1A*, *SMARCA4*, and *EP300* as well as their link with cancer

Figure 4. HIF1A-p300-BRG1 co-occur on the chromatin in PTX-resistant breast and lung cancers

(A and D) BRG1-HIF1A and EP300-HIF1A colocalize on the chromatin in PTX-resistant A549 and MDA-MB-231 cell lines as evidenced by immunostaining and confocal microscopy. (A) Alexa Fluor 488-labeled HIF1A is marked in green, Alexa Fluor 594-labeled BRG1 is marked in red, whereas DAPI-stained DNA is marked in blue. (D) Alexa Fluor 488-labeled p300 is marked green, Alexa Fluor 594-labeled BRG1 is marked in red, whereas DAPI-stained DNA is marked in blue. (B, C, E, and F) The colocalization between HIF1A and BRG1 (B and C) as well as HIF1A and p300 (E and F) were determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student's t test, and statistically significant differences are marked as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (G) HIF1A and BRG1 colocalization in tumor xenograft (MDA-MB-231-PTX) slides was evidenced by immunostaining and confocal microscopy. Alexa Fluor 488-labeled HIF1A is marked in green and Alexa Fluor 594-labeled BRG1 is marked in red. (H) HIF1A silencing uncouples chromatin co-distribution of p300 and BRG1, which was analyzed using immunostaining and confocal microscopy in 2D cell culture. Alexa Fluor 488-labeled p300 is marked in green, Alexa Fluor 594-labeled BRG1 is marked in red, whereas DAPI-stained DNA is marked in blue. (I–L) The colocalization (I and J) between BRG1 and p300 and p300 abundance (K and L) were determined in a.u. with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student's t test, and statistically significant differences are marked as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (M) HIF1A and BRG1 as well as HIF1A and p300 co-silencing do not act synergistically and phenocopy the effect of single HIF1A silencing on transcription of *ABCC3* in PTX-resistant MDA-MB-231 and A549 cells. mRNA level was compared in cells 72 h after their transfection with siCTRL, siHIF1A alone, or in combination with siSMARCA4 and siEP300 by real-time PCR in PTX-resistant MDA-MB-231 and A549 cells. Raw values were normalized first to housekeeping genes (*ACTB*, *GAPDH*, and *HPRT1*), and then the ratio was assumed as 1 in control sample. The difference between means was tested using one-way ANOVA or Kruskal-Wallis test, and statistically significant differences are marked as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (N and O) HIF1A prevents PTX accumulation in deeper layers of PTX-resistant MDA-MB-231 spheroids. Spheroids (21 days old) were transfected with siHIF1A or siCTRL or a combination with siHIF1A and siBRG1, and 72 h later, treated with PTX Oregon Green for 48 h. Pictures were taken with confocal microscope Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany). Green fluorescence corresponds to PTX, blue to DNA stained with DAPI, whereas red to lysosomes stained with LysoTracker Deep Red. The fluorescence intensity plot at spheroid cross section was determined in a.u. with Leica Application Suite X.

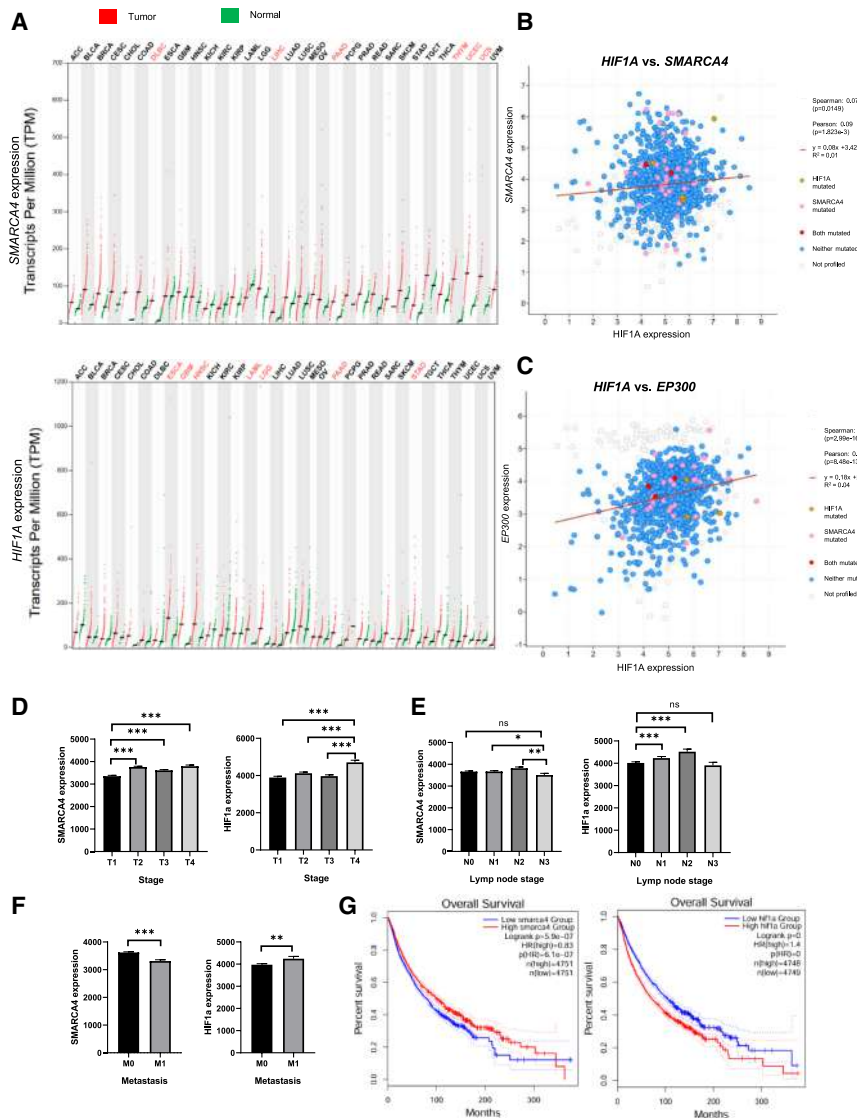


Figure 5. The link of HIF1A, BRG1, and p300 expression in cancers with clinical outcomes and prognosis

(A) Comparison of *SMARCA4* and *HIF1A* mRNA level between the tumor and normal samples based on TCGA and GTEx databases using GEPIA 2. ACC, adrenocortical cancer; BLCA, bladder urothelial carcinoma; BRCA, breast invasive carcinoma; CESC, cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma; CHOL, cholangiocarcinoma; COAD, colon adenocarcinoma; DLBC, lymphoid neoplasm diffuse large B cell lymphoma; ESCA, esophageal carcinoma; GBM, glioblastoma multiforme; HNSC, head and neck squamous cell carcinoma; KICH, kidney chromophobe; KIRC, kidney renal clear cell carcinoma; KIRP, kidney renal papillary cell carcinoma; LAML, acute myeloid leukemia; LGG, brain lower grade glioma; LIHC, liver hepatocellular carcinoma; LUAD, lung adenocarcinoma; LUSC, lung squamous cell carcinoma; MESO, mesothelioma; OV, ovarian serous cystadenocarcinoma; PAAD, pancreatic adenocarcinoma; PCPG, pheochromocytoma and paraganglioma; PRAD, prostate adenocarcinoma; READ, rectum adenocarcinoma; SARC, sarcoma; SKCM, skin cutaneous melanoma; STAD, stomach adenocarcinoma; TGCT, testicular germ cell tumors; THYM, thymoma; THCA, thyroid carcinoma; UCS, uterine carcinosarcoma; UCEC, uterine corpus endometrial carcinoma; UVM, uveal melanoma. (B and C) Correlation plot with *HIF1A* and *SMARCA4* (B) as well as *HIF1A* and *EP300* transcription (C). The underlying data were derived from all TCGA Pan-Cancer Atlas (Pan-cancer analysis of whole-genome (ICGC/TCGA, *Nature* 2020) samples using cBioPortal. (D–F) The level of *HIF1A* in 4 tumor stages (D), lymph node stages (E), and metastasis stages (F). Statistical analysis was performed in GraphPad Prism 8, and significant differences are marked as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (G) Overall patient survival in relation to *HIF1A* expression was generated in GEPIA 2.

progression, transcription of these 3 proteins versus some cancer features was compared between the tumor and normal samples based on TCGA and GTEx databases using GEPIA 2.³⁹ The correlation between *EP300* overexpression and several pathological signatures such as tumor grading, metastases and patient survival has been described in Gronkowska K. and Robaszkiewicz A.⁴⁰ Our research suggested that the elevated activity of p300 may drive carcinogenesis and contribute to the progressive cancer of some cancer types, thereby emerging as a therapeutic target in p300 proficient or overexpressing cancers. As shown in Figure 5A, both *SMARCA4* and *HIF1A* are also frequently overexpressed in cancerous tissues. Lymphoma, liver cancer, thymoma, and uterine cancer are characterized by a substantially increased transcription of *SMARCA4*, whereas *HIF1A* overexpression was found in esophageal carcinomas, glioblastomas, head and neck squamous cell carcinomas, acute myeloid leukemias, brain

lower-grade gliomas, and stomach adenocarcinomas. Pancreatic adenocarcinomas are associated with the overexpression of both *SMARCA4* and *HIF1A*. Relatively high transcription of *EP300* and *HIF1A* was observed in acute myeloid leukemias and stomach adenocarcinomas, whereas mRNA of *EP300* and *SMARCA4* was elevated in thymoma.⁴⁰ TCGA PANCAN Atlas samples indicated a correlation in the expression between *HIF1A* and *SMARCA4* as well as *HIF1A* and *EP300* in cancers (Figures 5B and 5C), thereby suggesting their possible joint role in cancer progression and response to treatment.

To support this hypothesis, it was found that the expression of *SMARCA4* and *HIF1A* is associated with several clinicopathological features that specify tumor stages and metastases, as well as patient survival in some cancer types (Figures 5D–5G). According to PANCAN data, higher *HIF1A* transcription is associated with the

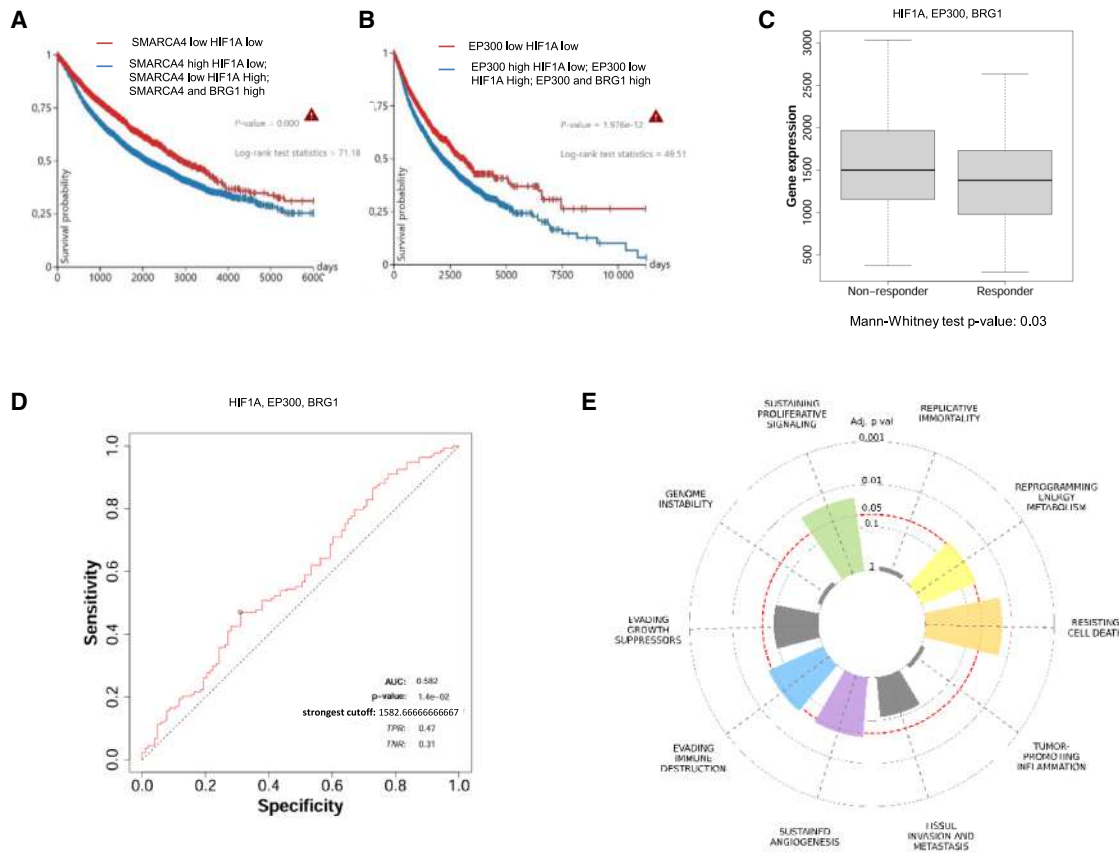


Figure 6. The impact of HIF1A, EP300, and BRG1 co-expression on the therapy response and prognosis

(A and B) Overall patient survival in relation to *HIF1A* and *SMARCA4* (A) as well as *HIF1A* and *EP300* (B) low transcription yield was generated using Xena Functional Genomics Explorer. (C) The dependence of clinical patients' response to taxane therapy on *HIF1A*, *EP300*, and *SMARCA4* transcription was estimated using ROC Plotter. (D) ROC curve describing the response to chemotherapy with taxane in the group of patients characterized by simultaneously high transcription of *HIF1A*, *EP300*, and *SMARCA4*. (E) Cancer hallmark enrichment analysis of tumors high in *HIF1A*, *EP300*, and *SMARCA4* shows unfavorable prognosis for this group in pan-cancer datasets. The red line corresponds to adjusted $p < 0.05$. Only the cancer hallmarks that are significantly enriched are colored.

higher tumor stage, which describes the size of the primary tumor and invasion into adjacent tissues (Figure 5D). Furthermore, elevated *HIF1A* expression is followed by higher lymph node and distant metastases and by considerably shorter overall patient survival (Figures 5E–5G). Taking into consideration the multi-gene overall survival analysis, simultaneous low expression of *SMARCA4* and *HIF1A* (Figure 6A) or *HIF1A* and *EP300* (Figure 6B) is linked to a relatively better prognosis, whereas a higher level of any of the 2 coupled factors negatively impacts overall patient survival. This points at the pro-cancerous and disease-promoting features of *HIF1A*, *p300*, and *BRG1*. Using the online available tool ROCplot.org⁴¹ we analyzed the link between mRNA level of *HIF1A*, *EP300*, and *SMARCA4*, and a 5-year relapse-free survival of breast cancer patients treated with taxanes (Figure 6C). Positive responses to therapy and higher relapse-free survival were observed in the cohort characterized by the lower expression of the 3 analyzed genes. Additionally, the receiver operating characteristics (ROC) analysis of taxane-treated patients sug-

gests that co-expression of these genes can be considered as a taxane-based chemotherapy response biomarker (Figure 6D). Therefore, simultaneously elevated transcription of *SMARCA4*, *HIF1*, and *EP300* may have an unfavorable impact on patients under treatment with PTX and other taxane drugs. This can be partially explained at least by *HIF1A*-*BRG1*-*p300*-dependent and PTX-induced overexpression of ABC transporters. Cancer hallmark analyses identify *HIF1A* and *EP300* co-expression as markers of cancer cells sustaining proliferative signaling, resisting cell death mechanisms, sustaining angiogenesis, and evading immune destruction (Figure 6E). This finding also points to other mechanisms driven by *HIF1A*, which likely limit patient survival and response to chemotherapy.

DISCUSSION

The development of multidrug resistance is a major factor responsible for the failure of chemotherapy in cancer treatment. Many drug resistance mechanisms occur at the genomic level and start

with modification of the signaling routes, which then modulate the activity of the subset of transcription factors and the epigenetic transformation of chromatin. Research has shown that some transcription factors and chromatin remodeling enzymes play a significant role in PTX resistance. Interestingly, some redox sensitive transcription factors have been shown to play a role in cancer drug resistance. In an example of this, nuclear factor erythroid 2-related factor 2-mediated antioxidant signaling molecules contributed to PTX resistance in breast cancer-derived CSCs.⁴² The transcription factors HIF-1 and AP-1 take part in the hypoxia-induced anti-apoptotic pathway associated with PTX resistance. Suppression of these 2 transcription factors increased the apoptosis induced by PTX in MDA-MB-231 breast cancer cells,³⁰ enhanced anticancer activity of the PTX on ovarian cancer cells A2780,³¹ hepatocellular carcinoma cells HepG2, and tumor-bearing mouse models.⁴³ Therefore, this shows that the activity of HIF1A goes beyond cell adaptation to hypoxia. In doxorubicin-resistant osteosarcoma cells, maintained in normoxic conditions, the transcription factor promoted the outward transport of intracellular doxorubicin by activating *ABCB1* expression. However, the doxorubicin-resistant cells, which were maintained for 2 months of continuous culture in a drug-free medium, lost their drug-resistance, this effect being associated with the absence of HIF1A expression.³⁴ Similarly, repeated cell exposure to stress triggered by PTX in normoxic conditions led to a substantial increase in HIF1A abundance in cells and recruitment of the transcription factor to chromatin. In this study, we provided mechanical evidence on the physical interaction of HIF1A with BRG1 and p300 in PTX-resistant cells. The latter 2 enzymes regulate expression of ABC transporters in PTX-resistant breast and lung cancer cells where inhibition/silencing of the enzymes increased the intracellular concentrations of the drugs. This is a likely mechanism for increased chemosensitivity.¹⁶ According to our results, HIF1A is crucial for the transcription dependence of *ABCC3*, *ABCC5*, and *ABCC10* on BRG1 and p300 activity; hence, HIF1A plays a primary role over the 2 chromatin remodeling enzymes. Since HIF1A is classified as a transcription factor, logically, events would follow the pathway of its binding and then its recruitment of EP300 and BRG1. However, as shown by p300 and BRG1 ChIP-seq data, these 2 enzymes pre-exist at the *ABCC3* and *ABCC5* gene promoters in basal, non-resistant cell lines, but the level of HIF1A is substantially enriched in PTX-resistant cells in the proximity of BRG1 peaks at the 3 considered gene promoters. The route by which HIF1A becomes an *ABCC5* and *ABCC10* co-activator of BRG1-p300-dependent transcription remains unknown. Interestingly, *ABCC3* that is strongly transcribed in BRG1 deficient A549 cells becomes BRG1 and HIF1A-dependent in the PTX-resistant phenotype, where BRG1 is restored by a reversal mutation in the stop codon, despite no considerable alteration in the gene transcription. This again suggests that HIF1A occurrence or enrichment in the regions adjacent to BRG1-bound chromatin may trigger chromatin rearrangement producing transcription machinery dependent on BRG1 and HIF1A. The increased abundance of this transcription factor in response to chemotherapy drugs may serve as a switch for drug-induced overexpression of *ABCC* genes. Some concerns on the mechanism underlying HIF1A-p300-BRG1 function remain, how-

ever, since the inhibition of p300 considerably reduces the transcription of *ABCC3* in BRG1-deficient A549 cells and BRG1-proficient MDA-MB-231 non-resistant cell lines where the initial HIF1A level is relatively low. Molecular interdependence between BRG1, p300, and HIF1A needs further experimental studies for disclosure of their mutual intertwining and drug-induced overexpression of *MDR* genes.

The co-occurrence of HIF1A with BRG1 on the chromatin in tumors formed from PTX-resistant MDA-MB-231 is considerably higher in the deeper tumor layers. This observation suggests that a hypoxic condition inside the tumor favors DNA binding by HIF1A and the transcription-regulating role of this factor is supported by BRG1. Therefore, the number of transcriptionally activated or enhanced genes by HIF1A-BRG1 interaction may differ across tumor, with the HIF1A-dependent transcriptomes differing between inner and outer tumor regions. As documented previously, the role of HIF1, a helix-loop-helix transcription factor, was essential in regulating the transcription of various target genes in response to a limited oxygen supply.⁴⁴ This was a significant characteristic of human solid tumors due to the combination of uncontrolled, rapid growth of tumor cells and the inability of the local vasculature to fuel fast proliferating cells. Studies with laryngeal cancer cells, human colon cancer cells, and breast cancer cells cultured as 3D spheroids linked HIF1A occurrence at the promoter of *ABCB1* with its expression and resistance to numerous drugs.⁴⁴⁻⁴⁷ However, the aforementioned hypothesis on the HIF1A-BRG1-dependent transcriptome variability under normoxic and hypoxic condition of PTX-resistant cells requires verification. Although the specific sequence for BRG1 binding has been reported, it differed from the 3 motifs identified for the BRG1 enriched regions in PTX-resistant cells. The 2 sequences, which occurred at the promoters of these *ABCC* genes, were localized in the proximity of 4 transcription factors such as ISL1, HIF1A, MAF, and ZNF96. The functional study led to the conclusion about the co-regulatory role of HIF1A in BRG1-dependent transcription of *ABC* genes that was responsible for drug sequestration in lysosomes in PTX-resistant cancer phenotypes. BRG1 activity and its transcription-activating role was only observed in HIF1A-proficient, PTX-resistant cells.

These studies have described the functional association or at least a correlation between the expression of BRG1 (*SMARCA4*) and p300 (*P300*) with some tumor features,⁴⁰ patient survival and treatment response; however, nothing is known about the disease prognosis for HIF1A-BRG1-p300 highly expressed cancers. Based on the data deposited in TCGA and GTEx databases, we provided evidence that high expression of these 3 proteins could serve as a prognostic marker of breast cancer patients response to chemotherapy involving taxans. Simultaneously, the high transcription of *HIF1A*, *EP300*, and *SMARCA4* can be clinically important and affect treatment outcomes. Therefore, quantification of their expression profile may help to decide on treatment schemes, replacement of chemotherapy, or combination of chemotherapy drugs with *ABCC* inhibitors or BRG1 and p300 inhibitors.

In summary, PTX-induced drug resistance involves 3 key players, namely BRG1, p300, and HIF1A, which define the strong expression of *ABCC3*, *ABCC5*, and *ABCC10* in the 2 studied cell lines. The silencing of HIF1A substantially reduced the expression of the ABC transporter subset and augmented the cytotoxicity of numerous anticancer drugs. This study provides a new target—namely HIF1A—for anticancer combinatorial interventions with chemotherapy drugs in PTX-induced multidrug-resistant cancer phenotypes. Moreover, simultaneous overexpression of HIF1A, BRG1, and p300 may serve as clinical response predictor.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Non-small-cell lung cancer cell line A549 was purchased from ATCC. Breast cancer cell line MDA-MB-231 was purchased from Sigma-Aldrich (Poznan, Poland). DMEM high glucose w/l-glutamine w/ sodium pyruvate, fetal bovine serum, and antibiotics (penicillin and streptomycin) were from Biowest (CytoGen, Zgierz, Poland). Oligonucleotides for real-time PCR, resazurin sodium salt, Immobilon Signal Enhancer, doxorubicin hydrochloride, cisplatin, PTX, etoposide, MK-571 (M7571), and MG132 were from Sigma-Aldrich. siRNA control (sc-37007), anti-MRP5 (E-10) (sc-376965), anti-p300 (F-4) (sc-48343), and anti-HIF-1 α (28b) (sc-13515) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (AMX, Lodz, Poland). SMARCA4 Silencer Select siRNA (s13141), HIF1A Silencer Select siRNA (n336611), MAF Silencer Select siRNA (s194604), ISL Silencer Select siRNA (s7526), EP300 Silencer Select siRNA (s534247), Lipofectamine RNAiMAX, OptiMem, Dynabeads Protein G, UltraPure Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1, v/v) (no. 15593031), TRI Reagent, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, PageRuler Prestained Protein Ladder (no. 01154870), Pierce Protease Inhibitor Tablets (EDTA-free; PIC), Paclitaxel Oregon Green 488 conjugate (Flutax-2), LysoTracker Deep Red, SlowFade Glass Soft-set Antifade Mountant (with DAPI), anti-MRP3 (ABCC3) Polyclonal Antibody (PA5101482), anti-MRP10 (ABCC10) Polyclonal Antibody (PA5101678), PowerUp SYBR Green Master Mix, and Geltrex LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix were from Thermo Fisher Scientific (Warsaw, Poland). Anti-BRG1 (D1Q7F) Rabbit mAb (no. 49360), anti-p300 (E8S2V) Rabbit mAb (no. 57625), anti-HIF-1 α (D1S7W) Rabbit mAb (no. 36169), anti-Histone H3 (1B1B2) Mouse mAb (no. 14269), anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (no. 7074), Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (no. 7076), Anti-rabbit IgG (H + L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor 488 Conjugate) (no. 4412), Anti-mouse IgG (H + L), F(ab')₂ Fragment (PE Conjugate) (no. 59997S), and Anti-rabbit IgG Fab2 Fragment Alexa Fluor 594 Probes (no. 8889S) were from Cell Signaling Technologies (LabJOT, Warsaw, Poland). BIOFLOAT FLEX coating solution was purchased from FaCellitate (faCellitate.com). Caspase-Glo 3/7 Assay System was purchased from Promega.

Cell culture

A549 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin (50 U/mL and

50 μ g/mL, respectively) in 5% CO₂. Initially, MDA-MB-231 cells were cultured in F15 medium supplemented with 15% FBS and penicillin/streptomycin (50 U/mL and 50 μ g/mL, respectively) without CO₂ equilibration. After 5 passages, the cells were adapted to grow in DMEM supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin (50 U/mL and 50 μ g/mL, respectively) in 5% CO₂. PTX resistance induction and characteristics of resistant cell lines was described previously.^{15,48}

Bioinformatic analysis of ChIP-seq and RNA-seq data

Original raw NGS data files containing sequence reads and quality scores, submitted to the NCBI Sequence Read Archive (SRA) database under the SRA: PRJNA1095909 and SRA: PRJNA1096152 and describe in Gronkowska et al.,¹⁶ were analyzed. Adapters were trimmed during FASTQ generation as an option of Illumina pipeline in BaseSpace. All other analyses were performed in Galaxy.org (Galaxy version 24.0.rc1).⁴⁹ The read quality was checked with FastQC and reads with Qphred <30 were removed with Trimmomatic (AVGQUAL:30). Reads were mapped with BWA against human genome (hg19). Mapped reads were normalized to counts per million (-bamCoverage). Peaks were called with MACS2 at $p < 0.001$. Blacklist regions for hg19 were downloaded from ENCODE: ENCSR636HFF.⁵⁰ Motif-spacing analysis was performed using MEME Suite Programs.⁵¹ BRG1-enriched gene promoters (TSS \pm 2 kbp) were plotted against genes considerably activated and downregulated by BRG1 ($1 < \log_2FC < \sim 1$; CuffDiff on RNA-seq data derived from BRG1 proficient-siCTRL and deficient-siBRG1 MDA-MB-231-PTX). BRG1 peaks at the promoters of genes transcriptionally co-activated by this enzyme served as input, whereas BRG1 peaks at the promoters of genes suppressed by BRG1 served as negative control. BRG1-enriched motifs were searched in XSTREME for the subset of BRG1 peaks. HOCOMOCO Human (v11 core) was selected as input motifs. The occurrence of identified STREME motifs at the promoters of considered ABC genes was checked in FIMO, but only gene promoters with $q < 0.01$ are listed. The list of secondary known HOCOMOCO Human (v11 core) motifs for transcription factors with significantly enriched spacings (Significant Secondaries), which may indicate formation of protein complexes with BRG1, were generated in SpaMo.

The motif matrix for HIF1A was downloaded from JASPAR: MA0259.1 and converted into memexml file. HIF1A consensus binding sites were searched through human hg19 genome with FIMO. The output chromosome coordinates were narrowed down to these overlapping gene promoters, which were assumed as TSS \pm 2 kbp. Heatmaps for H3K4me3, p300, and BRG1 distribution around HIF1A motifs were plotted from score matrix for HIF1A \pm 2.5 kbp and H3K4me3, p300, and BRG1 score files in BAM. The number of HIF1A \pm 1 kbp genomic regions characterized by H3K4me3, p300 and BRG1 in MDA-MB-231 non-resistant and PTX-resistant were compared by generating intersects of HIF1A and other datasets as intervals. The coverage of HIF1A \pm 1 kbp (as BED) with H3K4me3, p300, and BRG1 (as BAM) was computed

using bedtools MultiCovBed. The coverage of MACS2 called peaks for H3K4me3, p300, and BRG1 were used to compare their enrichment with regions adjacent to HIF1A motif.

HIF1A motif at the promoters of some *ABCC* genes (TSS ± 5 kbp as BED) were searched with nucleotide subsequence search using “KACGTGS” nucleotide ambiguity code. The coverage of the identified HIF1A sites for individual gene promoters was computed with bedtools MultiCovBed as described previously.

Clinical data analysis

The correlations between *SMARCA4* and some *ABC* gene expression in TCGA PANCAN dataset of 12,839 samples was explored in UCSC Xena Functional Genomics Explorer.⁵² Samples with nulls were removed and data for *SMARCA4* expression, which comprised $\log_2(\text{norm_value} + 1)$ between 9.6 and 14, were sub-grouped into *SMARCA4* low ($\log_2(\text{norm_value} + 1) < 10.7$) and *SMARCA4* medium and high ($\log_2(\text{norm_value} + 1) > 10.7$). The threshold was set to include most of the deleterious somatic mutation (SNP and INDEL; MC3 public version) in *SMARCA4* low subgroup. Similarly, data for *HIF1A*, *MAF*, *ISL1* and *ZNF76* were divided into groups characterized by low versus medium and high mRNA level and the threshold was set as follows: *HIF1A* - < 10 , *MAF* - < 7.7 , *ZNF76* < 8.5 , and *ISL1* < 0.5 . The groups were further sub-grouped with regard to *SMARCA4* expression. For multigene overall survival analysis, the threshold was set as follows: *HIF1A* - < 11.5 , *SMARCA4* - < 12 , and *EP300* - < 11 .

To compare the transcription status of *SMARCA4* and *HIF1A* and to identify the possible expression changes of these genes in cancer, tumor and normal samples from the TCGA and GTEx databases was analyzed using GEPIA 2.³⁹ Dot-plot correlation graph with expression of *HIF1A* and *SMARCA4*, and between *HIF1A* and *EP300* was generated using PANCAN analysis of whole-genome (ICGC/TCGA, *Nature* 2020) samples in cBioPortal.⁵³ The link between *HIF1A* and *SMARCA4* expression and tumor stage, lymph node stage, and metastasis stage were analyzed using TCGA-PANCAN datasets available in cBioPortal using GraphPad Prism 8. The disease-free survival and overall patient survival in relation to *HIF1A* and *SMARCA4* were generated using GEPIA2. Validation of the predictive capability of *HIF1A*, *EP300*, and *SMARCA4* expression on taxane-based chemotherapy was prepared using transcriptomic data of 3,104 breast cancer patients using ROCplot tool.⁴¹ A gene set enrichment analysis for the cancer hallmarks of *HIF1A* *EP300* and *SMARCA4* was prepared using Hallmark Enrichment Plot available at [CancerHallmarks.com](https://cancerhallmarks.com) and described in Menyhart et al.⁵⁴

Transient gene silencing

Cells seeded per well at a density of 100,000 cells on the 24-well plate, 10,000 cells on Nunc Lab-Tek Chamber Slide and 96-well plate, or three-week spheroids were transfected using siRNA-RNAiMAX complexes according to the previously described protocol.⁵⁵ After 6 h incubation with the complexes, DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics was added to the desired volume and cells were grown for another 48 h to obtain transient gene silencing.

Real-time PCR

For mRNA expression evaluation, total RNA was extracted from cells using TRI Reagent. Afterward, mRNA was reverse transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. The expression of selected genes was measured in Bio-Rad CFX96 C1000 Touch Real-Time system, using PowerUp SYBR Green Master Mix and the manually designed primer pairs (GAPDH forward: 5'-TTCTTTTTCGTCGCCAGCCGA-3', reverse: 5'-GTGACCAGGCGCCCAATACGA-3', ACTB forward: 5'-TGGCACCCAGCACATGAA-3', reverse: 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3', HPRT1 forward: 5'-TGACACTGGCAAAAACAATGCA-3', reverse: 5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3', ABCC3 forward: 5'-TCC TTTGCCAACTTTCTCTGCAACTAT-3', reverse: 5'-CTGGATCATGTGTCTGTCAGATCCGT-3', ABCC5 forward: 5'-AGAGGTGACCTTTGAGAACGCA-3', reverse: 5'-CTCCAGATAACTCCACCA GACGG-3', ABCC10 forward: 5'-CGGGTTAAGCTTGTGACAG AGC-3', reverse: 5'-AACACCTTGGTGGCAGTGAGCT-3', HIF1A forward: 5'-GATCACCTCTTCGTCGCTT-3', reverse: 5'-AAAGG CAAGTCCAGAGGTGG-3') according to the protocol provided by the manufacturer.

mRNA level of particular genes was first normalized to housekeeping genes. The ratio between the studied and housekeeping genes was assumed to be 1 for control cells.

Western blot

For protein expression evaluation cells were lysed in RIPA buffer (supplemented with 1 mM PMSF and PIC) and sonicated (Bandelin Sonopuls HD2070). Next, proteins were separated by SDS-PAGE, transferred into a nitrocellulose membrane, and stained with primary antibodies (1:5,000) at 4°C overnight. After subsequent staining with HRP-conjugated secondary antibodies (1:5,000 for anti-rabbit and 1:2,500 for anti-mouse antibodies; room temperature; 2 h), the signal was developed with the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate and pictures were acquired using ChemiDoc-IT2 (UVP, Meranco, Poznan, Poland). H3 was used as the control.

Formation of cell spheroids

Nunc Lab-Tek Chamber slides were coated with faCellitate BIOFLOAT FLEX coating solution according to the manufacturer protocol. After 30 min of air-drying of the chambers, within the laminar flow hood, the cells were seeded per well at a density of 20,000 cells. Cells grow in DMEM supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin (50 U/mL and 50 μ g/mL, respectively) in 5% CO₂ to allow spheroids formation for 21 days.

Confocal microscopy

For the confocal imaging of proteins, cells were seeded on a Nunc Lab-Tek Chamber slide. 2 h before cells fixation LysoTracker Deep Red was added to the final volume of 75 nM, and cells were incubated 1 h at 37°C. Cells were fixed with a 1% formaldehyde solution in PBS at room temperature for 15 min, permeabilized and blocked with 1% BSA solution in PBS with 0.1% Triton X-100 at room temperature for 1 h. Primary antibodies (1:400) were added in 1% BSA solution in

PBS with 0.1% Triton X-100 and incubated at 4°C overnight. Next, a secondary antibody (1:400) was added in 1% BSA solution in PBS with 0.1% Triton X-100 at room temperature for 2 h. After washing, the slides were mounted with SlowFade glass soft-set antifade mountant (with DAPI). TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) with a 63×/1.40 objective (HC PL APO CS2, Leica Microsystems, Germany) was used for sample visualization. The samples were imaged with the following wavelength values for excitation and emission: 485 and 500–550 nm for Alexa Fluor 488, 550 and 570–580 nm for Alexa Fluor 546, 480 and 570–580 nm for R-phycoerythrin (PE), 660–670 for LysoTracker Deep Red, and 405 and 430–480 nm for DAPI. The fluorescence intensity and colocalization was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems, Germany). The scans of cells were deconvolved using 3D-Deconvolution accessible in Leica Application Suite X software (LAS X, Leica Microsystems).

For the visualization of drug accumulation cells seeded on Nunc Lab-Tek Chamber slides were treated with anticancer drugs. Next, LysoTracker Deep Red (75 nM for 2 h), was added to the culture media. After incubation and cell washing with PBS, cells were mounted with SlowFade glass soft-set antifade mountant (with DAPI). PTX Oregon Green-treated 3-week-old 3D cell cultures were fixed with a 4% formaldehyde solution in PBS, at room temperature for 30 min. After fixation, the spheroids were washed with PBS and incubated with 1 µg/mL DAPI for 30 min, at room temperature. Spheroids were analyzed immediately.

TCS SP8 (Leica Microsystems) with a 63×/1.40 and 10×0.40 DRY objectives (HC PL APO CS2, Leica Microsystems) was used for sample visualization. The samples were imaged with the following wavelength values for excitation and emission: 485 and 500–550 nm for Alexa Fluor 488 conjugated PTX and 405 and 430–480 nm for DAPI. The fluorescence intensity was determined in a.u. with Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems).

Human xenografts and tumor sampling

PTX-resistant MDA-MB-231 and A549 cells (100,000 cells) suspended in Geltrex LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix were injected subcutaneously into 6-week-old female athymic, immunodeficient mice (CrL:NU(NCr)-Foxn1nu; Animalab, Poland). Six weeks after inoculation, the tumors that arose were isolated, transferred, and stored in PBS with 10% paraformaldehyde. The entire experiment with animals was performed in the Animal Facility of Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, Poland, under permission no. 72/2023 issued on 06.04.2023 by the 2nd Local Ethical Committee in Krakow.

Tumors were placed in water-soluble embedding medium (Frozen Section Media 22; Leica Biosystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA), frozen in ~ 20°C, and then sectioned on a cryostat (Leica CM1950, Leica Biosystems Inc.) in ~ 10°C to 10-µm-thick slides. The slides were washed with distilled water to remove the sectioning media

and the heat-induced epitope retrieval method was used. The slides were incubated with EDTA buffer (1 mM EDTA, 0.05% Tween 20 [pH 8.0]) and heated 20 min in 96°C. Next, samples were permeabilized and blocked with 1% FBS solution in PBS with 0.4% Triton X-100 at room temperature for 1 h. Primary antibodies (1:400) were added in 1% FBS solution in PBS with 0.1% Triton X-100 and incubated at 4°C overnight. Next, a secondary antibody (1:400) was added in 1% FBS solution in PBS with 0.1% Triton X-100 at room temperature for 2 h. After washing, the slides were mounted with SlowFade glass soft-set antifade mountant (with DAPI). TCS SP8 (Leica Microsystems,) with a 63×/1.40 objective (HC PL APO CS2, Leica Microsystems) was used for sample visualization. The samples were imaged with the following wavelength values for excitation and emission: 485 and 500–550 nm for Alexa Fluor 488 and 550 and 570–580 nm for Alexa Fluor 546.

Chromatin immunoprecipitation

ChIP was carried out according to the protocol previously described.⁵⁶ DNA was extracted using phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1). HIF1A was immunoprecipitated with anti-HIF-1 alpha (D1S7W) Rabbit mAb in PTX-resistant MDA-MB-231 cells.

BRG1 binding motifs at the selected gene promoters were amplified using KAPA SYBR FAST Universal Master Mix, 0.1% DMSO and the following primer pairs: *ABCC3* forward: 5⁰-GATTGAGACTGAT CAGAACGGC-3⁰, reverse: 5⁰-ATAATATTCCAGAGGTAAGTGC CA-3⁰; *ABCC5* forward: 5⁰-CTTCCGGGTTCAAGCAGTTC-3⁰, reverse: 5⁰-AAAATACGGCGGGGTGAGG-3⁰; *ABCC10* forward: 5⁰-TACCCTTGGTACCGCGAGA-3⁰, reverse: 5⁰-GTAACAGGCA CTGAGCACGG-3⁰. As a control, manually designed fragments of promoters not containing BRG1 binding motifs was used: *ABCC2* forward 5⁰-AGGTCAAGGCTGCAATGAAT-3⁰, reverse: 5⁰-CTGTC ATCGACCCAACCTTT-3⁰.

Protein co-immunoprecipitation

A549 and MDA-MB-231 PTX-resistant cells were washed three times with PBS and lysed on ice in IP buffer composed of 20 mM HEPES—KOH, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 20% glycerol, 0.1% NP-40 and protease inhibitors; sonicated with the ultrasonic homogenizer Bandelin Sonopuls (HD 2070; 10 impulses, 60%); and centrifuged (3,000 rpm, 4°C, 10 min). Supernatant was incubated with anti-HIF1a antibody and control IgG at 4°C for 2 h. For another 1 h, lysates were added with Dynabeads (10 µL); then, they were washed 5× with the IP buffer and suspended in RIPA buffer in RIPA buffer (supplemented with 1 mM PMSF and PIC) with 5% β-mercaptoethanol and gel loading buffer and heated at 70°C for 10 min. Beads were collected on a magnetic stand and supernatant was separated by SDS-PAGE electrophoresis followed by transfer of proteins on nitrocellulose membranes. BRG1, EP300, and HIF1a were detected on nitrocellulose membranes after overnight staining with corresponding primary antibodies (1:5,000) in Immobilon Signal Enhancer buffer. After subsequent staining with HRP-conjugated secondary antibodies (1:5,000 for antirabbit and 1:2,500 for anti-mouse antibodies; room temperature; 2 h) in

Immobilon Signal Enhancer, the signal was developed with the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate and pictures were acquired using ProXima 2750 (Isogen Life Science).

Resazurin toxicity assay

The day prior to transfection, cells were seeded at a density of 10,000 cells per well on 96-well black plates. After transfection and incubation with drugs, cells were incubated with resazurin solution (5 μ M) in the growth medium at 37°C for 2 h. The fluorescence that corresponds to the metabolic activity of living cells was measured with a fluorescence microplate reader (BioTek Synergy HTX, Biokom, Poland) at excitation 530 and emission 590 nm. The fluorescence value for control cells was assumed to be 100%.

Caspase 3/7 activity assay

The day prior to transfection, cells were seeded at a density of 2,000 cells per well on 384-well white plates. After transfection and incubation with inhibitor and PTX, cells were incubated with Caspase-Glo 3/7 Reagent (according to manufacturer protocol) or resazurin solution (5 μ M) in the growth medium at 37°C for 1 h. The luminescence that corresponds to caspase 3/7 activity and fluorescence (excitation 530 and emission 590 nm) that corresponds to the metabolic activity of living cells was measured with microplate reader (BioTek Synergy HTX, Biokom). The luminescence values were normalized to cell fluorescence in order to estimate the ratio between caspase activity and relative number of viable cells.

Statistical analysis

Data are shown as mean \pm standard deviation (SD). Parametric or non-parametric test was conducted after testing Gaussian distribution of data with the Shapiro-Wilk test. Student's t test or the Mann-Whitney test was used to calculate statistically significant differences between two samples, while one-way analysis of variance (ANOVA) or Kruskal-Wallis test followed by corresponding post hoc test was carried out to compare multiple samples. Statistics were calculated using GraphPad Prism 8.01 software. Statistically significant differences were marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, and *** when $p < 0.001$.

DATA AVAILABILITY

Original raw data files containing sequence reads and quality scores were submitted to the NCBI SRA database under the accession numbers: SRA: PRJNA1095909 and SRA: PRJNA1096152.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by National Centre for Research and Development, grant no. LIDER/22/0122/L-10/18/NCBR/2019 and University of Lodz under the program Excellence Initiative: Research University (IDUB), grant no. IDUB60/2021.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

K.G.: investigation, validation, formal analysis, and writing – original draft. K.K.-M.: investigation. S.M.: investigation and visualization, T.P.: investigation and data curation. M.B.: resources and writing – review & editing. A.R.: conceptualization, validation, investigation, data curation, resources, funding acquisition, project administration, writing – original draft, and writing – review & editing.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.omton.2025.201049>.

REFERENCES

- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Soerjomataram, I., and Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 74, 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.
- Sati, P., Sharma, E., Dhyani, P., Attri, D.C., Rana, R., Kiyekbayeva, L., Büsselberg, D., Samuel, S.M., and Sharifi-Rad, J. (2024). Paclitaxel and its semi-synthetic derivatives: comprehensive insights into chemical structure, mechanisms of action, and anti-cancer properties. *Eur. J. Med. Res.* 29, 90. <https://doi.org/10.1186/s40001-024-01657-2>.
- Maloney, S.M., Hoover, C.A., Morejon-Lasso, L.V., and Prosperi, J.R. (2020). Mechanisms of Taxane Resistance. *Cancers (Basel)* 12, 3323. <https://doi.org/10.3390/cancers12113323>.
- Skubník, J., Pavlíčková, V., Ruml, T., and Rimpelová, S. (2021). Current Perspectives on Taxanes: Focus on Their Bioactivity, Delivery and Combination Therapy. *Plants* 10, 569. <https://doi.org/10.3390/plants10030569>.
- Das, T., Anand, U., Pandey, S.K., Ashby, C.R., Assaraf, Y.G., Chen, Z.S., and Dey, A. (2021). Therapeutic strategies to overcome taxane resistance in cancer. *Drug Resist. Updates* 55, 100754. <https://doi.org/10.1016/j.DRUP.2021.100754>.
- Alalawy, A.I. (2024). Key genes and molecular mechanisms related to Paclitaxel Resistance. *Cancer Cell Int.* 24, 244. <https://doi.org/10.1186/S12935-024-03415-0>.
- Zhang, Q., Song, Y., Cheng, X., Xu, Z., Matthew, O.A., Wang, J.I.A., Sun, Z., and Zhang, X. (2019). Apatinib Reverses Paclitaxel-resistant Lung Cancer Cells (A549) Through Blocking the Function of ABCB1 Transporter. *Anticancer Res.* 39, 5461–5471. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.13739>.
- Oguri, T., Ozasa, H., Uemura, T., Bessho, Y., Miyazaki, M., Maeno, K., Maeda, H., Sato, S., and Ueda, R. (2008). MRP7/ABCC10 expression is a predictive biomarker for the resistance to paclitaxel in non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer Therapeut.* 7, 1150–1155. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-2088>.
- Melguizo, C., Prados, J., Luque, R., Ortiz, R., Caba, O., Alvarez, P.J., Gonzalez, B., and Aranega, A. (2012). Modulation of MDR1 and MRP3 gene expression in lung cancer cells after paclitaxel and carboplatin exposure. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 16624–16635. <https://doi.org/10.3390/ijms131216624>.
- Sprouse, A.A., and Herbert, B.-S. (2014). Resveratrol Augments Paclitaxel Treatment in MDA-MB-231 and Paclitaxel-resistant MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Anticancer Res.* 34, 5363–5374.
- McCorkle, J.R., Gorski, J.W., Liu, J., Riggs, M.B., McDowell, A.B., Lin, N., Wang, C., Ueland, F.R., and Kolesar, J.M. (2021). Lapatinib and poziotinib overcome ABCB1-mediated paclitaxel resistance in ovarian cancer. *PLoS One* 16, e0254205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254205>.
- Nemcová-Fürstová, V., Kopperová, D., Balusíková, K., Ehrlichová, M., Brynychová, V., Václavíková, R., Daniel, P., Soucek, P., and Kovár, J. (2016). Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 310, 215–228. <https://doi.org/10.1016/j.TAAP.2016.09.020>.
- O'Brien, C., Cavet, G., Pandita, A., Hu, X., Haydu, L., Mohan, S., Toy, K., Rivers, C. S., Modrusan, Z., Amler, L.C., and Lackner, M.R. (2008). Functional Genomics Identifies ABCC3 as a Mediator of Taxane Resistance in HER2-Amplified Breast Cancer. *Cancer Res.* 68, 5380–5389. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0234>.
- Hou, Y., Zhu, Q., Li, Z., Peng, Y., Yu, X., Yuan, B., Liu, Y., Liu, Y., Yin, L., Peng, Y., et al. (2017). The FOXM1–ABCC5 axis contributes to paclitaxel resistance in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cell Death Dis.* 8, e2659. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.53>.

15. Gronkowska, K., Michlewska, S., and Robaszekiewicz, A. (2023). Activity of Lysosomal ABCC3, ABCC5 and ABCB10 is Responsible for Lysosomal Sequestration of Doxorubicin and Paclitaxel-Oregongreen488 in Paclitaxel-Resistant Cancer Cell Lines. *Cell. Physiol. Biochem.* 57, 360–378. <https://doi.org/10.33594/00000663>.
16. Gronkowska, K., Michlewska, S., Ploszaj, T., Strachowska, M., Stępien, A., Borowiec, M., Bednarek, A., and Robaszekiewicz, A. (2025). BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel. Preprint at bioRxiv 57, 360. <https://doi.org/10.1101/2025.05.01.651609>.
17. Wang, F., Marshall, C.B., and Ikura, M. (2013). Transcriptional/epigenetic regulator CBP/p300 in tumorigenesis: structural and functional versatility in target recognition. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 3989–4008. <https://doi.org/10.1007/S00018-012-1254-4>.
18. Sobczak, M., Pietrzak, J., Tomasz, P., and Robaszekiewicz, A. (2020). BRG1 Activates Proliferation and Transcription of Cell Cycle-Dependent Genes in Breast Cancer Cells. *Cancers (Basel)* 12, 1–18. <https://doi.org/10.3390/cancers12020349>.
19. Wu, Q., Sharma, S., Cui, H., LeBlanc, S.E., Zhang, H., Muthuswami, R., Nickerson, J. A., and Imbalzano, A.N. (2016). Targeting the chromatin remodeling enzyme BRG1 increases the efficacy of chemotherapy drugs in breast cancer cells. *Oncotarget* 7, 27158–27175. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8384>.
20. Liu, H., Yue, L., Hong, W., and Zhou, J. (2024). SMARCA4 (BRG1) activates ABCC3 transcription to promote hepatocellular carcinogenesis. *Life Sci.* 347, 122605. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122605>.
21. Strachowska, M., Gronkowska, K., Michlewska, S., and Robaszekiewicz, A. (2021). CBP/p300 Bromodomain Inhibitor-I-CBP112 Declines Transcription of the Key ABC Transporters and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapy Drugs. *Cancers (Basel)* 13, 4614. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13184614>.
22. Ferrie, J.J., Karr, J.P., Graham, T.G.W., Dailey, G.M., Zhang, G., Tjian, R., and Darzacq, X. (2024). p300 is an obligate integrator of combinatorial transcription factor inputs. *Mol. Cell* 84, 234–243.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.12.004>.
23. Sanchez, J.C., Zhang, L., Evoli, S., Schnicker, N.J., Nunez-Hernandez, M., Yu, L., Wereszczynski, J., Pufall, M.A., and Musselman, C.A. (2020). The molecular basis of selective DNA binding by the BRG1 AT-hook and bromodomain. *Biochim. Biophys. Acta. Gene Regul. Mech.* 1863, 194566. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2020.194566>.
24. Hou, Y., Dong, Z., Zhong, W., Yin, L., Li, X., Kuerban, G., and Huang, H. (2022). FOXM1 Promotes Drug Resistance in Cervical Cancer Cells by Regulating ABCC5 Gene Transcription. *BioMed Res. Int.* 2022, 3032590. <https://doi.org/10.1155/2022/3032590>.
25. Huang, C., Zhang, X., Jiang, L., Zhang, L., Xiang, M., and Ren, H. (2019). FoxM1 Induced Paclitaxel Resistance via Activation of the FoxM1/PHB1/RAF-MEK-ERK Pathway and Enhancement of the ABCA2 Transporter. *Mol. Ther. Oncolytics* 14, 196–212. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2019.05.005>.
26. Li, Y., Sun, J., Gao, S., Hu, H., and Xie, P. (2018). HOXB4 knockdown enhances the cytotoxic effect of paclitaxel and cisplatin by downregulating ABC transporters in ovarian cancer cells. *Gene* 663, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.033>.
27. Si, X., Gao, Z., Xu, F., and Zheng, Y. (2020). SOX2 upregulates side population cells and enhances their chemoresistant ability by transactivating ABCC1 expression contributing to intrinsic resistance to paclitaxel in melanoma. *Mol. Carcinog.* 59, 257–264. <https://doi.org/10.1002/mc.23148>.
28. Mukherjee, P., Gupta, A., Chattopadhyay, D., and Chatterji, U. (2017). Modulation of SOX2 expression delineates an end-point for paclitaxel-effectiveness in breast cancer stem cells. *Sci. Rep.* 7, 9170. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08971-2>.
29. Nian, F., Zhu, J., and Chang, H. (2019). Long non-coding RNA ANGPTL1-3 promotes multiple myeloma bortezomib resistance by sponging miR-30a-3p to activate c-Maf expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 514, 1140–1146. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.05.078>.
30. Flamant, L., Notte, A., Ninane, N., Raes, M., and Michiels, C. (2010). Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia. *Mol. Cancer* 9, 191. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-191>.
31. Huang, L., Ao, Q., Zhang, Q., Yang, X., Xing, H., Li, F., Chen, G., Zhou, J., Wang, S., Xu, G., et al. (2010). Hypoxia induced paclitaxel resistance in human ovarian cancers via hypoxia-inducible factor 1 α . *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 136, 447–456. <https://doi.org/10.1007/s00432-009-0675-4>.
32. Xu, K., Zhan, Y., Yuan, Z., Qiu, Y., Wang, H., Fan, G., Wang, J., Li, W., Cao, Y., Shen, X., et al. (2019). Hypoxia Induces Drug Resistance in Colorectal Cancer through the HIF-1 α /miR-338-5p/IL-6 Feedback Loop. *Mol. Ther.* 27, 1810–1824. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.05.017>.
33. Liu, Y., Bernauer, A.M., Yingling, C.M., and Belinsky, S.A. (2012). HIF1 α regulated expression of XPA contributes to cisplatin resistance in lung cancer. *Carcinogenesis* 33, 1187–1192. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs142>.
34. Roncuzzi, L., Pancotti, F., and Baldini, N. (2014). Involvement of HIF-1 α activation in the doxorubicin resistance of human osteosarcoma cells. *Oncol. Rep.* 32, 389–394. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3181>.
35. Hua, T., Wang, R.-M., Zhang, X.-C., Zhao, B.-B., Fan, S.-B., Liu, D.-X., and Wang, W. (2021). ZNF76 predicts prognosis and response to platinum chemotherapy in human ovarian cancer. *Biosci. Rep.* 41, BSR20212026. <https://doi.org/10.1042/BSR20212026>.
36. Choi, J.D., Kim, T.J., Jeong, B.C., Jeon, H.G., Jeon, S.S., Kang, M.Y., Yeom, S.Y., and Seo, S.I. (2021). ISL1 promotes enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC) through epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Sci. Rep.* 11, 21984. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01003-0>.
37. Zhang, Y., Wang, L., Gao, P., Sun, Z., Li, N., Lu, Y., Shen, J., Sun, J., Yang, Y., Dai, H., and Cai, H. (2018). ISL1 promotes cancer progression and inhibits cisplatin sensitivity in triple-negative breast cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* 42, 2343–2352. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3842>.
38. Gu, J., Milligan, J., and Huang, L.E. (2001). Molecular mechanism of hypoxia-inducible factor 1 α -p300 interaction. A leucine-rich interface regulated by a single cysteine. *J. Biol. Chem.* 276, 3550–3554. <https://doi.org/10.1074/JBC.M009522200/ASSET/7A138DC6-1652-4655-A943-50E5A6F969FA/MAIN.ASSETS/GR4.JPG>.
39. Tang, Z., Kang, B., Li, C., Chen, T., and Zhang, Z. (2019). GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Res.* 47, W556–W560. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz430>.
40. Gronkowska, K., and Robaszekiewicz, A. (2024). Genetic dysregulation of EP300 in cancers in light of cancer epigenome control – perspectives of specific targeting of p300 proficient and deficient cancers. *Mol. Ther. Oncol.* 32, 200871. <https://doi.org/10.1016/j.omton.2024.200871/ASSET/FC0F14FC-216D-4F53-882F-A32A42F56E24/MAIN.ASSETS/GR5.JPG>.
41. Fekete, J.T., and Gyorffy, B. (2019). ROCplot.org: Validating predictive biomarkers of chemotherapy/hormonal therapy/anti-HER2 therapy using transcriptomic data of 3,104 breast cancer patients. *Int. J. Cancer* 145, 3140–3151. <https://doi.org/10.1002/IJC.32369>.
42. Woo, Y., Oh, J., and Kim, J.-S. (2017). Suppression of Nrf2 Activity by Chestnut Leaf Extract Increases Chemosensitivity of Breast Cancer Stem Cells to Paclitaxel. *Nutrients* 9, 760. <https://doi.org/10.3390/nu9070760>.
43. Li, K., Li, M., Luo, Z., Mao, Y., Yu, Y., He, Y., Zhou, J., Fei, Y., Pei, Y., and Cai, K. (2020). Overcoming the hypoxia-induced drug resistance in liver tumor by the concurrent use of apigenin and paclitaxel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 526, 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.010>.
44. Xie, J., Li, D.-W., Chen, X.-W., Wang, F., and Dong, P. (2013). Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 α and MDR1/P-glycoprotein in laryngeal carcinoma tissue and hypoxic Hep-2 cells. *Oncol. Lett.* 6, 232–238. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1321>.
45. Chen, J., Ding, Z., Peng, Y., Pan, F., Li, J., Zou, L., Zhang, Y., and Liang, H. (2014). HIF-1 α Inhibition Reverses Multidrug Resistance in Colon Cancer Cells via Downregulation of MDR1/P-Glycoprotein. *PLoS One* 9, e98882.
46. Lv, Y., Zhao, S., Han, J., Zheng, L., Yang, Z., and Zhao, L. (2015). Hypoxia-inducible factor-1 α induces multidrug resistance protein in colon cancer. *Oncotargets Ther.* 8, 1941–1948. <https://doi.org/10.2147/OTT.S82835>.
47. Doublier, S., Belisario, D.C., Polimeni, M., Annaratone, L., Riganti, C., Allia, E., Ghigo, D., Bosia, A., and Sapino, A. (2012). HIF-1 activation induces doxorubicin resistance in MCF7 3-D spheroids via P-glycoprotein expression: a potential model of the chemo-resistance of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *BMC Cancer* 12, 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-4>.

48. Strachowska, M., Gronkowska, K., Sobczak, M., Grodzicka, M., Michlewska, S., Kolacz, K., Sarkar, T., Korszun, J., Ionov, M., and Robaszkiewicz, A. (2023). I-CBP112 declines overexpression of ATP-binding cassette transporters and sensitized drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines to chemotherapy drugs. *Biomed. Pharmacother.* *168*, 115798. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115798>.
49. Galaxy Community (2022). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Res.* *50*, W345–W351. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac247>.
50. Amemiya, H.M., Kundaje, A., and Boyle, A.P. (2019). The ENCODE Blacklist: Identification of Problematic Regions of the Genome. *Sci. Rep.* *9*, 9354. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45839-z>.
51. Bailey, T.L., Johnson, J., Grant, C.E., and Noble, W.S. (2015). The MEME Suite. *Nucleic Acids Res.* *43*, W39–W49. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV416>.
52. Goldman, M.J., Craft, B., Hastie, M., Repecka, K., McDade, F., Kamath, A., Banerjee, A., Luo, Y., Rogers, D., Brooks, A.N., et al. (2020). Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat. Biotechnol.* *38*, 675–678. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0546-8>.
53. Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B.E., Sumer, S.O., Aksoy, B.A., Jacobsen, A., Byrne, C.J., Heuer, M.L., Larsson, E., et al. (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* *2*, 401–404. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>.
54. Menyhart, O., Kothalawala, W.J., and Gyorffy, B. (2024). A gene set enrichment analysis for the cancer hallmarks. *J. Pharm. Anal.* *15*, 101065. <https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2024.101065>.
55. Sobczak, M., Strachowska, M., Gronkowska, K., and Robaszkiewicz, A. (2022). Activation of ABCC Genes by Cisplatin Depends on the CoREST Occurrence at Their Promoters in A549 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Cancers (Basel)* *14*, 894. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14040894/S1>.
56. Wisnik, E., Ploszaj, T., and Robaszkiewicz, A. (2017). Downregulation of PARP1 transcription by promoter-associated E2F4-RBL2-HDAC1-BRM complex contributes to repression of pluripotency stem cell factors in human monocytes. *Sci. Rep.* *7*, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10307-z>.

Supplemental information

**HIF1A, BRG1, and p300 interaction confers
paclitaxel-induced drug resistance by enabling
the overexpression of *ABCC* genes**

Karolina Gronkowska, Kinga Kołacz-Milewska, Sylwia Michlewska, Tomasz Płoszaj, Maciej Borowiec, and Agnieszka Robaszkiewicz

gene expression RNAseq - Batch effects normalized mRNA data

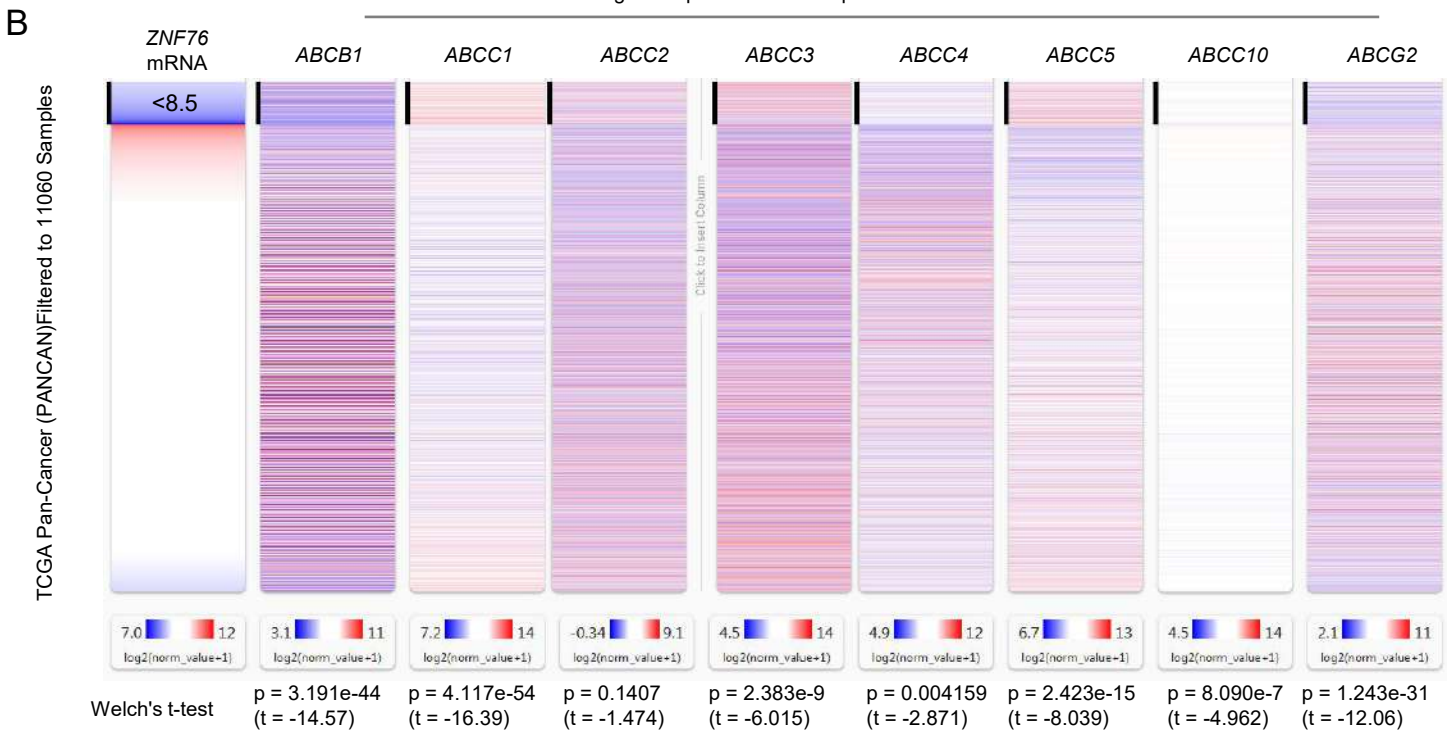
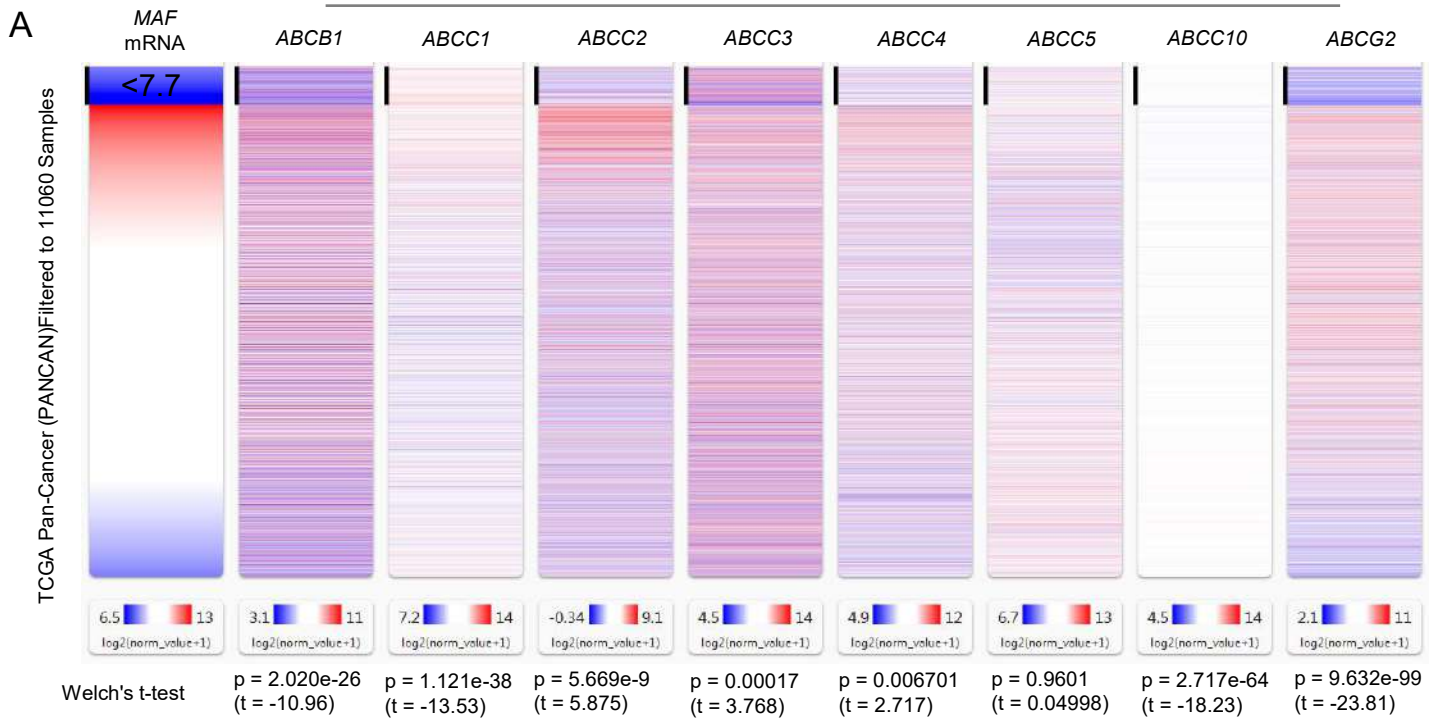


Figure S1 Impact of MAF and ZNF76 on expression of some ABC genes in human cancers.

Pan-Cancer (PANCAN) dataset was used to compute the mRNA level of selected ABC genes with respect to MAF (A) and ZNF7 (B) transcription yield in Xena Functional Genomics Explorer.

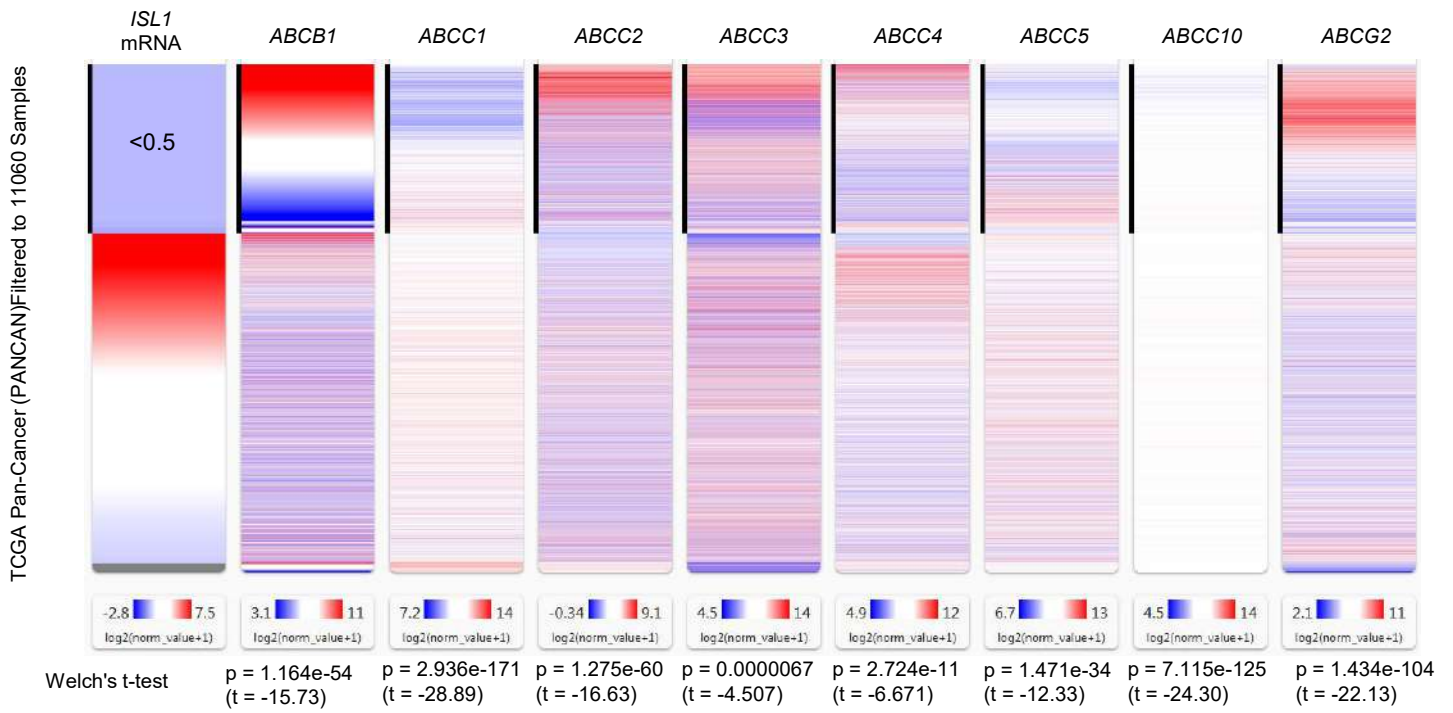
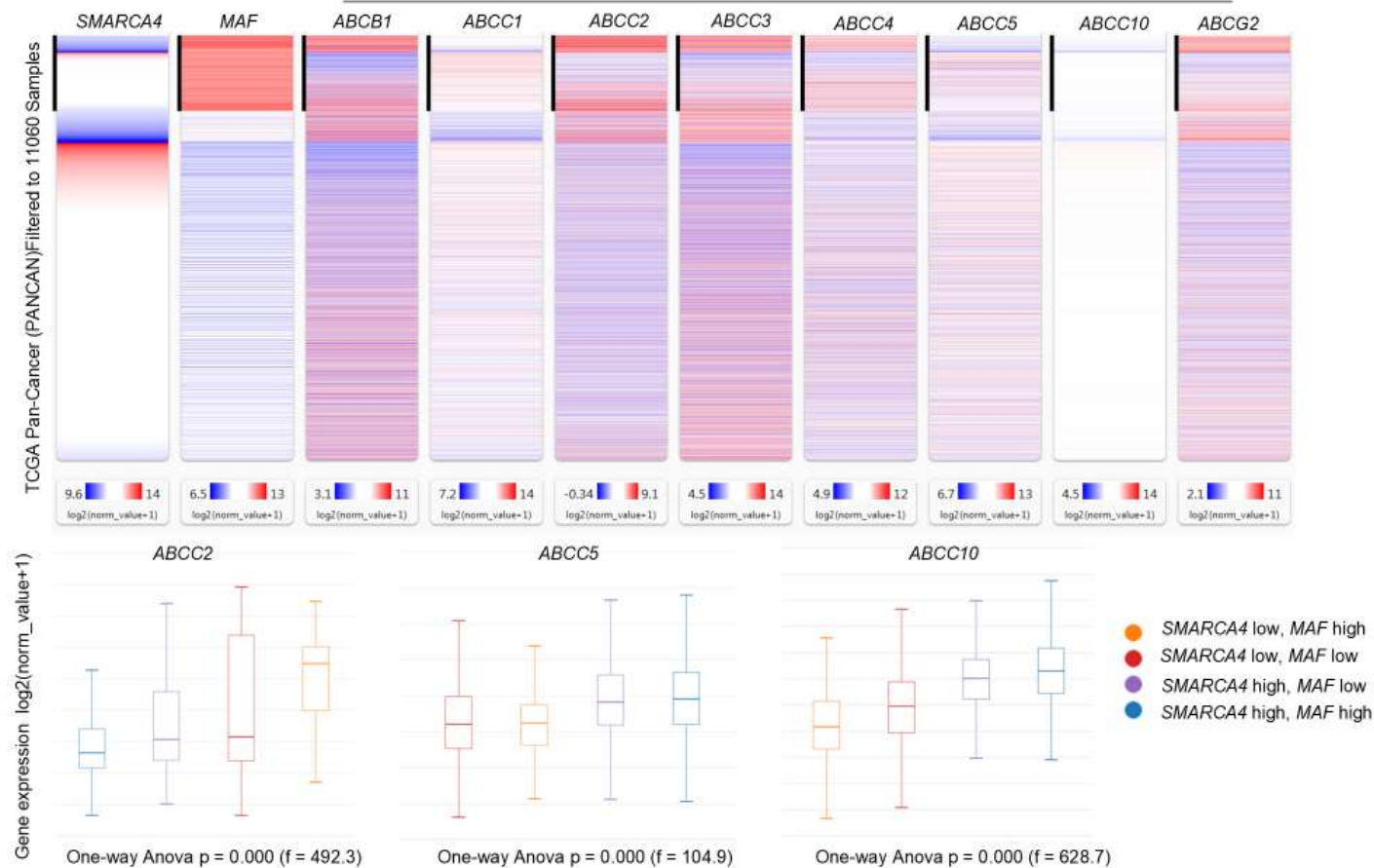


Figure S2 Impact of ISL on expression of some ABC genes in human cancers.

Pan-Cancer (PANCAN) dataset was used to compute the mRNA level of selected ABC genes with respect to ISL transcription yield in Xena Functional Genomics Explorer.

A



B

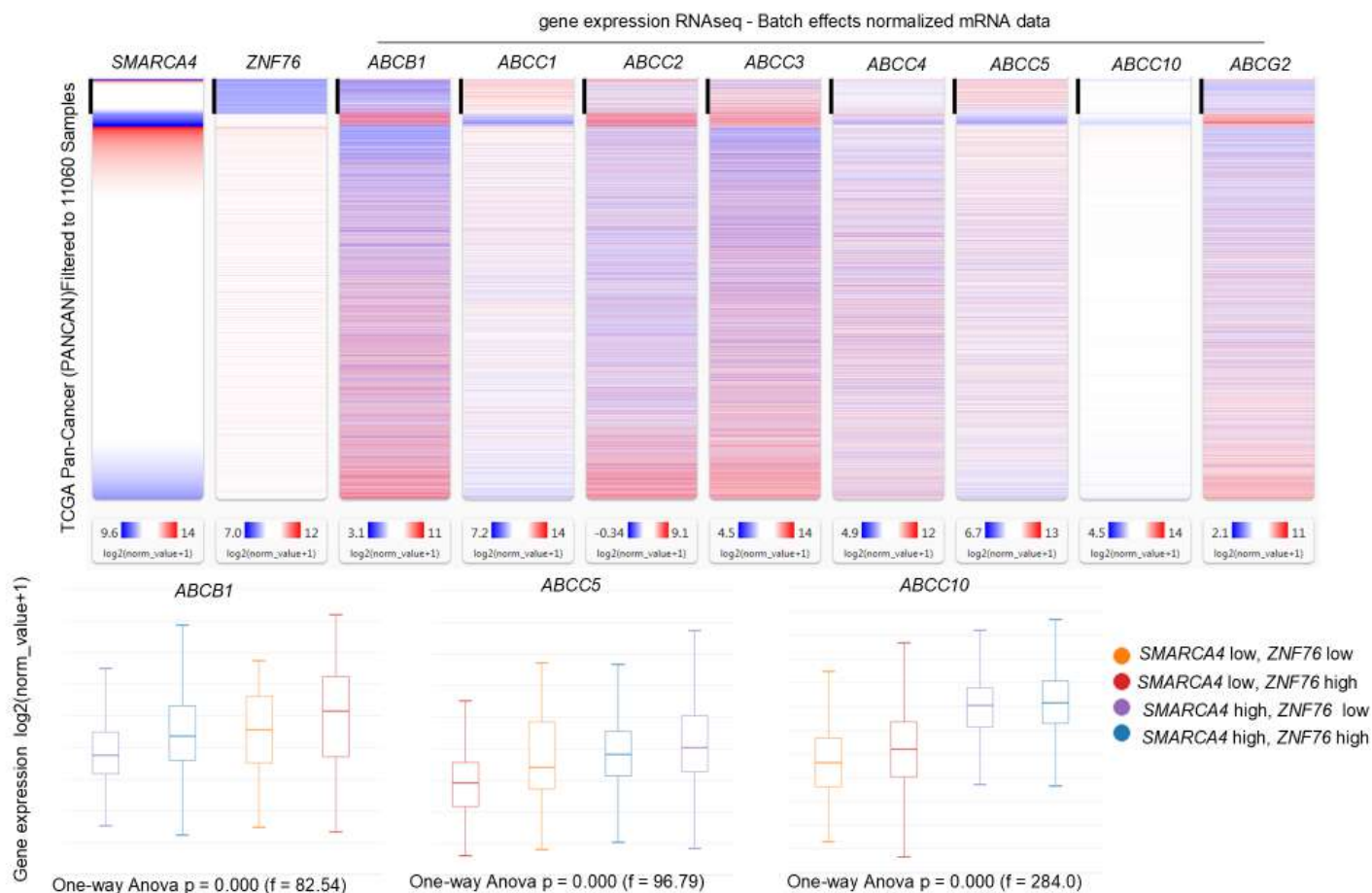


Figure S3 Correlation between mRNA level of MAF, ZNF76, SMARCA4 and some ABC genes in human cancers.

Pan-Cancer (PANCAN) dataset was used to compute the mRNA level of SMARCA4 and selected ABC genes with respect to MAF (A) or ZNF76 (B) transcription yield in Xena Functional Genomics Explorer.

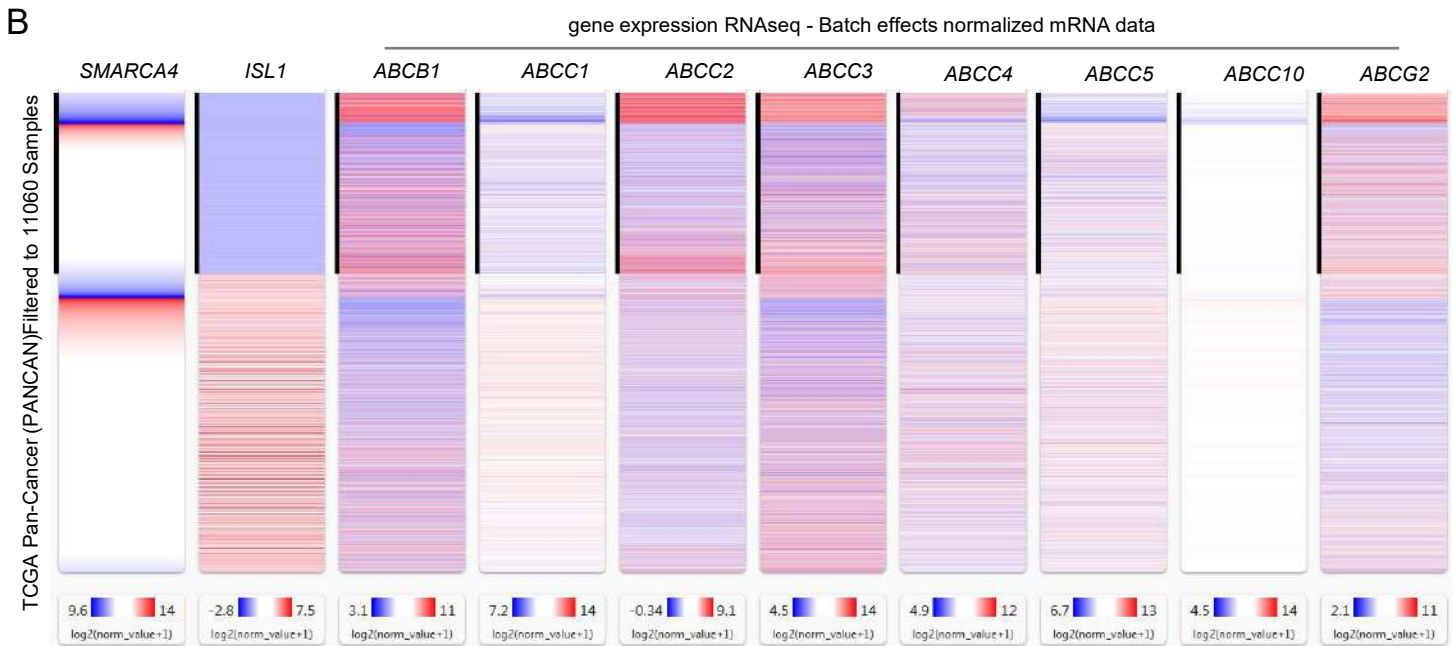
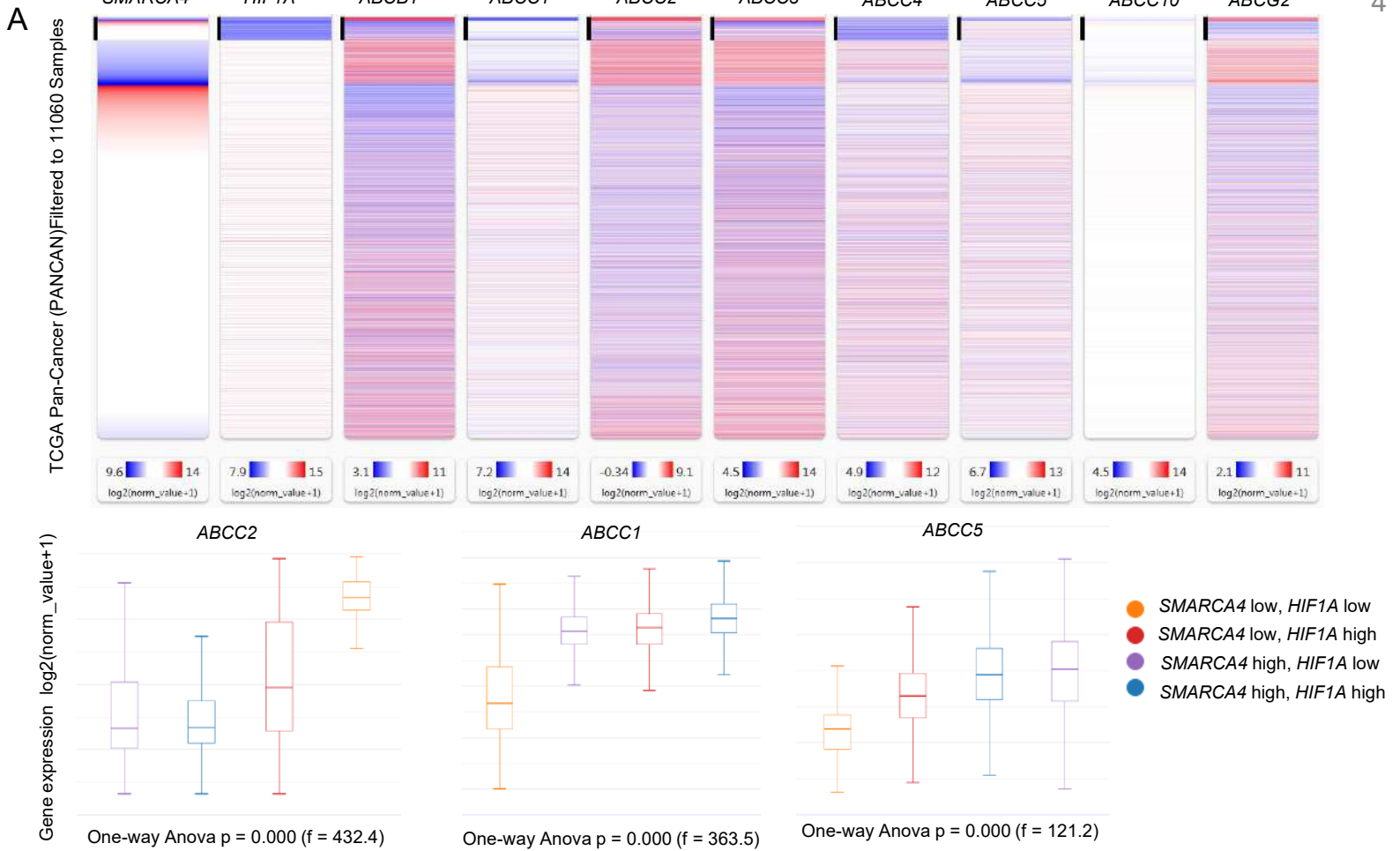


Figure S4 Correlation between mRNA level of HIF1, ISL, SMARCA4 and some ABC genes in human cancers.

Pan-Cancer (PANCAN) dataset was used to compute the mRNA level of SMARCA4 and selected ABC genes with respect to HIF1 (A) or ISL (B) transcription yield in Xena Functional Genomics Explorer.

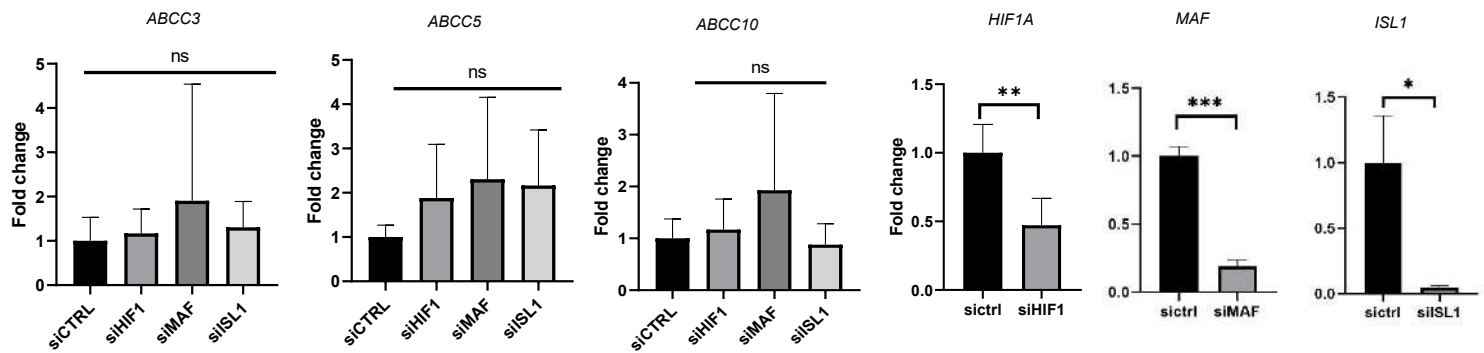
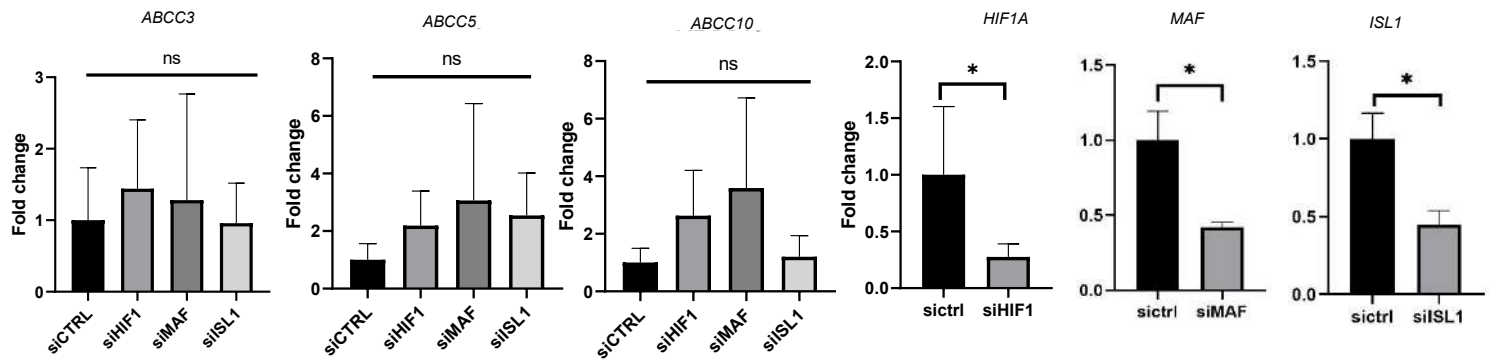


Figure S5. Impact of HIF1A on ABCC transporter expression in A549 and MDA-MB-231 paclitaxel sensitive cells

mRNA level of some ABC genes was compared in cells following their transfection with siCTRL or siHIF1A, siMAF, siISL1 (72 h) by real-time PCR in MDA-MB-231 (A) and A549 (B) cells. Raw values were normalized first to housekeeping genes (ACTB, GAPDH and HPRT1), and then the ratio was assumed as 1 in control sample. The difference between two means was tested with Student's t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$.

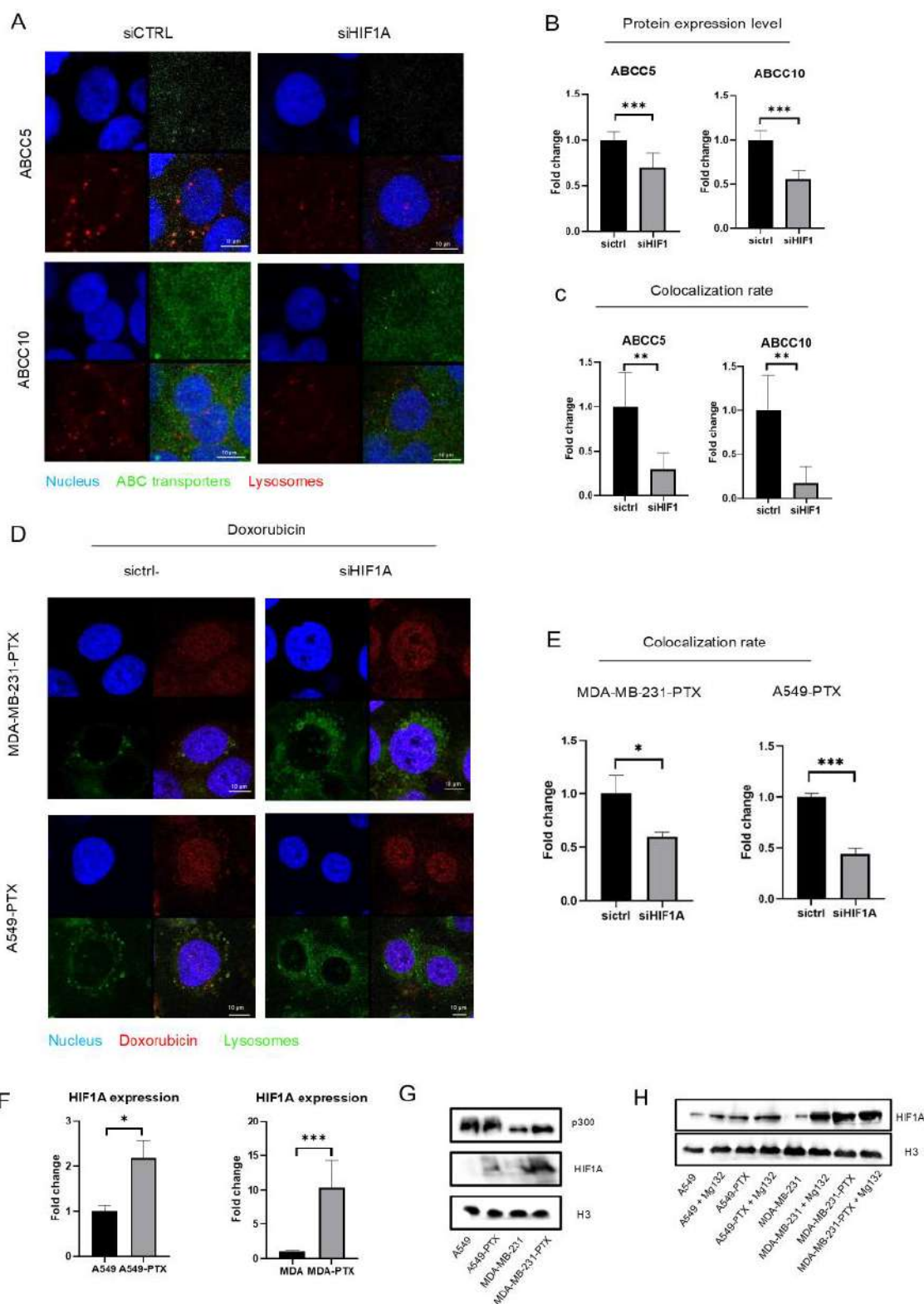


Figure S6. Transient silencing of HIF1A reduces expression on ABCC transporters overrepresented in lysosomes of paclitaxel-resistant cells and decreases drug lysosomal uptake

(A) The expression and intracellular localization of ABCC5 and ABCC10 in HIF1A proficient and deficient A549-PTX cells were analyzed by immunocytochemistry followed by confocal microscopy. Green fluorescence corresponds to ABCC5 and ABCC10, DNA was stained with DAPI (blue), whereas lysosomes with LysoTracker (red). The green fluorescence intensity, which corresponds to intracellular ABCC5 and ABCC10 protein abundance (B), and colocalization between ABCC5 or ABCC10 and lysosomes (C) were determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student's t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$. (D) HIF1A causes lysosomal sequestration of doxorubicin in lysosomes of paclitaxel-resistant cancer cell lines. Colocalization of autofluorescent doxorubicin and lysosomes was compared between HIF1A proficient and deficient cells. Doxorubicin is marked red, lysosomes in green (LysoTracker Deep Red), DNA in blue (DAPI). The colocalization (E) was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student's t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$. (F) Comparison of HIF1A mRNA level in non-resistant and paclitaxel-resistant A549 and MDA-MB-231 cells by real-time PCR. Raw values were normalized first to housekeeping genes (ACTB, GAPDH and HPRT1), and then the ratio was assumed as 1 in control sample. The difference between two means was tested with Student's t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$. (G) Comparison of HIF1A and p300 protein level in non-resistant and paclitaxel-resistant A549 and MDA-MB-231 cells was studied by Western Blot. Histone H3 was used as a loading control. (H) The HIF1A stability was compared in basal and paclitaxel-resistant cells control and cells pre-treated with proteasome inhibitor (MG132; 1 μ M). HIF1A protein level was studied by Western Blot. Histone H3 was used as a loading control.

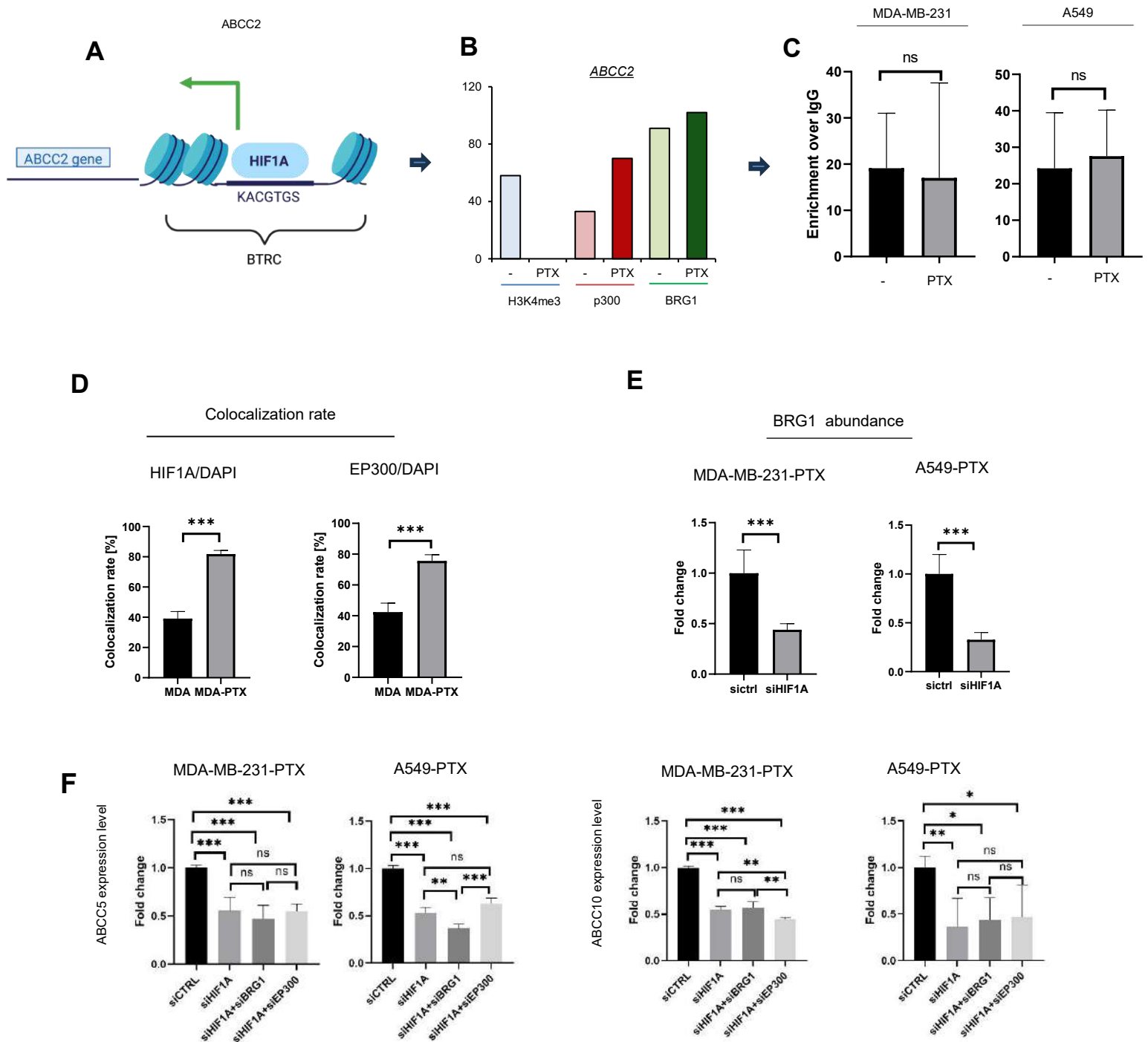


Figure S7. BRG1 and p300 associate with HIF1A in promoters of transcriptionally active ABCC genes

(A) Diagram presenting HIF1A binding motif (“KACGTGS”) at the promoter of ABCC2 with respect to transcription start site (TSS). (B) Column chart presents mapped reads of H3K4me3, p300 and BRG1 counted on HRE motif (± 1 kbp) the promoter of ABCC2 in resistant and non-resistant cells. (C) HIF1A is not enriched at the promoter of ABCC2 in paclitaxel-resistant A549 and MDA-MB-231 phenotypes. The abundance of HIF1A at the gene promoters was compared and quantified by ChIP-qPCR in basal and paclitaxel resistant cell lines. Raw values were normalized to IgG. The difference between two means was tested with Student’s t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$. (D) The colocalization between HIF1A and p300 and DAPI representing proteins abundance in chromatin was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student’s t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$. (E) The BRG1 abundance on chromatin in HIF1A silencing MDA-PTX and A549-PTX cells. The fluorescence intensity of labelled-antibodies was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. The difference between two means was tested with Student’s t-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$. (F) HIF1A and BRG1 as well as HIF1A and p300 co-silencing do not act synergistically and phenocopy the effect of single HIF1A silencing on transcription of ABCC5 and ABCC10 in paclitaxel-resistant MDA-MB-231 and A549 cells. mRNA level was compared in cells 72h after their transfection with siCTRL, siHIF1A alone or in combination with siSMARACA4 and siEP300 by real-time PCR in paclitaxel resistant MDA-MB-231 and A549 cells. Raw values were normalized first to housekeeping genes (ACTB, GAPDH and HPRT1), and then the ratio was assumed as 1 in control sample. The difference between means was tested using one-way ANOVA Kruskal-Wallis test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, ***

1
2
3 **P53 supresses transcription of the p300-E2F1-dependent gene subset by maintaining**
4 **KDM5B associated with gene promoters**
5

6
7 Karolina Gronkowska^{1,2}, Kinga Kołacz-Milewska^{1,2}, Sylwia Michlewska³, Agnieszka
8 Robaszkiewicz^{1*}
9

10
11 ¹ Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz,
12 Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland

13
14 ² Bio-Med-Chem Doctoral School of the University of Lodz and Lodz Institutes of the Polish Academy of Sciences,
15 University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland

16
17 ³ Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques, Faculty of Biology and Environmental
18 Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland.

19
20 *Corresponding author

21
22 Agnieszka Robaszkiewicz, Ph.D., D. Sc., associate professor

23
24 Department of General Biophysics, University of Lodz

25
26 Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland

27
28 Phone +48 426354449, email: agnieszka.robaszkiewicz@biol.uni.lodz.pl
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract:

p53 is a transcription activator or repressor that acts mainly by having direct control over the expression of CDK inhibitor – p21 in response to DNA damage. In this study, molecular evidence was provided for the occurrence of p53 at the subset of E2F1-driven promoters and their suppression, despite the co-occurrence of p53 with p300. P53 repressed promoters were characterized by relatively high nucleosome density and demethylation of H3K4, followed by low H3K27 acetylation and trimethylation of H3K4. Induction of the ATM/ATR-Chek1/2-p53 pathway by sub-lethal doses of cisplatin caused the release of p53 from gene promoters, chromatin relaxation and the gain of transcription permissive histone marks. Mechanistically, p53 maintained the KDM5B that is associated with gene promoters, thereby conditioning the demethylation of H3K4me3. P53 formed an immunoprecipitable complex with KDM5B, E2F1, p300 and H3K4me2 in intact cells, which decomposed with cisplatin and substantially increased the level of H3K4me3 in the p300 interactome. The extrusion of KDM5B from the chromatin was triggered by cisplatin, transient p53 silencing or KDM5B inhibition, also enabled p300 enrichment and increased gene transcription. In summary, p53 directly suppressed the subset of E2F1-driven genes in proliferating cells by maintaining KDM5B associated with gene promoters and inhibiting p300-mediated transcription.

Keywords: DNA damage response, cisplatin, p53, p300, KDM5B

Introduction:

Tumor suppressor p53 is best known as a transcription factor that controls cell fate after multiple stress signals, including DNA damage, oncogenic stress, replication stress, oxidative stress, hypoxia and ribosomal stress. The core set of the p53 known target genes have diverse biological functions such as apoptosis, cell cycle arrest, differentiation, metabolism, autophagy and DNA repair (1). p53 is a transcription factor that binds to the genome by its DNA recognition motif, the p53 response element (p53 RE), and facilitating or preventing the formation of active transcription complexes thereby activating or repressing genes (1,2). Despite protracted studies on this protein, there has not been a proven universal model of p53-dependent gene activation or suppression, with these 2 opposed impacts seeming to be conditional and signal-specific. The sequence differences in p53REs were thought to determine gene induction or repression, but later genome-wide data has demonstrated that p53 is actually associated with transcriptional activation at the binding sites (2). The repression of genes transcriptionally controlled by the E2F family of TFs is frequently assigned to indirect p53-dependent transactivation of p21 (*CDKN1A*), which inhibits CDK and stops mitotic divisions by recruiting the transcriptional repressor Rb to E2F1-driven promoters. p53 also directly transactivates *E2F7* that encodes a repressive member of the E2F family. p53 also activates the expression of various miRNAs and long non-coding RNAs, which in turn impacts transcription yield (1,3). The analysis of the p53 direct transcriptional program using Global Run-On sequencing (GRO-seq) showed that p53 represses a subset of its activation targets (e.g. *PTP4A1*, *HES2*, *GJB5*) before its activation in the steady state of proliferating cells (4). However, many concerns have been raised regarding the mechanism by which p53 is localized to the repressed promoters and how it switches from activation to repression. The co-repressor interaction with chromatin remains controversial, despite good experimental evidence. The tight link between the p53 mode of action and enhancer activation may explain the lack of perfect overlap between p53-dependent genes among various cell types and conditions, often referred to as proof of misinterpreted p53 targets.

Since p53 peaks are usually smaller on repressed genes when compared to activated ones, Peugeot and Selivanova suggested that the low occupancy of p53, probably at the repressed promoter, reflected a more transient binding mode that was necessary to establish the repressive chromatin landscape but not to maintain it (1). Furthermore, p53-repressed genes frequently displayed lower affinity p53 RE in their promoters, whereas most cell types which are independent of the type of activating stimuli largely comprise of high affinity p53 RE. Regarding the p53 repressive role and its interaction with DNA in a steady state, we identified and characterized some of the p53 repressed gene promoters in proliferating cells. MCF7 breast cancer cells were used as they express wild-type p53. These cells were characterized

1
2
3 by a p53-dependent resistance to cisplatin, proved by the sensitization of the cells to drugs
4 after the disruption of p53 by human papilloma virus (HPV) infections (5). To avoid the
5 complexity caused by cell cycle inhibition and likely impact of E2F-Rb at gene transcription,
6 the cells were exposed to cisplatin at a dose which induced the arrest of mitotic divisions or
7 cell death, but at the same time was high enough to activate ATM/ATR-Chek1/2-p53 pathway
8 and trigger the redistribution of p53 in the genome.
9
10
11
12

13 The cytotoxic effect of the anticancer drug cisplatin arises through the formation of intra- and
14 inter-strand DNA and DNA-protein crosslinks blocking the progression of DNA replication
15 during the S-phase and thereby causing double-strand breaks (DSBs) that gave rise to
16 insertions, deletions or even translocations (6,7). While ataxia telangiectasia mutated (ATM)
17 was activated by DSBs, ATM-related (ATR) was activated by stalled DNA replication forks after
18 cisplatin treatment (7). Phosphorylation of downstream targets, including Chek1/2 kinases and
19 p53, lead to p21-mediated arrest in G1, whereas the phosphorylation of H2Ax at sites of DNA
20 lesions enabled the recruitment of DNA repair proteins (8). Although treatment conditions were
21 chosen to avoid cell cycle inhibition, the chromatin rearrangement at the site of p53 binding in
22 a steady state was observed. Previous reports linked p53-dependent gene suppression with
23 the recruitment of corepressors such as histone deacetylases (HDACs), to inverted (head-to-
24 tail) or imperfect p53REs that imparted repressive activities on p53 and enhanced competition
25 with transcriptional activators by p53 (1,3). Several factors were suggested that cooperated
26 with p53 mediated repression, including NF-Y, mSin3a and HDAC1. The competition of p53
27 with SP1 for the repression of genes encoding telomerase and nestin was also reported (1).
28 In this paper we provided experimental, mechanical evidence on the role of p53 in KDM5B-
29 mediated chromatin remodelling and repression of genes that were activated by p300 and
30 characterized by motifs for the E2F family of transcription factors in their promoters. Attention
31 was paid to any functional p53-p300 crosstalk, as p53-p300 interaction triggered by cisplatin
32 has previously been described where p53 emerged as being required to recruit p300 to the
33 promoter of *ABCC10* and hence, served as a gene activator (9). CITED2/p300 recruitment by
34 p53 to the promoter of the DNA repair gene *ERCC1* in response to cisplatin facilitated DNA
35 repair is another example (7). In this current model, the cisplatin-induced extrusion of p53 from
36 the promoters of some E2F-dependent genes, which were characterized by the presence of
37 p53 binding motifs, upregulated gene transcription in a way similar to p53 silencing. In the
38 subset of p53 repressed genes, we observed previously undescribed relationships between
39 p53 interaction with DNA, lysine acetylation and methylation of histone H3, resulting from the
40 physical and functional interaction between p53, p300 and KDM5B.
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2. Methods:

2.1 Materials

Breast cancer cell line MCF7 was purchased from ATCC. DMEM High Glucose w/ L-Glutamine w/ Sodium Pyruvate, fetal bovine serum and antibiotics (penicillin and streptomycin) were from Biowest (CytoGen, Zgierz, Poland). Resazurin sodium salt (#R7017), DAPI (#10236276001) cisplatin (#232120), KU-60019 (SML1416) and sodium butyrate (#303410) were from Sigma Aldrich (Poznan, Poland). C646 (#10549), PBIT (#16272), GSK-LSD1 (#16439) from Cayman Chemical, were ordered in Biokom (Janki/Warsaw, Poland). siRNA Control (sc-37007) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (AMX, Lodz, Poland). Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide, oligonucleotides for Real-time PCR, TP53 Silencer Select siRNA (#106140), Lipofectamine RNAiMAX, OptiMem, Dynabeads™ Protein G, UltraPure™ Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1, v/v), TRI Reagent™, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate, PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#01154870), Pierce™ Protease Inhibitor Tablets (EDTA-free; PIC), Pierce™ Phosphatase Inhibitor Mini Tables, SlowFade™ Glass Soft-set Antifade Mountant (with DAPI), Phosphoserine/threonine/tyrosine polyclonal antibody (#XF342757), Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 546 (#A-11010), PowerUp™ SYBR® Green Master Mix, were from ThermoFisher Scientific (ThermoFisher Scientific, Warsaw, Poland). DNA Damage Antibody Sampler Kit (#9947), p300 (D2X6N) Rabbit mAb (#54062), p53 (7F5) Rabbit mAb (#2527), p53 (1C12) Mouse mAb (#2524), E2F1 Rabbit Ab (#3742), JARID1B (E2X6N) Rabbit mAb (#15327), PCNA (D3H8P) XP® Rabbit mAb (#13110), Acetylated-Lysine Rabbit Ab (#9441), Mono-Methyl Histone H3 (K4) (D1A9) XP® Rabbit mAb (#5326), Di-Methyl-Histone H3 (K4) (C64G9) Rabbit mAb (#9725), Tri-Methyl-Histone H3 (Lys4) (C42D8) Rabbit mAb (#9751), Acetyl-Histone H3 (Lys27) (D5E4) XP® Rabbit mAb (#8173), Histone H3 Rabbit Ab (#9715), Histone H3 (D2B12) XP® Rabbit mAb (ChIP Formulated) (#4620), anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (#7074), Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (#7076), Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate) (#4412), Anti-mouse IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (PE Conjugate) (#59997), were from Cell Signaling Technologies (LabJOT, Warsaw, Poland). NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep with Sample Purification Beads (#E7104), NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (#E7490), NEBNext Ultra II RNA First Strand Synthesis Module (#E7771), NEBNext Ultra II Non-Directional RNA Second Strand Module (#E6111), NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep with Sample Purification Beads (#E7103) and NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 3) (#E7710) were from New England Biolabs (LabJOT, Warsaw, Poland). MGIEasy PCR-Free DNA Library Prep Set and

1
2
3 DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Kit (FCL SE100) were from Perlan
4 Technologies (Perlan Technologies Poland, Warsaw, Poland).
5
6

7 2.2 Cells and treatment

8
9 MCF7 breast cancer cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and
10 penicillin/streptomycin (50 U/ml and 50 µg/ml, respectively) in 5% CO₂. iEP300 (C646, 5 µM),
11 iATM/ATR (KU-60019, 5 µM), iLSD1 (GSK-LSD1, 0,1µM), iKDM5B (PBIT, 5 µM) and iHDAC
12 (Sodium butyrate, 100 µM) were added to cells 6h or 24h before analysis (depending on the
13 tested parameters) or 2h before treatment with cisplatin.
14
15
16

17 2.3 Gene transcription with real-time PCR

18
19 For mRNA expression evaluation, total RNA was extracted from cells using TRI Reagent™.
20 Afterwards, mRNA was reverse transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse
21 Transcription Kit. The expression of selected genes was measured in Bio-Rad CFX96 C1000
22 Touch Real-Time system, using: PowerUp™ SYBR® Green Master Mix and the manually
23 designed primer pairs: (*ACTB* Forward: 5' TGGCACCCAGCACAATGAA 3', Reverse 5'
24 CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA 3', *TBP1* Forward: 5' CACGAACCACGGCACTGATT
25 3', Reverse: 5': TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC' *DUSP12* Forward: 5'
26 TCCATGCTTACCACAGGGAG 3', Reverse: 5': AACCCAAGTTGGCACTGCAT', *FANCI*
27 Forward: 5' CCACCTTTGGTCTATCAGCTTC 3', Reverse: 5':
28 CAACATCCAATAGCTCGTCACC') according to the protocol provided by the manufacturer.
29
30
31
32
33
34
35

36 mRNA level of particular genes was first normalized to housekeeping genes (*ACTB*, *TBP1*).
37 The ratio between the studied and housekeeping genes was assumed to be 1 for control cells.
38
39

40 2.4 Protein detection with western blot

41
42 For protein expression evaluation cells were lysed in RIPA buffer (supplemented with 1 mM
43 PMSF, Phosphatase Inhibitor and PIC) and sonicated (Bandelin Sonopuls HD2070); Next,
44 proteins were separated by SDS-PAGE, transferred into a nitrocellulose membrane, and
45 stained with primary antibodies (1:5000) at 4°C overnight. After subsequent staining with HRP-
46 conjugated secondary antibodies (1:5000 for antirabbit and 1:2500 for anti-mouse antibodies;
47 room temperature; 2 h), the signal was developed with the SuperSignal™ West Pico
48 Chemiluminescent Substrate and pictures were acquired using ChemiDoc-IT2 (UVP, Meranco,
49 Poznan, Poland). H3 was used as the control.
50
51
52
53
54
55

56 2.5 Confocal imaging

57
58 For the confocal imaging of chromatin associated proteins, cells were seeded and treated with
59 inhibitors and cisplatin on a Nunc™ Lab-Tek™ chamber slide. Cells were fixed with a 1%
60

1
2
3 formaldehyde solution in PBS at room temperature for 15 min, permeabilized and blocked with
4 1% FBS solution in PBS with 0.1% TritonX-100 at room temperature for 1h. Primary antibodies
5 (1:400) were added in 1% BSA solution in PBS with 0.1% TritonX-100 and incubated at 4 °C
6 overnight. Next, a secondary antibody (1:400) was added in 1% BSA solution in PBS with 0.1%
7 TritonX-100 at room temperature for 2h. After washing, the slides were mounted with
8 SlowFade™ glass soft-set antifade mountant (with DAPI). TCS SP8 (Leica Microsystems,
9 Germany) with a 63x/1.40 objective (HC PL APO CS2, Leica Microsystems, Germany) was
10 used for sample visualization. The samples were imaged with the following wavelength values
11 for excitation and emission: 485 and 500-550 nm for Alexa Fluor® 488, 550 and 570-580 nm
12 for Alexa Fluor® 546, 480 and 570-580 nm for R-phycoerythrin (PE), 405 and 430-480 nm for
13 DAPI. The fluorescence intensity and colocalization was determined in arbitrary units (a.u.)
14 with Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems, Germany).
15
16
17
18
19
20
21
22

23 2.6 Co-immunoprecipitation

24
25 After treatment with inhibitors and cisplatin cells were washed three times with PBS and lysed
26 on ice in IP buffer composed of 20 mM HEPES – KOH, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM
27 EDTA, 20% glycerol, 0.1% NP-40 and protease inhibitors; sonicated with the ultrasonic
28 homogenizer Bandelin Sonopuls (HD 2070; 10 impulses, 60%); and centrifuged (3 000 rpm, 4
29 °C, 10 min). Supernatant was incubated with anti-p53, anti-E2F1 or anti-EP300 antibodies and
30 control IgG at 4 °C for 2 h. For another 1 h, lysates were added with Dynabeads (10 µL); then,
31 they were washed 5× with the IP buffer and suspended in RIPA buffer (supplemented with 1
32 mM PMSF and PIC) with 5% β-mercaptoethanol and gel loading buffer and heated at 70 °C
33 for 10 min. Beads were collected on a magnetic stand and supernatant was separated by SDS-
34 PAGE electrophoresis followed by transfer of proteins on nitrocellulose membranes.
35 Interacting partners were detected on nitrocellulose membranes after overnight staining with
36 corresponding primary antibodies (1:5000; 4°C; overnight) and subsequent staining with HRP-
37 conjugated secondary antibodies (1:5000; room temperature; 2h). The signal was developed
38 with the SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate and pictures were acquired
39 using ChemiDoc-IT2 (UVP, Meranco, Poznan, Poland).
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 2.7 Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

50
51 Chromatin immunoprecipitation was carried out according to the protocol previously described
52 (10). DNA was extracted using phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1). P53 was
53 immunoprecipitated with p53 (7F5) Rabbit mAb, EP300 with p300 (D2X6N) Rabbit mAb,
54 KDM5B with JARID1B (E2X6N) Rabbit mAb, H3K4me3 with Tri-Methyl-Histone H3 (Lys4)
55 (C42D8) Rabbit mAb and H3K27ac with Acetyl-Histone H3 (Lys27) (D5E4) XP® Rabbit mAb
56 in non-treated MCF7 cells and treated with cisplatin/inhibitors/siRNA MCF7 cells.
57
58
59
60

1
2
3 1µg of immunoprecipitated DNA fragments was converted into library for sequencing using
4 NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit with Sample Purification Beads for Illumina® and
5 NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 3) according to instruction
6 provided by manufacturer. DNA library was sequenced on NextSeq 550 in the Department of
7 Clinical Genetics, Medical University of Lodz, and data were released as fastq files.
8
9

10
11 Histone modifications and transcriptional regulators on DUSP12 and FANCI promoters was
12 analyzed using ChIP-qPCR using PowerUp™ SYBR® Green Master Mix, 0.1% DMSO and
13 manually designed primer pairs. Primers were designed based on p53 binding motifs from
14 ChIP-seq data : *FANCI* Forward 5' CAGGAGGGAAGCTGAACCTG 3', Reverse 5'
15 ATGAAGACTGAAGGGGTGCC 3'; *DUSP12* Forward: 5' CCAAGAGAGGAGGAGGGTTG 3',
16 Reverse: 5' CAATAATCGGGGTGGGTGTCT 3', Data were normalized to samples containing
17 non-specific IgG or histone H3 (for H3K4me3 and H3K27ac).
18
19
20
21
22

23 2.8 Library preparation for RNA-seq

24
25 Total RNA was isolated using TRI Reagent™. Next, 10 ng of DNA-free total RNA was used
26 to isolate mRNA using NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module. Next mRNA
27 was converted to cDNA using NEBNext Ultra II RNA First Strand Synthesis Module and
28 NEBNext Ultra II Non-Directional RNA Second Strand Module according to manufacturer
29 instructions. The purified cDNA was used for RNAseq library preparation using MGIEasy
30 PCR-Free DNA Library Prep Set according to manufacturer's protocol. Sequencing was
31 performed using DNBSEQ-G400 in the Department of Clinical Genetics, Medical University
32 of Lodz, and data were released as fastq files.
33
34
35
36
37
38

39 2.9 Bioinformatic analysis in usegalaxy.org (server version 25.0.2.dev0)

40
41 After the quality control in FastQC the raw reads (as fastq.gz) derived from ChIP- and RNA-
42 Seq were trimmed to reads with $Q_{\text{phred}} > 30$.
43

44
45 ChIP-Seq-derived reads were mapped to human genome (hg19) with Bowtie2. For peak
46 calling we use MACS2 callpeak with peak detection based on $p < 0.001$. The genome coverage
47 was normalized to counts per million (CPM) with bamCoverage and saved in bigwig for further
48 visualization in UCSC Human Genome Browser. Gene promoters were assumed as regions \pm
49 5kbp from transcription start sites (TSS), which were derived from UCSC GTEx Gene V8
50 (Table: gtxGeneV8). Heatmap and plot distribution of proteins were generated by
51 computeMatrix with bigwig as score files, regions to plot in bed from MACS2 peaks or USCS
52 tables, a reference-point (center of region) and selected distance upstream and downstream.
53 Pearson correlation coefficient and correlation heatmap for E2F1 motifs in the genome (filtered
54 out from UCSC table wgEncodeRegTfbsClusteredV3) and gene promoters (from Table:
55
56
57
58
59
60

gtexGeneV8). Overlapping region in genome were searched with Intersect tool for data saved in intervals or bedtools Intersect intervals for data saved in bed. The coverage with mapped reads (as BAM) for specific genomic regions or promoter subsets (as BED) and considered features (proteins or H3 modifications) was counted with bedtools MultiCovBed. The FASTA sequences for p53 peaks in activated and repressed promoters (as BED) were derived from server indexed file (fasta id: Human (Homo sapiens): hg19) using bedtools getfasta. P53 binding motif was taken from JASPAR (MA0106.3) and aligned to FASTA sequences in MEME Suite 5.5.8 tool: Find Individual Motif Occurrences (FIMO). Top20 transcription factors and co-factors for the promoter subsets and, then, for p300-p53 promoters were identified and counted by comparing promoter regions with wgEncodeRegTfbsClusteredV3 table (as BED), and transcription factors were sorted by frequency of their occurrence.

RNA-Seq-derived data were mapped to hg19 reference genome with HISAT2 with default parameters, and gene expression was measured by featureCounts using built-in hg19 genome. Differential gene expression analysis and normalization (filtered and normalized counts tables) were carried out with limma-voom using the following parameters: normalization method – TMM; filtering on count-per-million (CPM) with CPM below 1 in minimum 3 samples; minimum Log2 fold change – 1; p value adjusted threshold – 0.05; p value adjustment method – Benjamini and Hochberg (1995). Normalized counts were then plotted using Heatmap2 and the following parameters: compute z score on columns; clustering rows and not columns; distance method – Euclidean; clustering method – average (UPGMA).

Datasets from SRA for MCF7 cell line:

H3K27ac	SRR12349339 and SRR10887027
H3K4me3	SRR12349279 and 10886967
H3K4me2	SRR7686906
H3K4me1	SRR7952790, SRR7952791, SRR7952792 and SRR7952793
H3K9me3	SRR14678506 and SRR14678507
H3K27me3	SRR3159919 and SRR3159920
ER	SRR23071683 and SRR23071681
POLR2A	SRR10320030
POLR2A Ser2P	SRR10320034
LSD1	SRR14213437
EZH2	SRR15724297
KDM5B	SRR827515

HDAC1	SRR14777638
MLL1	SRR4011725
MLL2	SRR4011726
MLL3	SRR3561357
MLL4	SRR19782007
H3K4m3e in WT	SRR7686907
H3K4m3e in KDM5B KO	SRR7686919

2.10 Cell cycle analysis

Cells treated with different cisplatin concentrations was trypsinized and washed with PBS. Next cells were fixed with 0,5% formaldehyde solution in PBS, 15 min at room temperature. In the next step cells was incubated with 0,1% Triton X-100 solution. After subsequent washing cells were treated with RNase A solution in 1% BSA solution and incubated 2h in 37°C. After incubation cell suspension was staining with DAPI (1 ug/mL). The fluorescence intensity was measured by a flow cytometer LSR® II (Becton Dickinson) at ex: 405nm / em: 480 nm/nm. The cell population was discriminated based on FSC-A and SSC-A parameters in Flowing Software 2.

2.11 Resazurin toxicity assay

The day prior to treatment, cells were seeded at a density of 2000 cells per well on Nunc® MicroWell™ 384-well optical bottom plates. After incubation with cisplatin cells were incubated with the resazurin solution (5 µM) in the growth medium at 37 °C for 2 h. The fluorescence that corresponds to the metabolic activity of living cells was measured with a fluorescence microplate reader (BioTek Synergy HTX, Biokom, Poland) at excitation 530 and emission 590 nm. The fluorescence value for control cells was assumed to be 100%.

2.12 Statistical analysis

Data are shown as mean ± standard deviation (SD). Parametric or non-parametric test was conducted after testing Gaussian distribution of data with the Shapiro–Wilk test. Student's t test or the Mann–Whitney test was used to calculate statistically significant differences between two samples, while one-way analysis of variance (ANOVA) or Kruskal-Wallis test followed by corresponding post hoc test was carried out to compare multiple samples. Statistics were calculated using GraphPad Prism 8.01 software. Statistically significant differences were marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$.

3.Results:

3.1 Activation of ATM/ATR-Chek1/2-p53 pathway by cisplatin causes redistribution of p53 in the genome

In the search for genes repressed by p53 in MCF7 cells, a range of cisplatin concentrations (0.5-80 μ M) were first tested to find the correct dose of the drug which activated the ATM/ATR-Chek1/2-p53 pathway without any considerable impact on cell cycle progression. There was no cell cycle arrest for up to cisplatin concentrations of 5 μ M, as shown by the expression of mitotic markers, cell cycle analysis and viability test (Fig.1A, Supplem. Fig. 1A -B). At a concentration of 5 μ M the considered drug induced mild genotoxic stress was confirmed by increased DNA double strand breaks (pH2Ax) and the phosphorylation of ATM/ATR-Chek1/2-p53 cascade components, while the level of p53 remained unchanged (Fig.1A, Supplem. Fig 1C). Surprisingly, the fluorescence of p53 in the nucleus substantially declined after cisplatin, quantified by confocal imaging (Fig. 1B). This suggested that p53 is bound to DNA in a steady state and that activation of ATM/ATR-Chek1/2-p53 triggered redistribution of p53 from the chromatin, which was followed by the extrusion of a considerable portion of p53. Pharmacological inhibition of ATM/ATR prevented the p53 eviction and maintained any p53 that was bound to DNA (Fig. 1C). This indicated that p53 activation induced a decrease in p53 interaction with DNA. This was also observed in the ChIP-Seq experiment, where the total number of p53 peaks in the genome and at the gene promoters declined after cisplatin (Fig. 1D). P53 enriched regions were shifted in the genome and detected upstream closer to TSS and downstream further from TSS (Fig. 1E). p53 enriched regions were created one peak right before TSS in untreated cells, whereas after cisplatin, p53 split into 2 peaks adjacent to TSS, which may point to the formation of transcription initiation complex in the proximity to the first exon (Fig. 1F). This observation suggested that p53 is associated with repressed promoters in proliferating, untreated cells, whereas its activation with the drug moves the protein transcriptionally permissive promoters. As a control, the p53 occurrence at the promoter of *CDKN1A* was monitored, as a known direct target of p53 (Fig. 1G). In the steady state, p53 was found at 3 regions upstream of *CDKN1A*, with the peak localized directly at TSS considerably erased and split after cisplatin (cropped, red box). This corresponded to the p53 redistribution around TSS shown in Fig. 1F. In a Venn diagram the peak enriched regions between untreated and cisplatin treated cells in the genome were compared, specifically at the gene promoters assumed to be TSS \pm 5 kbp (Fig. 1H-I). Only 26% of p53 peaks detected in untreated cells remained unchanged after cisplatin, which caused both p53 extrusion and *de novo* recruitment to chromatin. The prevailing number of mobile peaks were detected in the intergenic regions.

These results suggest that p53 is bound to the subset of genomic regions in proliferating, untreated cells and is mostly redistributed to other locations after cisplatin.

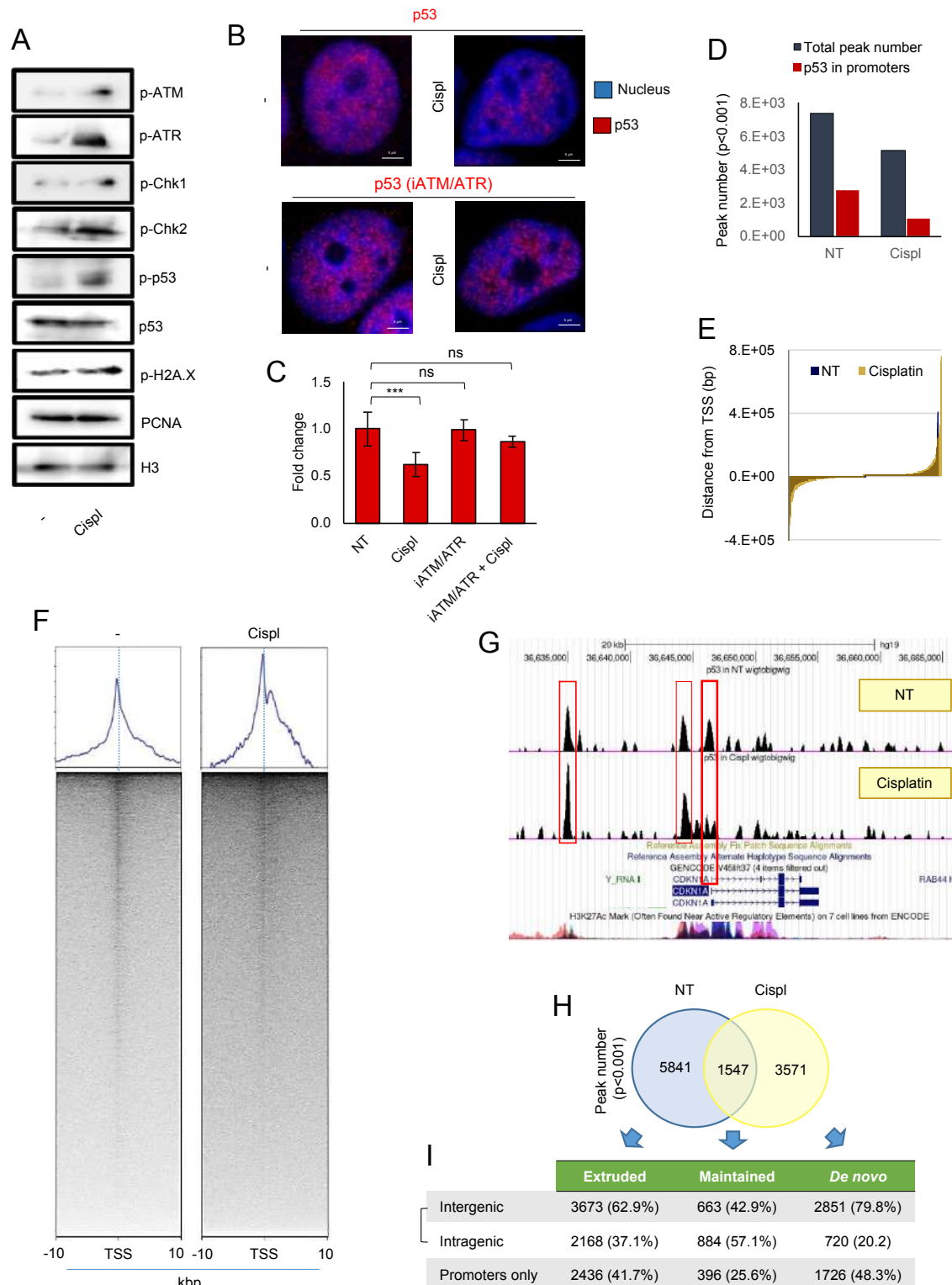


Fig. 1 Activation of ATM/ATR-Chk1/2-p53 pathway by cisplatin induces substantial p53 extrusion from the chromatin

(A) Cisplatin causes DNA lesions and activates DNA damage response cascade as evidenced by western blot detection of phosphorylated p-H2AX and components of ATM/ATR-Chk1/2-p53 pathway. Histone H3 served as loading control. Treatment condition: 5 μ M cisplatin for 6 h. (B-C) Association of p53 with chromatin declines after

1
2
3 cisplatin but (D-E) it is prevented by iATM/ATR (KU-60019, 5 μ M added 2 h prior to cisplatin). Immunostaining of
4 p53 bound to chromatin was visualized by confocal microscopy (B), and (C) fluorescence intensity was quantified
5 in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. (D) Extrusion of p53 from the chromatin in response to cisplatin
6 is confirmed by decreased p53 peak number. p53-enriched regions were scored after MACS2 peak calling at
7 $p < 0.001$. Gene promoters were assumed as regions ± 2 kbp from TSS. (E-F) Cisplatin triggers p53 redistribution in
8 the genome. (E) The most significant shift in localization of p53 peaks is observed for regions furthest from TSS.
9 (F) Cisplatin causes also considerable change in the profile of p53 occurrence around TSS. (G) In untreated cells
10 p53 is bound to chromatin at the regulatory regions of *CDKN1A*, which are marked by massive H3K27 acetylation.
11 The level of p53 at TSS declines after cisplatin. p53 ChIP-Seq data as bigwig are visualized in UCSC Human
12 Genome Browser (hg19) and align to H3K27ac from ENCODE. (H) Genome-wide response of chromatin to cisplatin
13 is followed by substantial p53 extrusion and considerably smaller number of *de novo* enriched regions. Localization
14 of p53 peaks ($p < 0.001$) is compared on venn diagram between untreated and cisplatin treated cells. (I) Division of
15 peaks into specific locations in the genome (intragenic vs intergenic) and gene promoters show the strongest p53
16 redistribution in the intergenic regions.

17 **3.2 p53 extrusion from p53-p300-E2F1 assembled complexes in steady state is followed** 18 **by p300 enrichment at the gene promoters**

19
20
21 In the search for possible interacting transcription co-factors, the Top 20 motifs were identified
22 that overlap with the 3 p53 peak types: extruded, remaining and *de novo* (Fig. 2A). All 3 peak
23 types shared 18 transcription factor motifs. p53 extruded peaks were frequently found at E2F4
24 and EGR1 binding sites, whereas unchanged and *de novo* deposited peaks were at p300 and
25 RCOR1 motifs. When supported by previous studies, this observation may suggest that p53
26 recruitment to chromatin in response to cisplatin could activate transcription by interacting with
27 p300. However, when p53 peaks at the gene promoters featured by p300 motifs were counted,
28 we surprisingly found their prevailing number in untreated cells (Fig. 2B). In untreated cells,
29 p53 peaks on p300 motifs were also featured by more frequent occurrences of the binding
30 sites for E2F family members, specifically E2F1, E2F4 and E2F7 (Fig. 2C), as well as for
31 chromatin remodelling enzymes such as KDM5B and HDAC1. The confocal imaging of p53
32 and p300 in cell nuclei confirmed the co-localization on the chromatin of untreated cells, and
33 declined in co-distribution after cisplatin (Fig. 2D-E). Although the total level of p53
34 considerably decreased in cells challenged with the anticancer drug, the p300 occurrence on
35 chromatin substantially increased (Fig. 2F). This finding was also confirmed by a ChIP-Seq
36 experiment for p300, where the enzyme was enriched at considered E2F1 motifs after 6 h cell
37 treatment with cisplatin, but was erased strikingly after longer incubation (Fig. 2G). This was
38 confirmed by confocal microscopy (Supplem. Fig 1D-F) and protein co-immunoprecipitation
39 (Supplem. Fig 1G-H) and showed an increase in the interaction between p300 and E2F1 after
40 treatment of the cells with cisplatin. However, as suggested by the p53 distribution on the p300
41 motifs (in Fig. 2B) and p53-p300 colocalization in the genome, cisplatin caused a substantial
42 decline in the number of p53-p300 overlapping peaks at the E2F1 motifs (Fig. 2H). This
43 indicated that p53 could interact with p300 at the promoters with E2F motifs in intact cells and
44 that p53 *de novo* recruitment to chromatin in response to cisplatin may not be linked with co-
45 recruitment of p300. The Pearson correlation coefficient between p53 and p300 at the gene
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 promoters (genome wide) were similar, regardless of the cisplatin treatment (Fig. 2I), but
4 dropped substantially at the promoters with E2F motifs from 0.6 to 0.48. Co-
5 immunoprecipitation of p53 indicated the assembly of p53, p300 and E2F1, but cisplatin
6 caused the decomposition of the complex and a confirmed decline in p53-p300 co-occurrence
7 at the gene promoters with E2F1 motifs (Fig. 2J). Inhibition of ATM/ATR enhanced p53-p300-
8 E2F1 interaction and prevented the disassembly of the complex in response to cisplatin. A
9 prevailing number of pre-existing p53-p300 complexes enriched at E2F1 promoters were lost
10 after cisplatin and lower numbers occurred *de novo* (Fig. 2K). Despite the extrusion of p53
11 from p53-p300-E2F1 promoters, p300 remained bound to the DNA after exposure of the cell
12 to cisplatin. The quantification of p300 at the p53 extruded and *de novo* enriched promoters
13 indicated an increase in p300 after 6 h, which was considerably higher at p53 extruded than
14 *de novo* recruited p53 (Fig. 2L). Therefore, p53 extrusion from pre-existed p53-p300-E2F1
15 complexes is associated with a substantial enrichment of p300.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

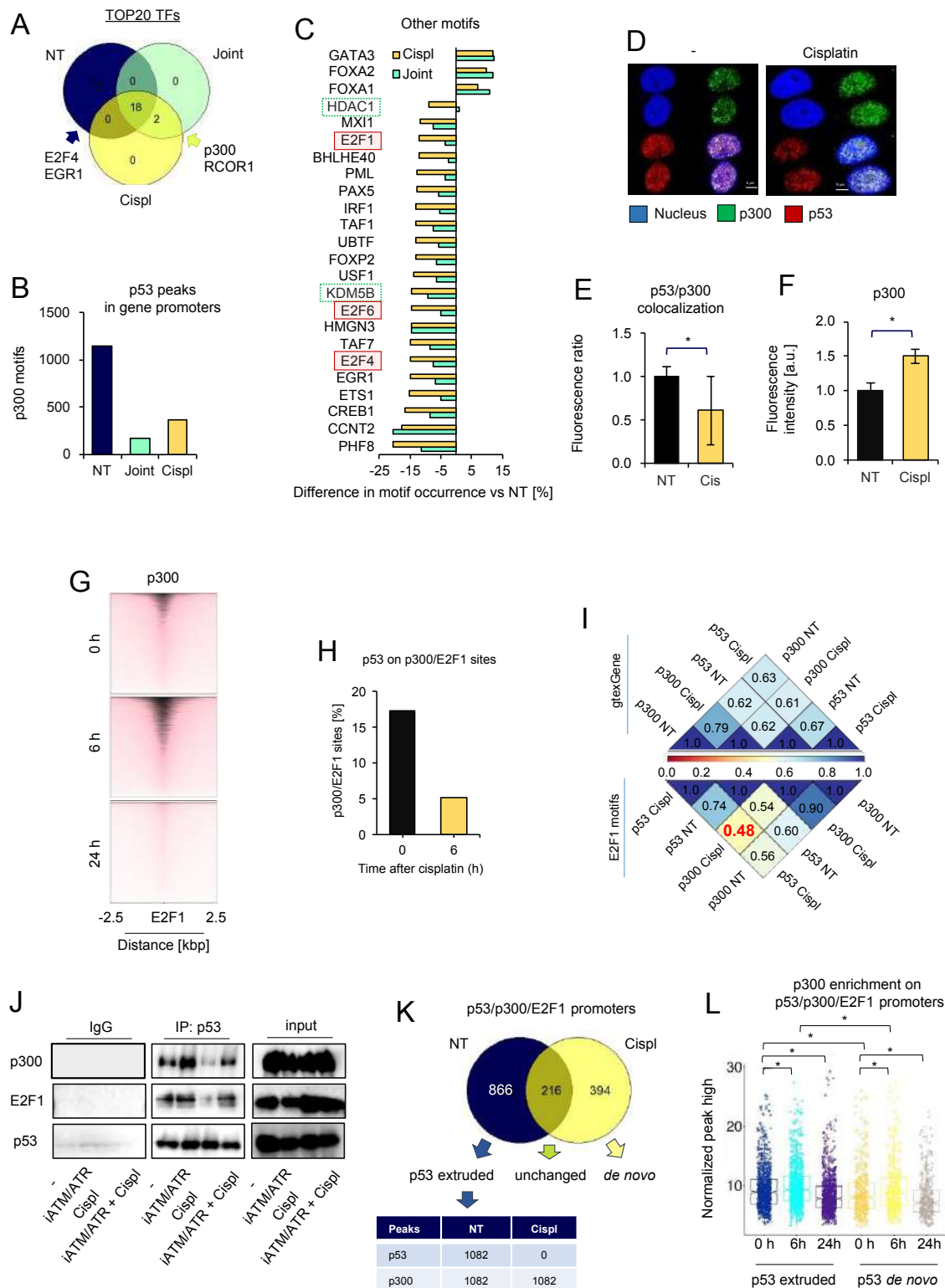


Fig. 2 p53 extrusion from the subset of p300-bound promoters leads to significant p300 enrichment in response to cisplatin

(A) Extruded, maintained and *de novo* enriched p53 genomic regions were searched for transcription factors in UCSC table wgEncodeRegTfbsClusteredV3. TOP20 most frequently occurred TFs are compared on venn diagram. (B) p53 enriched region in untreated cells frequently overlap p300 binding motifs. (C) Analysis of TF binding sites indicates that p300 motifs more often co-occur with E2Fs and histone remodeling enzymes such as HDAC1 and KDM5B at p53 peaks, which are erased after cisplatin. The difference in frequency of motif occurrence at p300 motifs was compared between p53 peaks, which are extruded, maintained or deposited *de novo* after cisplatin. (D-E) Nuclear colocalization of p300 and p53 declines after cell treatment with cisplatin. (D) Confocal images show

1
2
3 nuclear distribution of p300 (green – AlexaFluor488) and p53 (red – PE). DNA (blue) is stained with DAPI. (E)
4 Quantification of fluorescence of p300 bound to DNA indicates its recruitment to chromatin in response to cisplatin.
5 (F) Decline of red to green fluorescence ratio after cisplatin suggests spacial separation of p53 and p300. (G) p300
6 binds to chromatin at E2F1 motifs 6 h after cisplatin, but is substantially extruded after another 18 h. Heatmap of
7 p300 distribution was plotted from matrix of E2F1 motifs (filtered out from UCSC table
8 wgEncodeRegTfbsClusteredV3 table \pm 2.5 kbp) as bed and p300 scores as bigwig after p300 peak calling in
9 MACS2. ChIP-Seq for p300 was carried out after 0, 6 and 24 h cell treatment with cisplatin. (H) p53 is extruded
10 from p300 peaks at E2F1 motifs 6 h after cell treatment with cisplatin. (I) Correlation plot shows the decline in p53
11 and p300 co-distribution at E2F1 motifs after cisplatin. For multiBigwigSummary, E2F1 motifs and gene promoters
12 (\pm 2 kbp around TSS of gtexGene table) served as genomic regions, whereas p53 and p300 bigwig files were used
13 for scoring. (J) p53 forms immunoprecipitable complexes with p300 and E2F1, which dissociate after cisplatin.
14 ATM/ATR inhibitor (KU-60019,5 μ M) prevents cisplatin-induced decomposition of p53-p300-E2F1. P53 was co-
15 immunoprecipitated with primary antibody and magnetic beads, whereas proteins were detected by western blot.
16 (K) p300 remains bound to promoters characterized E2F1 motifs enriched in p53 and p300 after cisplatin-induced
17 extrusion of p53. Genomic distribution of p53-p300 at E2F1 motifs was compared on venn diagram between
18 untreated and cisplatin-treated cells. Table shows the number of p300 peaks overlapping p53-E2F1 sites before
19 and after p53 extrusion. (L) DNA bound p300 is considerably enriched at p53-p300-E2F1 gene promoters after 6 h
20 cell treatment with cisplatin. Individual p300 peak high (MACS2 score file) was normalized to median p300 peak
21 high and plotted. p53-p300-E2F1 promoters were divided into p53 extruded and *de novo* recruited, further
22 subdivided into 3 time points after administration of cisplatin.

23 **3.3 p53 extrusion from p53-p300-E2F2 promoters in response to cisplatin is associated** 24 **with increased gene transcription in a p300-dependent fashion**

25
26
27 Functional analysis of the genes characterized by the occurrence of p53-p300-E2F1 at their
28 promoters in a steady state showed a contribution to crucial intracellular processes associated
29 with cell response to genotoxic agents (Fig. 3A). These included an *inter alia* DNA damage
30 response, DNA repair or regulation of mitotic nuclear division. This suggested that p53
31 extrusion functionally contributed to cell protection from genotoxic stress. While trying to check
32 the basic transcription level and transcriptional gene response to p53 extrusion RNA-Seq, data
33 from untreated and cisplatin treated cells was used (Fig. 3B-D). The normalized mRNA level
34 of genes characterized by p53 erasing and recruitment did not significantly differ (Fig. 3B), but
35 their transcription increased substantially after the cell treatment with cisplatin (Fig. 3C).
36 Differential gene expression indicated an almost complete overlap in both direction and
37 intensity of the observed alteration in gene transcription after cisplatin and upon p53 deficiency
38 (Fig. 3D). A comparable number of genes were up- and downregulated under the tested
39 conditions (Log2FC>2, adj p < 0.05). When aligned with ChIP-Seq data on the p53 extrusion
40 from p53-p300-E2F1 promoters, the gene subset responding to cisplatin with increased (146)
41 and declined (45) transcription was identified (Fig. 3E). For further mechanistical study we took
42 2 genes from a list of 146 as the examples: *DUSP12* and *FANCI*, which are functionally linked
43 to signaling and DNA repair, respectively. Bearing in mind that p53 erasing was followed by
44 p300 enrichment, we tested the impact of pharmacological inhibition of p300/CBP on the
45 transcription of genes activated by cisplatin and p53 transient silencing. In both cases,
46 ip300/CBP completely prevented the increase in gene transcription, thereby indicating the role
47 of p300/CBP in the observed gene activation (Fig 3F). This suggested the enrichment of p300
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

at the p53-p300-E2F1 promoters after p53 extrusion reversed p53-mediated gene suppression. Although p300 pre-existed with p53 at the subset of gene promoters its occurrence was insufficient for a high transcription yield.

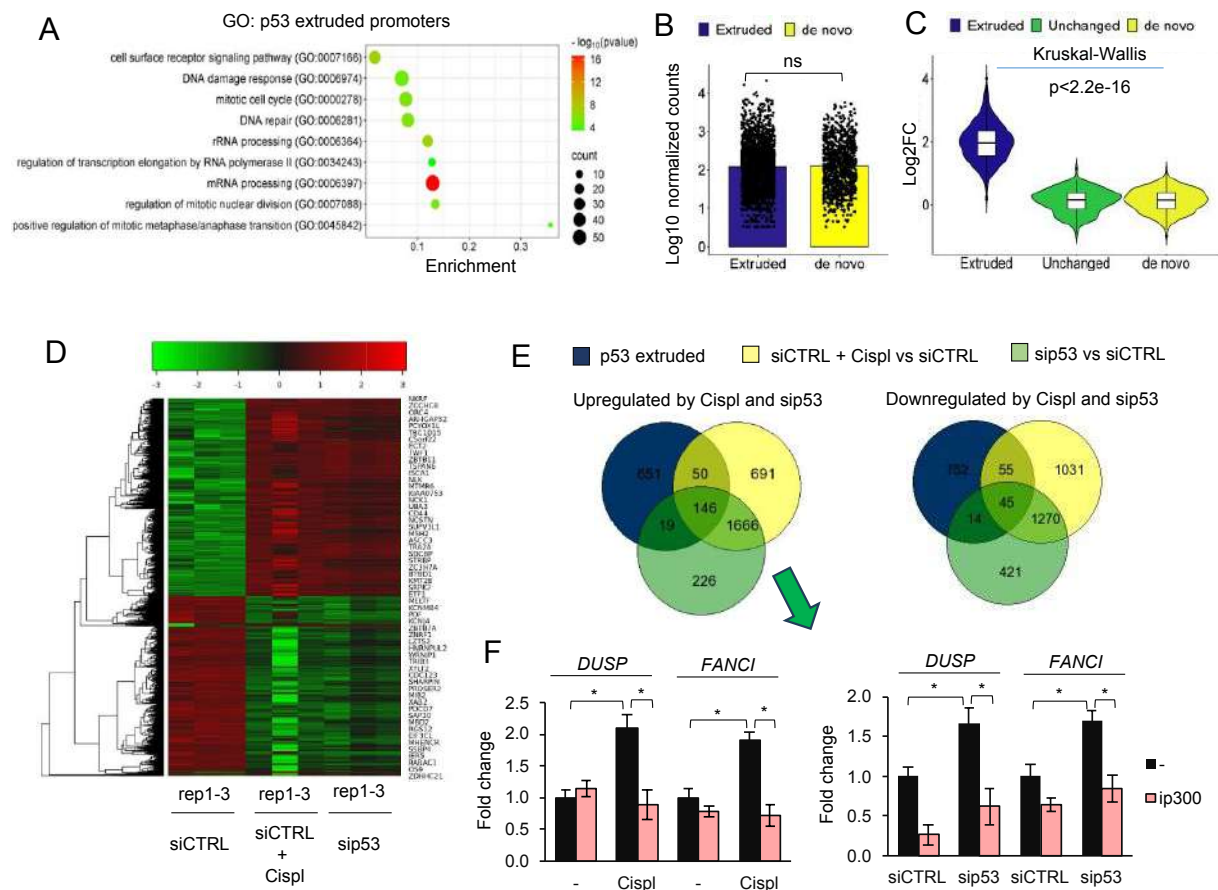


Fig. 3 p53 extrusion from the subset of p300-bound promoters augments p300-dependent gene transcription

(A) p53 is extruded from p53-p300-E2F1 promoters, which control transcription of genes functionally linked to DNA damage response and repair, mitotic divisions and gene transcription. (B) Transcription of genes characterized by promoters extruded or *de novo* recruited p53 after cisplatin is comparable in untreated cells. Log10 normalized counts (counts per million) was taken for plotting and statistical analysis (t-test, ns when $p > 0.05$). (C) Transcription of genes controlled by p300-E2F1 promoters extruded with p53 increases in response to cisplatin. Differential gene expression between cisplatin treated (24 h) and untreated cells was analyzed for promoters with p53 extruded, maintained and *de novo* recruited using limma-voom. Statistical analysis with Kruskal-Wallis test indicates significant differences in gene response to cisplatin among the three groups. (D) Cisplatin and transient silencing of p53 similarly affects the gene subset. Differential gene expression was carried out using limma-voom, and compared cells transfected with siCTRL, siCTRL treated with cisplatin for 24 h, cells transfected with sip53 for 48 h. Heatmap shows differentially expressed genes, when $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1$ and $\text{adj } p \text{ value} < 0.05$. (E) 146 upregulated genes and 45 repressed genes are characterized by p53 extrusion from their p53-p300-E2F1 promoters after cisplatin. p53-p300-E2F1 promoters, which respond to cisplatin with p53 extrusion, were compared with genes up and down regulated on venn diagram. (F) p300 prevents cisplatin- and sip53-induced overexpression of *DUSP* and *FANCI*. P300 inhibitor (C646, 5 μM) was added for 2 h prior to cisplatin or 24 h after cell transfection with sip53, whereas gene transcription was quantified with real-time PCR.

3.4 P53 extruded promoters carrying p53-p300-E2F1 assembly are characterized by a higher frequency of H3K4me2 occurrence with simultaneously low transcription promoting other histone marks

In order to identify specific features of the p53 repressed promoters, publicly available datasets were used and compared with the number of overlapped peaks of selected histone modifications and proteins with p53 repressed and activated promoters (Fig. 4A). The most striking difference was observed in the H3K4 methylation pattern, particularly in the H3K4me2 to H3K4me3 ratio. Approximately 90% of repressed promoters were hallmarked with H3K4me2 and slightly higher POL2R, which suggested the pausing of this enzyme, particularly when the marker of transcription elongation represented by phosphorylated serin 2 of POLR2A, remained relatively low and comparable between the 2 promoter subsets. In contrast, p53 activated promoters were more often featured with H3K4me3. Chromatin remodelling enzymes KDM5B and HDAC1 occurred more frequently at the repressed gene promoters. Although acetylation of H3K27 was observed in all the considered promoter types, its intensity considerably varied and was lowest in p53 promoters (Fig. 4B). A similar situation was observed for di- and three-methylated H3K4. Surprisingly, the coverage of p53 activated promoters with H3K4me2 was highest in the p53 activated promoters. The transcription promoting histone marks substantially increased at the promoters of *DUSP12* and *FANCI* after cell treatment with cisplatin (Fig. 4C-D). These results suggested that p53 repressed promoters were weakly primed for transcription, with p53 extrusion by cisplatin being associated with nucleosome enrichment in transcription promoting histone marks.

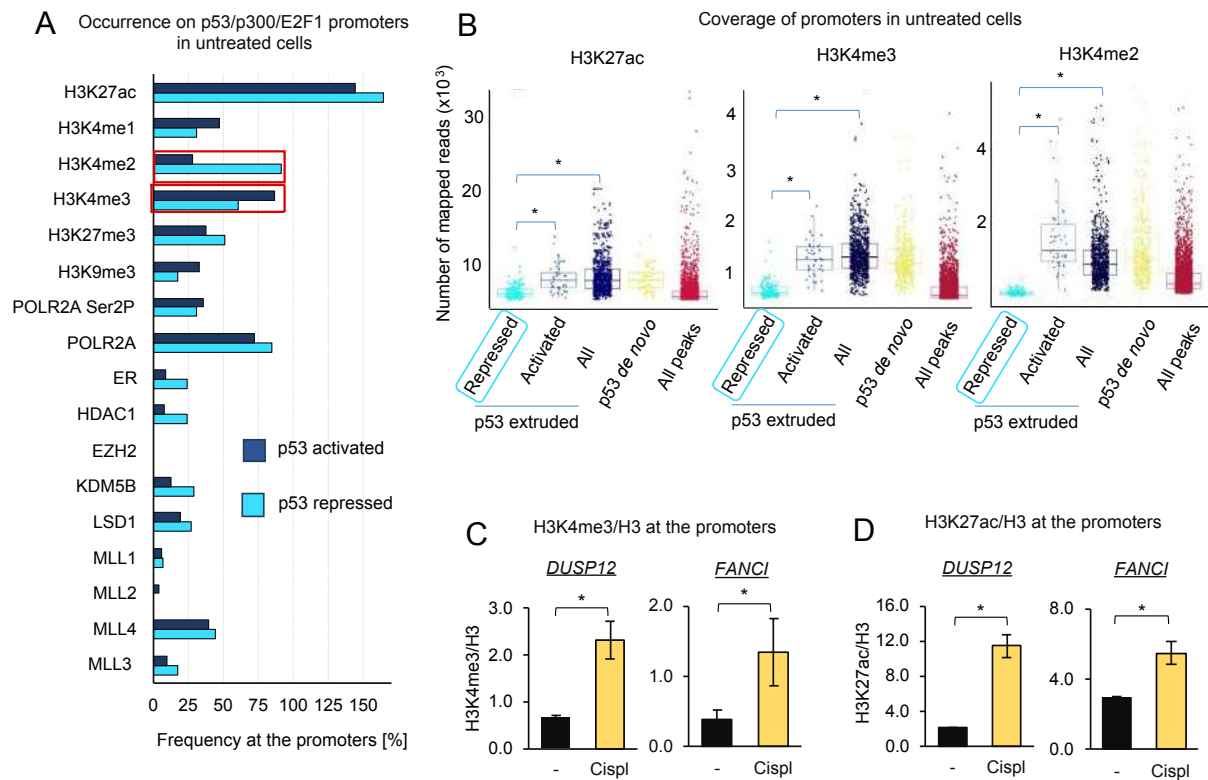


Fig. 4 The subset of p53 repressed promoters is characterized by relatively low level of H3K27 acetylation and H3K4 trimethylation

(A) Genes activated and repressed by p53, which are controlled by p53-p300-E2F1 promoters extruded with p53 after cisplatin, are characterized by considerably distinct profile of histone marks and promoter-associated proteins in intact cells. MACS2 called peaks of considered histone marks and proteins (ChIP-Seq data downloaded from SRA) were overlapped with p53-p300-E2F1 promoters extruded with p53 after cisplatin, which were assumed as 100%. Red, cropped boxes indicate the highly variable marks. (B) Promoters of genes repressed by p53 in intact cells reveal relatively low level of transcription-promoting histone marks. The coverage of p53 peak subsets with the mapped reads of H3K27ac, H3K4me2 and H3K4me3 was calculated by bedtools MultiCovBed and compared to mean coverage of all histone mark peaks. * indicates statistical difference when $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis). (C-D) Cisplatin causes increased acetylation of H3K27 (C) and trimethylation of H3K4 (D) at the p53 binding sites in promoters of *DUSP* and *FANCI*.

3.5 p53 maintains KDM5B bound to p53 repressed promoters, thereby preventing p300 recruitment and conditioning low transcription yield in the steady state

Bearing in mind that the status of H3 methylation and acetylation changes after p53 extrusion, and that chromatin remodelling enzymes such as HDAC1 and KDM5B occur more frequently at the p53 repressed rather than for activated promoters, the impact of these pharmacological inhibitors on transcription of *DUSP12* and *FANCI* were compared (Fig. 5A-B). The inhibitor of LSD1 was also considered, since this enzyme erases methyl groups from mono- and dimethylated H3K4. Among the tested inhibitors, only iKDM5B phenocopied cisplatin and p53 silencing in upregulation of *DUSP12* and *FANCI* transcription with its combination with cisplatin did not further augment gene transcription. In intact cells where KDM5B overlapped p53 peaks at the promoters of *DUSP12* and *FANCI* (Fig. 5C), cisplatin caused substantial extrusion of KDM5B (Fig. 5D). To confirm the molecular link between the cisplatin-induced loss of p53 and

1
2
3 KDM5B, enrichment of p300 and gene transcription, it was firstly confirmed that p53 deficiency
4 at the promoters of *DUSP12* and *FANCI* caused a massive decline in the KDM5B association
5 with chromatin, similar to cisplatin (Fig. 5E). Co-immunoprecipitation of p300 confirmed the
6 existence of p53-p300-KDM5B complexes in a steady state, decomposing after cisplatin.
7
8 Importantly, cisplatin caused a visible decline in H3K4me1 and H3K4me2 with simultaneous
9 enrichment in H3K4me3 in p300 immunoprecipitates (Fig. 5F). KDM5B inhibition phenocopied
10 cisplatin by increasing the level of H3K4me3 and H3K27ac (Fig. 5G-H), thereby suggesting
11 that demethylase acts upstream of p300. This agreed with data described by Hinohara K. *et*
12 *al.*(11), where the knockout of KDM5B was followed by the enrichment of H3K4me3 at p53
13 repressed promoters (Suppl. Figure 1I). Inhibition of p300 reverted iKDM5B-induced
14 upregulation of the gene transcription (Fig. 5I) and provided a functional link between these 2
15 enzymes. Furthermore, pharmacological inhibition of KDM5B significantly increased the level
16 of p300 at the gene promoters (Fig. 5J).
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

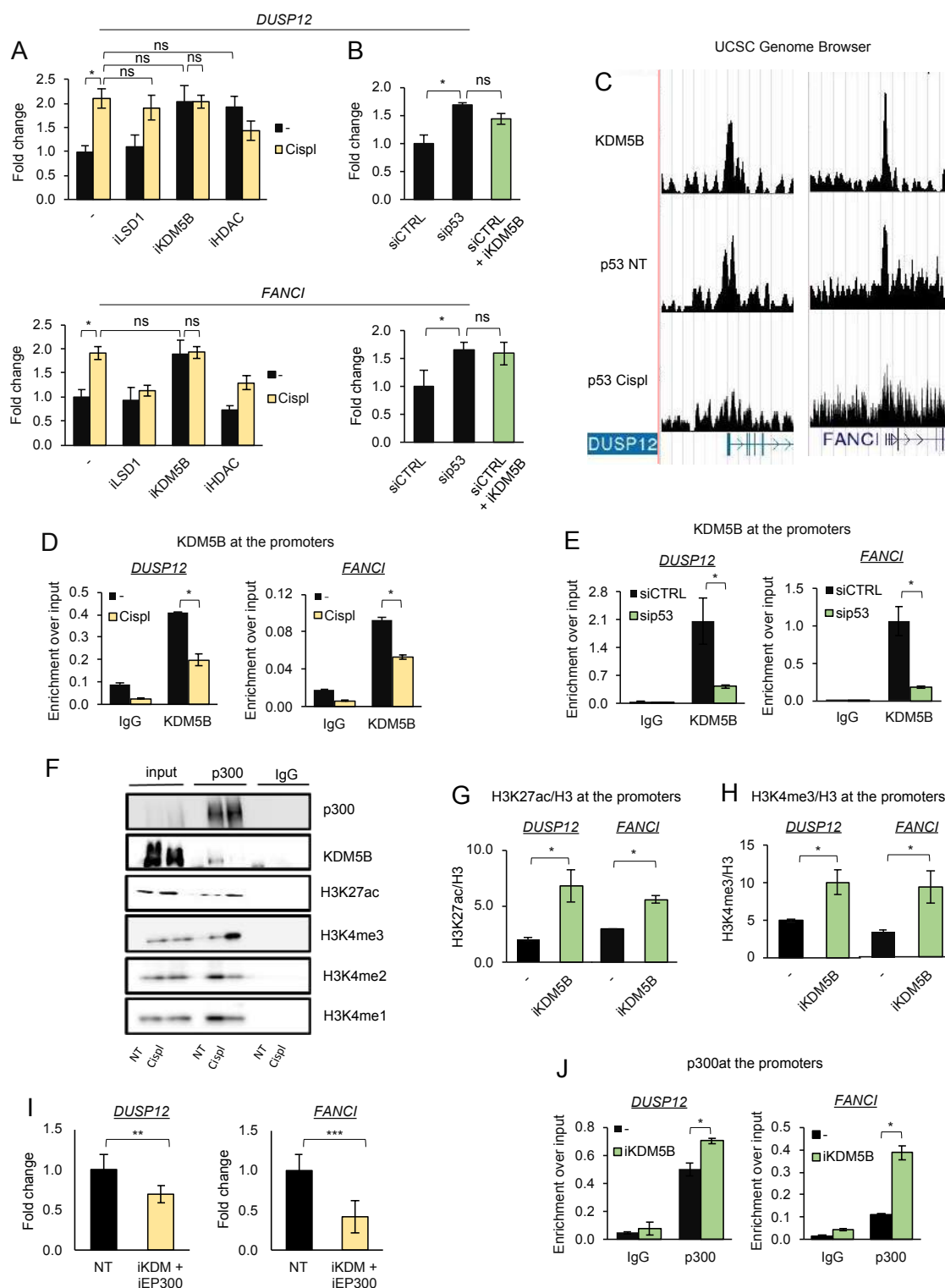


Fig.

5. Cisplatin induces extrusion of KDM5B from the subset of p53 repressed promoters, which allows for p300-mediated overexpression of *DUSP* and *FANCI*

(A-B) Inhibition of KDM5B phenocopies increased transcription of *DUSP* and *FANCI* caused by cisplatin (A) and sip53 (B). iLSD1 (GSK-LSD1, 0,1 μ M), iKDM5B (PBIT, 5 μ M), iHDAC (Sodium butyrate, 100 μ M) were added for 2 h prior to cisplatin and 24 h after cell transfection with siCTRL. Gene transcription was measured with real-time PCR. (C) The occurrence of KDM5B and p53 (as bigwig) was visualized in steady state at the promoters of *DUSP12* and *FANCI*. P53 track after cisplatin was aligned. (D) Cisplatin induces extrusion of KDM5B from p53 binding sites at the promoters of *DUSP* and *FANCI*. KDM5B association with selected genomic regions was quantified by ChIP-qPCR. * marks significant changes when $p < 0.05$ (t-test). (E) p53 knockdown induces KDM5B extrusion from

1
2
3 chromatin. KDM5B level at the p53 binding sites in promoters of *DUSP* and *FANCI* was compared by ChIP-qPCR
4 between cells transfected with siCTRL and sip53 for 48 h. (F) Cisplatin causes decomposition of immunoprecipitable
5 p300-KDM5B complex, but association of p300 with chromatin regions characterized by trimethylation of H3K4.
6 Immunoprecipitation of p300 was followed by western blot detection of KDM5B, H3K4me1, H3K4me2 and
7 H3K4me3. (G-H) Inhibition of KDM5B substantially increases the level of transcription-promoting histone marks at
8 the promoters of *DUSP* and *FANCI*. Acetylation of H3K27 (G) and trimethylation of H3K4 (H) were compared by
9 ChIP-qPCR in cells treated and not with iKDM5B (PBIT, 5 μ M) for 6 h. (I) Inhibition of p300 prevents an increase in
10 transcription of *DUSP* and *FANCI* caused by KDM5B. Combination of p300 and KDM5B inhibitors (C646, 5 μ M;
11 PBIT, 5 μ M, respectively) was added to cells for 24 h and gene transcription was quantified by real-time PCR. (J)
12 Inhibition of KDM5B allows for recruitment of p300 to the promoters of *DUSP* and *FANCI*. The level of chromatin-
13 bound p300 was compared between cells untreated and treated with iKDM5B (PBIT 5 μ M; 6h incubation) by ChIP-
14 qPCR.

15
16 To summarise, cisplatin-induced p53 extrusion from the subset of gene promoters was
17 associated with a decline in KDM5B occurrence allowing for recruitment of p300, the gaining
18 of the transcription permissive chromatin structure and elevated gene transcription as shown
19 by the examples of *DUSP12* and *FANCI*.

20 21 22 23 **4. Discussion:**

24
25 P300 is one of the most frequently altered histone acetyltransferases in cancers with increased
26 expression in some tumors and has been shown to co-activate gene transcription, together
27 with p53. This enzyme modifies histones within proximal and distal gene regulatory elements
28 and its activity is closely linked to H3K27 acetylation at the enhancer loci, which promotes gene
29 expression (12). Substantial evidence points to a critical role for p300 interaction with p53,
30 particularly during responses to DNA damage, where p300 binds to and acetylates p53 leading
31 to full p53 transactivation (13). p300 binding by p53 results in the acetylation of histones and
32 facilitated gene transcription (14). Several factors that are activated in response to DNA
33 damage, including CHK1 (15), SOX4 (16), MAP9 (17), PI3K (18) and RSF1 (19), were shown
34 to act as cofactors of the p53-p300-dependent gene transcription. In this paper we provided
35 molecular and mechanistical evidence for a p300-p53 pre-existence at the subset of gene
36 promoters in unstressed cells and that co-occurrence of p300 with p53 was insufficient for
37 active gene transcription. It was also reported that recruitment of p300 did not always correlate
38 with gene activation and was occasionally associated with repression. A large number of
39 chromatin regions enriched in p300 were not featured by canonical H3K27ac modification,
40 indicating that histone acetyltransferase (HAT) activity at such sites was blocked, however any
41 substantial functional explanation for this is missing (20). In our model of proliferating cells,
42 p300-mediated transcription activation was opposed by KDM5B, which co-occured with p53
43 and p300. However, the collected results did not show that the sole KDM5B extrusion from
44 these promoters triggered catalytic activity of p300, and that under such conditions the pre-
45 existing p300 was sufficient to enhance gene transcription. This is particularly the case when
46 cisplatin-induced KDM5B and p53 erasure, as well as KDM5B inhibition, are followed by further
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 p300 enrichment. Undoubtedly, the observed histone acetylation in response to the drug was
4 catalyzed by p300.
5

6
7 The direct, enzymatic interaction between KDM5B and p300 has not been reported before,
8 with these 2 epigenetic proteins being described in a negative feedback loop in the context of
9 gene transcription rather than in regulating the activity of each other. KDM5B specifically
10 demethylates lysine 4 of histone 3 (H3K4), often targeting trimethylated K4, which marks
11 transcriptionally active promoters. The deregulated expression of this enzyme has been
12 implicated in numerous cancer types, including breast, lung, liver, prostate and skin cancer
13 (21,22). Therefore, a direct, inhibitory impact of KDM5B on p300 activity seems unlikely, since
14 lysine methylation of this acetyltransferase has not yet been described. The only reported
15 arginine methylation by CARM1 in the N-terminal region of p300 inhibited the binding of the
16 transcription factor CREB and in the C-terminal region of p300 inhibited the bimolecular
17 interactions between p300 and the p160. Removal of this mark by PAD4 enhanced bimolecular
18 association (23) and acted in opposition to the hypothesized p300 demethylation by KDM5B,
19 erasing lysine methylation. However, it has been shown that lysine demethylases also have
20 arginine demethylase activity, from studies both on histone fragment peptides, histone H4 from
21 calf thymus (with KDM4E) and non-histone substrates (G3BP1 with KDM5C and KDM5D).
22 Catalytic domains of all the identified human KDM5 members (A–D) have dual lysine and
23 arginine demethylase activities in their isolated forms (24). This suggests that further studies
24 on p300 methylation sites and their impact on p300 activity are needed, particularly as
25 methyltransferases are an important part of the complexes that regulate p300-dependent
26 expression. The analyses revealed significant doxorubicin-induced enrichments of p53,
27 H3K18ac, H3K27ac, and H3K4me1 at the enhancers, as well as Pol II, the SET1C and
28 H3K4me3 at the gene promoters. However, p300 and SET1C seemed to act synergistically on
29 gene transcription by the deposition of transcription promoting histone marks rather than by
30 SET1C depositing methyl groups on p300 (25).
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 During DNA damage response, the ATM-mediated phosphorylation of S106 in p300 allowed
46 interaction of p300 with NBS1, thereby enhancing DNA damage repair (26). Much evidence
47 has been provided on p300 phosphorylation under certain specific conditions, which opposes
48 the impact on p300-dependent gene transcription (27–29) and stability (30,31). In our study,
49 activation of ATM/ATR-Chk1/Chk2-p53 did not affect p300 abundance to much degree inside
50 the cell, but it did enhance p300 interaction with chromatin, particularly with the gene promoters
51 characterized by motifs for E2F transcription factors. Interestingly, this was followed by a
52 massive p300 extrusion from chromatin at a later time point after cisplatin, which suggested
53 chromatin compaction and gene repression after the initial chromatin relaxation and gene
54 activation. In the subset of E2F-driven promoters the existence of SWI/SNF-p300-HDAC1
55
56
57
58
59
60

1
2
3 complexes have been documented where the balance between p300 and HDAC1 activity was
4 tightly controlled by cell cycle progression (32,33). In this study one of our exemplary genes,
5 *DUSP12*, was activated comparably by cisplatin, iKDM5B and iHDAC. This suggested that
6 some HDAC family members may directly or indirectly co-repress some of the p53-p300-
7 KDM5B controlled genes. KDM5B has been shown to physically recruit class I and class IIa of
8 HDACs (34). Approximately 50% of ~140,000 KDM5B enriched regions overlap with the
9 HDAC1 peaks. The cooperative action of the KDM5B and HDAC1 linked H3K4 demethylation
10 and lysine deacetylation to provide a powerful mechanism for a rapid shutoff of actively
11 transcribed genes (35). Some of the HDAC family members also deacetylated p300, thereby
12 causing its enzymatic inactivation (36). If the gene was simultaneously repressed by HDAC,
13 KDM5B, p53, which co-occurred with p300, the whole picture became more complex and the
14 writing/erasing/reading processes comprised of more possible substrates.
15
16
17
18
19
20
21
22

23 In this study, p53 acted more as co-repressor together with KDM5B, since it supported the
24 KDM5B binding to chromatin, but the basics of p53-KDM5B-p300 interaction remains
25 unknown. The p53 and KDM5B did not coincide randomly, but formed an immunoprecipitable
26 complex at a steady state with p53 occurrence being causative for KDM5B maintenance on
27 chromatin. Previous data has shown that KDM5B represses E2F-target genes during
28 senescence. Increased binding of KDM5B to E2F-target genes during senescence was
29 correlated with a strong reduction of the H3K4me3 of these E2F-target genes. The suppressed
30 transcription in senescent cells was restored and was comparable between Rb1, KDM5B and
31 p53-knockdowns (37). However, in that model the functional interaction between the listed
32 proteins was observed in cell cycle arrested cells. This varied from our experimental settings,
33 where we intentionally applied a low concentration of cisplatin to avoid the Rb-E2F-co-
34 repressor complex formation in response to mitotic arrests. In contrast to previous reports,
35 which focused on p53 recruitment to chromatin in response to genotoxic stress, we also
36 showed a considerable p53 extrusion from the genome. This supported some former
37 observations and hypotheses on the role of p53 in maintaining the transcription repressive
38 chromatin structure (1,4), further evidenced by molecular and functional analysis. Even though
39 p53 was thought to bind to the *CDKN1A* promoter and upstream regulatory regions, thereby
40 activating its transcription and inhibition of mitotic divisions by the *CDKN1A* product – p21
41 protein, we found p53 enriched in 3 regions upstream of the *CDKN1A* transcription start site.
42 Cisplatin caused a redistribution of p53 from location proximal to more upstream of TSS, which
43 was associated with the decline in *CDKN1A* transcription. Of note, KDM5B has been
44 documented as being the promoter of cancer cell proliferation by acting as a corepressor of
45 *CDKN1A* (38). Therefore, the dose of the drug aimed to cause DNA damage might be crucial
46 in the transcription response of the p53-p300-KDM5B promoters characterized by E2F motifs.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 While low doses likely activated transcription by extrusion of KDM5B and p53, the higher doses
4 likely repressed these genes by recruiting retinoblastoma-based chromatin remodelling
5 complexes. However, this hypothesis requires further experimental verification.
6
7

8 The dose-dependent role of p53 in regulating gene transcription is particularly important when
9 considering the functional association of p53-regulated genes. Although only a small subset of
10 p53-KDM5B repressed promoters was focused on, the 866 promoters which responded to
11 cisplatin with p53 extrusion were linked to intracellular processes that are crucial for *inter alia*
12 DNA damage response and DNA repair. This protein has already been considered as a
13 double-edged sword depending on the severity of damage. Early in the DNA damage
14 response, p53 relays a wide range of pro-survival signals including cell cycle arrest, allowing
15 the cells to repair the damage at various, also non-transcriptional levels. But if damage
16 continues to accumulate, p53 promotes apoptosis or senescence. It contributes to several
17 repair mechanisms including nucleotide excision repair, base excision repair, mismatch repair,
18 homologous recombination repair and non-homologous end joining (39). p53 also interacts
19 with repair proteins like BRCA1 and DNA polymerase β , thereby enhancing the repair
20 efficiency. As a transcription co-factor, p53 promotes the transcription of *DDB2*, *TP53I3*,
21 *XRCC5* and *XPC*, facilitating DNA repair (40,41). Previous reports also showed the p53-
22 mediated repression of *RECQ4* during DNA damage resulting from the modulation of the
23 promoter occupancy of transcription activators and repressors, specifically from recruitment of
24 HDAC1 and the loss of SP1 and p53 binding to the promoter (42). p53 also inhibits DNA repair
25 by transactivating the base excision DNA repair inhibitory phosphatase PPM1D and by
26 negatively regulating expression of DNA repair proteins *BRCA2*, *RAD51*, *MSH2* and *XRCC4*
27 after genotoxic stress induced by anticancer drugs (43–45). The activation and repression of
28 the gene subset functionally linked to the DNA damage response by p53, allows the cell to
29 have quick and precise activation of the most desired response pathway, that may differ in
30 normal and cancer cells as well as strongly depend on the stimuli intensity.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 In summary, p53 may pre-exist on the chromatin in proliferating, undamaged cells together
46 with p300 and KDM5B and repress transcription of some E2F-driven genes. Mild genotoxic
47 stress, which activates the ATM/ATR-Chk1/Chk2-p53 cascade, triggers extrusion of KDM5B
48 in a p53-dependent fashion for p300 enrichment and activation of the gene transcription. P53
49 interaction with chromatin in a steady state may determine the cell response to damaging
50 agents.
51
52
53
54

55 **5.Glossary:**

56 DSBs- double strand breaks; HAT – histone acetyltransferase; HDAC – histone deacetylase;
57 p53 RE – p53 response element
58
59
60

6. Acknowledgments

cDNA and genomic DNA library was sequenced in the Department of Clinical Genetics, Medical University of Lodz. Graphical abstract was created with BioRender.com

7. Author contributions

Karolina Gronkowska: Investigation, Validation, Formal analysis, Writing – original draft, Writing – review & editing; Kinga Kołacz-Milewska: Investigation; Sylwia Michlewska: Visualization; Agnieszka Robaszkiewicz: Conceptualization, Validation, Investigation, Data curation, Resources, Funding acquisition, Project administration, Writing – original draft, Writing – review & editing.

8. Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

9. Data availability

Data underlying the results presented in this manuscript are provided within the Supplementary Data. Original raw data files containing sequence reads and quality scores were submitted to the NCBI Sequence Read Archive (SRA) database under the BioProject accession numbers: PRJNA1309994, PRJNA1309307, PRJNA1309881.

10. Funding

This research was funded by University of Lodz under the program Excellence Initiative: Research University (IDUB), grant number: IDUB60/2021.

11. References:

1. Peugeot S, Selivanova G. p53-Dependent Repression: DREAM or Reality? *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2025 Jun 18];13(19):4850. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8508069/>
2. Fischer M, Sammons MA. Determinants of p53 DNA binding, gene regulation, and cell fate decisions. *Cell Death Differ* [Internet]. 2024 Jul 1 [cited 2025 Jun 19];31(7):836–43. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41418-024-01326-1>
3. Sullivan KD, Galbraith MD, Andrysiak Z, Espinosa JM. Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death & Differentiation* 2018 25:1 [Internet]. 2017 Nov 10 [cited 2025 Jun 18];25(1):133–43. Available from: <https://www.nature.com/articles/cdd2017174>

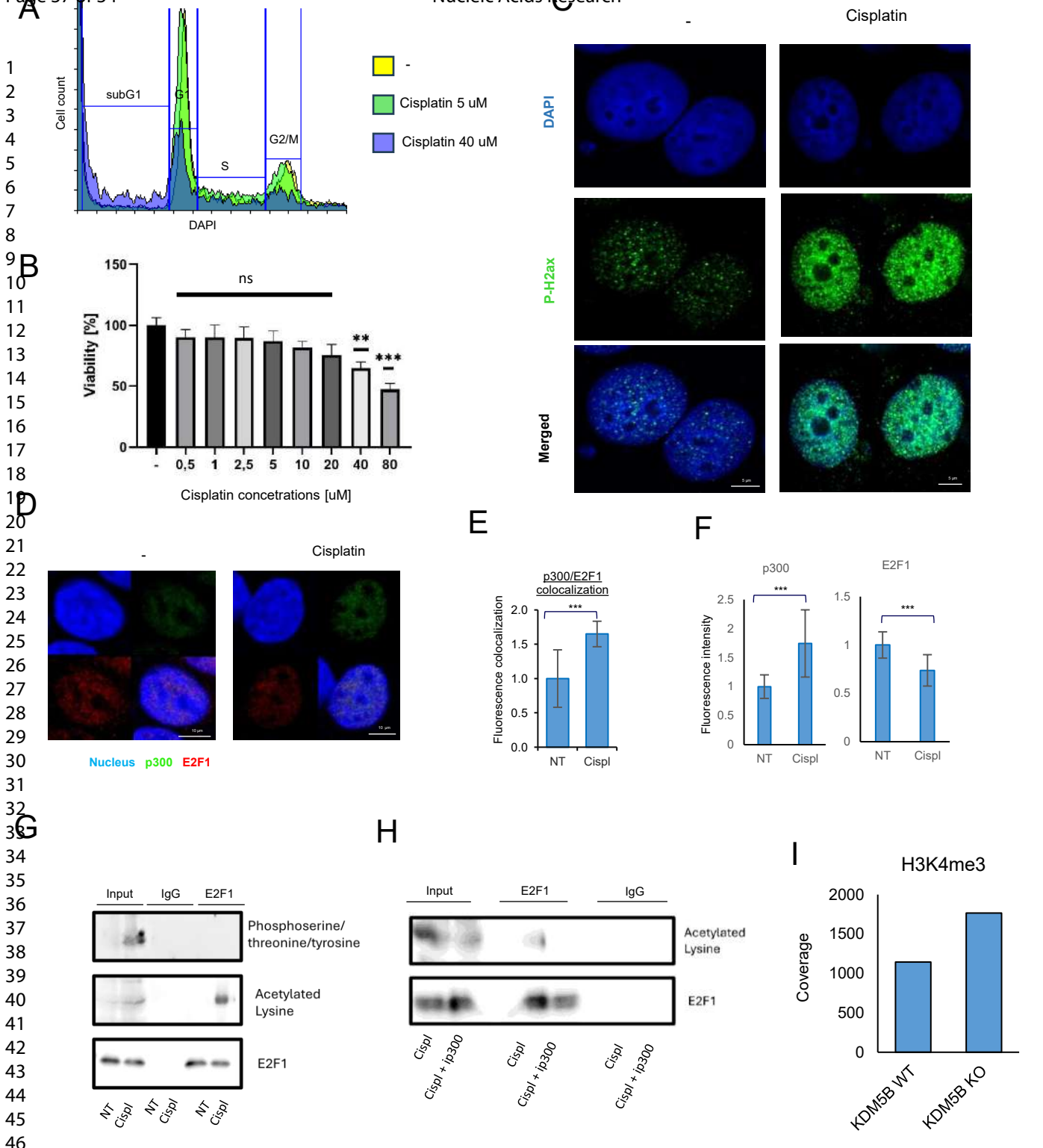
- 1
2
3 4. Allen MA, Andrysiak Z, Dengler VL, Mellert HS, Guarnieri A, Freeman JA, et al. Global
4 analysis of p53-regulated transcription identifies its direct targets and unexpected
5 regulatory mechanisms. *Elife*. 2014 May 27;2014(3).
6
7
- 8 5. Fan S, Smith ML, Li DJR, Duba D, Zhan Q, Kohn KW, et al. Disruption of p53 Function
9 Sensitizes Breast Cancer MCF-7 Cells to Cisplatin and Pentoxifylline. *Cancer Res*
10 [Internet]. 1995 [cited 2025 Jun 24];55:1649–54. Available from:
11 <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/55/8/1649/2460342/cr0550081649.pdf>
12
13
- 14 6. Raj N, Attardi LD. The Transactivation Domains of the p53 Protein. *Cold Spring Harb*
15 *Perspect Med* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2025 Jun 24];7(1):a026047. Available from:
16 <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5204331/>
17
18
- 19 7. Liu YC, Chang PY, Chao CCK. CITED2 silencing sensitizes cancer cells to cisplatin by
20 inhibiting p53 trans-activation and chromatin relaxation on the ERCC1 DNA repair
21 gene. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2025 Jun 23];43(22):10760.
22 Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4678856/>
23
24
- 25 8. Rocha CRR, Silva MM, Quinet A, Cabral-Neto JB, Menck CFM. DNA repair pathways
26 and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics* [Internet]. 2018 [cited 2025
27 Jun 26];73(Suppl 1):e478s. Available from:
28 <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6113849/>
29
30
- 31 9. Sobczak M, Strachowska M, Gronkowska K, Robaszkiewicz A. Activation of ABCC
32 Genes by Cisplatin Depends on the CoREST Occurrence at Their Promoters in A549
33 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2023 Apr
34 7];14(4):894. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/4/894/htm>
35
36
- 37 10. Wiśnik E, Płoszaj T, Robaszkiewicz A. Downregulation of PARP1 transcription by
38 promoter-associated E2F4-RBL2-HDAC1-BRM complex contributes to repression of
39 pluripotency stem cell factors in human monocytes. *Sci Rep*. 2017;7:1–14.
40
41
- 42 11. Hinohara K, Wu HJ, Vigneau S, McDonald TO, Igarashi KJ, Yamamoto KN, et al.
43 KDM5 histone demethylase activity links cellular transcriptomic heterogeneity to
44 therapeutic resistance. *Cancer Cell* [Internet]. 2018 Dec 10 [cited 2025 Jul
45 8];34(6):939. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6310147/>
46
47
- 48 12. Gronkowska K, Robaszkiewicz A. Genetic dysregulation of EP300 in cancers in light
49 of cancer epigenome control – perspectives of specific targeting of p300 proficient and
50 deficient cancers. *Molecular Therapy: Oncology* [Internet]. 2024 Dec 19 [cited 2024
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Dec 24];32(4):200871. Available from:
4 <http://www.cell.com/article/S2950329924001139/fulltext>
5
6
7 13. Grossman SR. p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur J*
8 *Biochem* [Internet]. 2001 May 15;268(10):2773–8. Available from:
9 <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02226.x>
10
11
12 14. Kannan S, Partridge AW, Lane DP, Verma CS. The Dual Interactions of p53 with
13 MDM2 and p300: Implications for the Design of MDM2 Inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2019
14 Nov;20(23).
15
16
17 15. Xu X, Zhang C, Xu H, Wu L, Hu M, Song L. Autophagic feedback-mediated
18 degradation of IKK α requires CHK1- And p300/CBP-dependent acetylation of p53. *J*
19 *Cell Sci* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2025 Jul 3];133(22). Available from:
20 <https://dx.doi.org/10.1242/jcs.246868>
21
22
23 16. Pan X, Zhao J, Zhang WN, Li HY, Mu R, Zhou T, et al. Induction of SOX4 by DNA
24 damage is critical for p53 stabilization and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*
25 [Internet]. 2009 Mar 10 [cited 2025 Jul 3];106(10):3788–93. Available from:
26 </doi/pdf/10.1073/pnas.0810147106?download=true>
27
28
29
30
31 17. Basbous J, Knani D, Bonneaud N, Giorgi D, Brondello JM, Rouquier S. Induction of
32 ASAP (MAP9) contributes to p53 stabilization in response to DNA damage. *Cell Cycle*
33 [Internet]. 2012 Jun 15 [cited 2025 Jul 3];11(12):2380–90. Available from:
34 <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/cc.20858>
35
36
37
38 18. Song L, Gao M, Dong W, Hu M, Li J, Shi X, et al. P85 α mediates p53 K370 acetylation
39 by p300 and regulates its promoter-specific transactivity in the cellular UVB response.
40 *Oncogene* [Internet]. 2011 Mar 17 [cited 2025 Jul 3];30(11):1360–71. Available from:
41 <https://www.nature.com/articles/onc2010506>
42
43
44
45 19. Heo Y, Kim Y, Lim WC, Cho H, Choi YW, Min S. RSF1 orchestrates p53
46 transcriptional activity by coordinating p300 acetyltransferase and FACT complex.
47 *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2024 Dec 31 [cited 2025 Jul 3];741:151010.
48 Available from:
49 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X24015468?via%3Dihub>
50
51
52
53 20. Ortega E, Rengachari S, Ibrahim Z, Hoghoughi N, Gaucher J, Holehouse AS, et al.
54 Transcription factor dimerization activates the p300 acetyltransferase. *Nature* 2018
55 562:7728 [Internet]. 2018 Oct 15 [cited 2025 Jul 6];562(7728):538–44. Available from:
56 <https://www.nature.com/articles/s41586-018-0621-1>
57
58
59
60

- 1
2
3 21. Jose A, Shenoy GG, Rodrigues GS, Kumar NAN, Munisamy M, Thomas L, et al.
4 Histone Demethylase KDM5B as a Therapeutic Target for Cancer Therapy. *Cancers*
5 2020, Vol 12, Page 2121 [Internet]. 2020 Jul 31 [cited 2025 Jul 4];12(8):2121.
6 Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/8/2121/htm>
7
8
9
10 22. Cao Y, Wu C, Ma L. Lysine demethylase 5B (KDM5B): A key regulator of cancer drug
11 resistance. *J Biochem Mol Toxicol* [Internet]. 2024 Jan 1 [cited 2025 Jul
12 4];38(1):e23587. Available from: [/doi/pdf/10.1002/jbt.23587](https://doi.org/10.1002/jbt.23587)
13
14
15 23. Lee YH, Coonrod SA, Kraus WL, Jelinek MA, Stallcup MR. Regulation of coactivator
16 complex assembly and function by protein arginine methylation and
17 demethylination. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005 Mar 8 [cited 2025 Jul
18 7];102(10):3611. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC553305/>
19
20
21
22 24. Bonnici J, Oueini R, Salah E, Johansson C, Schofield CJ, Kawamura A. The catalytic
23 domains of all human KDM5 JmjC demethylases catalyse N-methyl arginine
24 demethylation. *FEBS Lett*. 2023 Apr 1;597(7):933–46.
25
26
27
28 25. Tang Z, Chen WY, Shimada M, Nguyen UTT, Kim J, Sun XJ, et al. SET1 and p300
29 Act Synergistically, through Coupled Histone Modifications, in Transcriptional
30 Activation by p53. *Cell* [Internet]. 2013 Jul 18 [cited 2025 Jul 6];154(2):297. Available
31 from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4023349/>
32
33
34
35 26. Jang ER, Choi JD, Lee JS. Acetyltransferase p300 regulates NBS1-mediated DNA
36 damage response. *FEBS Lett* [Internet]. 2011 Jan 3 [cited 2025 Jul 6];585(1):47–52.
37 Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579310009397>
38
39
40 27. Huang WC, Chen CC. Akt Phosphorylation of p300 at Ser-1834 Is Essential for Its
41 Histone Acetyltransferase and Transcriptional Activity. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2005
42 Aug 1 [cited 2025 Jul 6];25(15):6592. Available from:
43 <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1190347/>
44
45
46
47 28. Bricambert J, Miranda J, Benhamed F, Girard J, Postic C, Dentin R. Salt-inducible
48 kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of
49 ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest* [Internet]. 2010 Dec 1
50 [cited 2025 Jul 6];120(12):4316. Available from:
51 <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2993582/>
52
53
54
55 29. Zakrzewska A, Schnell PO, Striet JB, Hui A, Robbins JR, Petrovic M, et al. Hypoxia-
56 activated metabolic pathway stimulates phosphorylation of p300 and CBP in oxygen-
57
58
59
60

- 1
2
3 sensitive cells. *J Neurochem* [Internet]. 2005 Aug [cited 2025 Jul 7];94(5):1288.
4 Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1411962/>
5
6
7 30. Poizat C, Puri PL, Bai Y, Kedes L. Phosphorylation-Dependent Degradation of p300
8 by Doxorubicin-Activated p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Cardiac Cells. *Mol*
9 *Cell Biol* [Internet]. 2005 Apr 1 [cited 2025 Jul 6];25(7):2673. Available from:
10 <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1061628/>
11
12
13
14 31. Wang SA, Hung CY, Chuang JY, Chang WC, Hsu TI, Hung JJ. Phosphorylation of
15 p300 increases its protein degradation to enhance the lung cancer progression.
16 *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jun;1843(6):1135–49.
17
18
19 32. Pietrzak J, Płoszaj T, Pułaski Ł, Robaszkiewicz A. EP300-HDAC1-SWI/SNF functional
20 unit defines transcription of some DNA repair enzymes during differentiation of human
21 macrophages. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*. 2019;1862:198–208.
22
23
24 33. Sobczak M, Pitt AR, Spickett CM, Robaszkiewicz A. PARP1 Co-regulates EP300–
25 BRG1-dependent transcription of genes involved in breast cancer cell proliferation and
26 DNA repair. *Cancers (Basel)*. 2019;11:1–18.
27
28
29 34. Barrett A, Santangelo S, Tan K, Catchpole S, Roberts K, Spencer-Dene B, et al.
30 Breast cancer associated transcriptional repressor PLU-1/JARID1B interacts directly
31 with histone deacetylases. *Int J Cancer* [Internet]. 2007 Jul 15 [cited 2025 Jul
32 7];121(2):265–75. Available from: [/doi/pdf/10.1002/ijc.22673](https://doi/pdf/10.1002/ijc.22673)
33
34
35
36 35. Klein BJ, Piao L, Xi Y, Rincon-Arano H, Rothbart SB, Peng D, et al. The histone-
37 H3K4-specific demethylase KDM5B Binds to its substrate and product through distinct
38 PHD fingers. *Cell Rep* [Internet]. 2014 Jan 30 [cited 2025 Jul 7];6(2):325–35. Available
39 from: <https://www.cell.com/action/showFullText?pii=S2211124713007663>
40
41
42
43 36. Emmons MF, Bennett RL, Riva A, Gupta K, Carvalho LADC, Zhang C, et al. HDAC8-
44 mediated inhibition of EP300 drives a transcriptional state that increases melanoma
45 brain metastasis. *Nat Commun* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2025 Jul 7];14(1):7759.
46 Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10686983/>
47
48
49
50 37. Nijwening JH, Geutjes EJ, Bernards R, Beijersbergen RL. The Histone Demethylase
51 Jarid1b (Kdm5b) Is a Novel Component of the Rb Pathway and Associates with E2f-
52 Target Genes in MEFs during Senescence. *PLoS One* [Internet]. 2011 Sep 27 [cited
53 2025 Jul 4];6(9):e25235. Available from:
54 <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3181323/>
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 38. Wong PP, Miranda F, Chan K V., Berlato C, Hurst HC, Scibetta AG. Histone
4 Demethylase KDM5B Collaborates with TFAP2C and Myc To Repress the Cell Cycle
5 Inhibitor p21 cip (CDKN1A). *Mol Cell Biol* [Internet]. 2012 May [cited 2025 Jul
6 4];32(9):1633–44. Available from:
7
8 <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1128/MCB.06373-11>
9
10
11 39. Menon V, Povirk L. Involvement of p53 in the repair of DNA double strand breaks:
12 Multifaceted roles of p53 in homologous recombination repair (HRR) and non-
13 homologous end joining (NHEJ). *Subcell Biochem* [Internet]. 2014 [cited 2025 Jul
14 7];85:321. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4235614/>
15
16
17
18 40. Rodriguez-Pastrana I, Birli E, Coutts AS. p53-dependent DNA repair during the DNA
19 damage response requires actin nucleation by JMY. *Cell Death & Differentiation* 2023
20 30:7 [Internet]. 2023 May 4 [cited 2025 Jul 8];30(7):1636–47. Available from:
21
22 <https://www.nature.com/articles/s41418-023-01170-9>
23
24
25 41. Zhang H, Xu J, Long Y, Maimaitijiang A, Su Z, Li W, et al. Unraveling the Guardian:
26 p53's Multifaceted Role in the DNA Damage Response and Tumor Treatment
27 Strategies. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2025 Jul 7];25(23):12928.
28 Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11641486/>
29
30
31
32 42. Sengupta S, Shimamoto A, Koshiji M, Pedoux R, Rusin M, Spillare EA, et al. Tumor
33 suppressor p53 represses transcription of RECQ4 helicase. *Oncogene* [Internet]. 2005
34 Mar 3 [cited 2025 Jul 7];24(10):1738–48. Available from:
35
36 <https://www.nature.com/articles/1208380>
37
38
39 43. McDade SS, Patel D, Moran M, Campbell J, Fenwick K, Kozarewa I, et al. Genome-
40 wide characterization reveals complex interplay between TP53 and TP63 in response
41 to genotoxic stress. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014 Jun 2 [cited 2025 Jul
42 7];42(10):6270. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4041465/>
43
44
45
46 44. Arias-Lopez C, Lazaro-Trueba I, Kerr P, Lord CJ, Dexter T, Iravani M, et al. p53
47 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51
48 gene. *EMBO Rep* [Internet]. 2005 Feb [cited 2025 Jul 7];7(2):219. Available from:
49
50 <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1369244/>
51
52
53 45. Wu K, Jiang SW, Couch FJ. p53 Mediates Repression of the BRCA2 Promoter and
54 Down-regulation of BRCA2 mRNA and Protein Levels in Response to DNA Damage.
55 *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2003 May 2 [cited 2025 Jul
56 7];278(18):15652–60. Available from:
57
58 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002192581958245X?via%3Dihub>
59
60



(A) The impact of the cisplatin on the cell cycle was determined using flow cytometry. The results obtained was analyzed using Flowing Software based on the dependence of the fluorescence of the DAPI marker on intracellular DNA content corresponding to specific phases of the mitotic cycle. (B) Cell metabolic activity that serves as a readout of cell viability was assayed with resazurin assay. Range of cisplatin concentrations were administrated to the culture for 24h. Untreated cells was assumed as 100%. (C) p-H2ax activation after Cisplatin treatment visualised using confocal microscopy. pH2ax was stained using Alexafluor 488 – labeled secondary antibody, nucleus was stained DAPI. (D-F) Association of p300 and E2F1 with chromatin after cisplatin treatment (5 μ M). Immunostaining of proteins bound to chromatin was visualized by confocal microscopy (D). Colocalisation (E), and (F) fluorescence intensity was quantified in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X. (G) Detection of E2F1 modifications by Co-immunoprecipitation of E2F1 followed by Western Blot modifications detection. (H) Impact of p300 on acetylation status of E2F1. The effect of pretreatment with IEP300 (24h, 5 μ M, 2h before cisplatin) on acetylation status of E2F1 was analysed using co-immunoprecipitation followed by Western Blot (I) H3K4me3 coverage on p53 repressed p53-p300-E2F1 promoters was quantified by bedtools MultiCovBed for MCF7 with wild type (SRR7686907) and knockout (KO; SRR7686919) KDM5B.

Łódź 10.09.25r.....

(miejsce, data)

Mgr. Karolina Gronkowska
Katedra Biofizyki Ogólnej,
Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki,
Pomorska 141/143, 90-236 Łódź

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

1) **Gronkowska, K.**; Robaszkiewicz, A. p300 dysregulation in cancers and its cross-talk with other epigenetic factors – a comprehensive review, *Mol Ther Oncol.* 2024 Sep 2;32(4):200871; doi: 10.1016/j.omton.2024.200871

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na analizie danych klinicznych oraz współuczestniczeniu w przygotowaniu pierwotnej oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

2) **Gronkowska, K.**; Michlewska, S.; Robaszkiewicz, A. Activity of lysosomal ABCC3, ABCC5 and ABCC10 is responsible for lysosomal sequestration of doxorubicin and paclitaxel-OregonGreen488 in paclitaxel-resistant cancer cell lines, *Cell Physiol Biochem* 2023; 57(5):360-378; doi: 10.33594/000000663

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonywaniu części doświadczalnych badań w tym prowadzeniu hodowli komórkowych i traktowaniu komórek lekami i wyciszaniu ekspresji genów, izolacji lizosomów, przygotowywaniu próbek do cytometrii przepływowej, oznaczaniu poziomu białek metodą Western Blot, formowaniu sferoidów i ich barwienia, przygotowywaniu preparatów mikroskopowych, analizach cytotoksyczności, wykonaniu analiz statystycznych i interpretacji wyników oraz współuczestniczeniu w przygotowaniu pierwotnej oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 48%.

3) **Gronkowska, K.**; Michlewska, S.; Płoszaj, T.; Strachowska, M.; Stępień, A.; Borowiec, M.; Bednarek, A.; Robaszkiewicz, A. BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel, bioRxiv 2025.05.01.651609;

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonywaniu części doświadczalnej badań w tym prowadzeniu hodowli komórkowych i traktowaniu komórek lekami i wyciszaniu ekspresji genów, oznaczaniu poziomu mRNA za pomocą Real-time PCR oraz poziomu białek metodą Western Blot, formowaniu sferoidów i ich barwienia, przygotowywaniu preparatów mikroskopowych, analizach cytotoksyczności, przygotowaniu bibliotek do sekwencjonowania, przeprowadzeniu immunoprecypitacji chromatyny, analizie danych RNA-seq, wykonaniu analiz statystycznych i interpretacji wyników oraz współuczestniczeniu w przygotowaniu pierwotnej oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 41%.

4) **Gronkowska, K.**; Kołacz-Milewska, K.; Michlewska, S.; Płoszaj, T.; Borowiec, M.; Robaszkiewicz, A. Interaction of HIF1A with BRG1 and p300 confers paclitaxel-induced drug resistance by enabling the overexpression of ABCC genes, Mol Ther Oncol. doi:1016/j.omton.2025.201049

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonywaniu części doświadczalnej badań w tym prowadzeniu hodowli komórkowych i traktowaniu komórek lekami i wyciszaniu ekspresji genów, oznaczaniu poziomu mRNA za pomocą Real-time PCR oraz poziomu białek metodą Western Blot, formowaniu sferoidów i ich barwienia, przygotowywaniu preparatów mikroskopowych, analizach cytotoksyczności, analizie koimmunoprecypitacji białek i immunoprecypitacji chromatyny, analizie danych klinicznych, wykonaniu analiz statystycznych i interpretacji wyników oraz współuczestniczeniu w przygotowaniu pierwotnej oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 42%.

5) **Gronkowska, K.**; Kołacz-Milewska, K.; Michlewska, S.; Robaszkiewicz, A. P53 supresses transcription of the p300-E2F1-dependent gene subset by maintaining KDM5B associated with gene promoters, bioRxiv 2025.08.25.672089; doi: 10.1101/2025.08.25.672089

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonywaniu części doświadczalnej badań w tym prowadzeniu hodowli komórkowych i traktowaniu komórek lekami i wyciszaniu ekspresji genów, oznaczaniu poziomu mRNA za pomocą Real-time PCR oraz poziomu białek metodą Western Blot, analizie cyklu za pomocą cytometrii przepływowej, przygotowywaniu preparatów mikroskopowych, pomiarach intensywności i kolokalizacji białek, analizach

cytotoksyczności, analizie koimmunoprecypitacji białek i immunoprecypitacji chromatyny, wykonaniu analiz statystycznych i interpretacji wyników oraz współuczestniczeniu w przygotowaniu pierwotnej oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 41%.

Karolina Gronkawska...

(podpis)

Łódź, 10.09.25r.....

(miejsce, data)

Dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz, prof. UŁ
Katedra Biofizyki Ogólnej,
Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki,
Pomorska 141/143, 90-236 Łódź

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

1) Gronkowska, K.; **Robaszkiewicz, A.** p300 dysregulation in cancers and its cross-talk with other epigenetic factors – a comprehensive review, *Mol Ther Oncol.* 2024 Sep 2;32(4):200871; doi: 10.1016/j.omton.2024.200871

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na określeniu zakresu wymaganych informacji oraz współuczestniczeniu w przygotowaniu pierwotnej oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 30%.

2) Gronkowska, K.; Michlewska, S.; **Robaszkiewicz, A.** Activity of lysosomal ABCC3, ABCC5 and ABCC10 is responsible for lysosomal sequestration of doxorubicin and paclitaxel-OregonGreen488 in paclitaxel-resistant cancer cell lines, *Cell Physiol Biochem* 2023; 57(5):360-378; doi: 10.33594/000000663

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zapewnieniu finansowania badań, sprawowaniu nadzoru merytorycznego, wykonaniu analiz statystycznych i interpretacji wyników, opracowaniu układu figur oraz współuczestniczeniu w przygotowaniu pierwotnej oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 48%.

3) Gronkowska, K.; Michlewska, S.; Płoszaj, T.; Strachowska, M.; Stępień, A.; Borowiec, M.; Bednarek, A.; **Robaszkiewicz, A.** BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel, *bioRxiv* 2025.05.01.651609;

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zapewnieniu finansowania badań, sprawowaniu nadzoru merytorycznego, wykonaniu analiz bioinformatycznych, wykonaniu analiz

statystycznych i interpretacji wyników, opracowaniu układu figur oraz współuczestniczeniu w przygotowaniu pierwotnej oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 41%.

4) Gronkowska, K.; Kołacz-Milewska, K.; Michlewska, S.; Płoszaj, T.; Borowiec, M.; **Robaszkiewicz, A.** Interaction of HIF1A with BRG1 and p300 confers paclitaxel-induced drug resistance by enabling the overexpression of ABCC genes, Mol Ther Oncol. doi:1016/j.omton.2025.201049

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zapewnieniu finansowania badań, sprawowaniu nadzoru merytorycznego, wykonaniu analiz bioinformatycznych, wykonaniu analiz statystycznych i interpretacji wyników, opracowaniu układu figur oraz współuczestniczeniu w przygotowaniu pierwotnej oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 42%.

5) Gronkowska, K.; Kołacz-Milewska, K.; Michlewska, S.; **Robaszkiewicz, A.** P53 supresses transcription of the p300-E2F1-dependent gene subset by maintaining KDM5B associated with gene promoters, bioRxiv 2025.08.25.672089; doi: 10.1101/2025.08.25.672089

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zapewnieniu finansowania badań, sprawowaniu nadzoru merytorycznego, wykonaniu analiz bioinformatycznych, wykonaniu analiz statystycznych i interpretacji wyników, opracowaniu układu figur oraz współuczestniczeniu w przygotowaniu pierwotnej oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

Robaszkiewicz
.....

(podpis)

Łódź, 15.09.25r.....

(miejsce, data)

Dr hab. Sylwia Michlewska

Pracownia Obrazowania Mikroskopowego i Specjalistycznych Technik Biologicznych ,
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki,
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

1) Gronkowska, K.; **Michlewska, S.**; Robaszkiewicz, A. Activity of lysosomal ABCC3, ABCC5 and ABCC10 is responsible for lysosomal sequestration of doxorubicin and paclitaxel-OregonGreen488 in paclitaxel-resistant cancer cell lines, Cell Physiol Biochem 2023; 57(5):360-378; doi: 10.33594/000000663

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na obrazowaniu mikroskopowym, pomiarach akumulacji związków i kolokalizacji białek z lizosomami oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 4%.

2) Gronkowska, K.; **Michlewska, S.**; Płoszaj, T.; Strachowska, M.; Stępień, A.; Borowiec, M.; Bednarek, A.; Robaszkiewicz, A. BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel, bioRxiv 2025.05.01.651609;

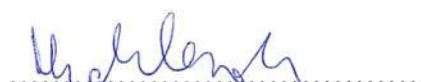
mój wkład w powstanie tej pracy polegał na obrazowaniu mikroskopowym, pomiarach akumulacji związków i kolokalizacji białek z lizosomami oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 5%.

3) Gronkowska, K.; Kołacz-Milewska, K.; **Michlewska, S.**; Płoszaj, T.; Borowiec, M.; Robaszkiewicz, A. Interaction of HIF1A with BRG1 and p300 confers paclitaxel-induced drug resistance by enabling the overexpression of ABCC genes, Mol Ther Oncol. doi:1016/j.omton.2025.201049

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na obrazowaniu mikroskopowym, pomiarach akumulacji związków i kolokalizacji białek z lizosomami oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 5%.

4) Gronkowska, K.; Kołacz-Milewska, K.; **Michlewska, S.**; Robaszkiewicz, A. P53 supresses transcription of the p300-E2F1-dependent gene subset by maintaining KDM5B associated with gene promoters, bioRxiv 2025.08.25.672089; doi: 10.1101/2025.08.25.672089

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na obrazowaniu mikroskopowym oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 3%.



(podpis)

Łódź, 12.09.2025r.....

(miejsce, data)

Dr. Magdalena Strachowska
Katedra Cytobiochemii,
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki,
Pomorska 141/143, 90-236 Łódź

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Gronkowska, K.; Michlewska, S.; Płoszaj, T.; **Strachowska, M.**; Stępień, A.; Borowiec, M.; Bednarek, A.; Robaszkiewicz, A. BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel, bioRxiv 2025.05.01.651609;

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na oznaczeniu poziomu mRNA transporterów ABC za pomocą Real-time PCR w komórkach MDA-MB-231 po wyciszeniu BRG1 i po zastosowaniu inhibitora SWI/SNF - PFI3 oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 4%.

Strachowska Magdalena.....

(podpis)

Łódź, 15.09.2025r.....

(miejsce, data)

Mgr. Adrianna Stępień

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Gronkowska, K.; Michlewska, S.; Płoszaj, T.; Strachowska, M.; **Stępień, A.**; Borowiec, M.; Bednarek, A.; Robaszkiewicz, A. BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel, bioRxiv 2025.05.01.651609;

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu części powtórzeń oznaczenia poziomu mRNA transporterów ABC za pomocą Real-time PCR w komórkach opornych na paklitaksel po wyciszeniu BRG1 oraz części powtórzeń testu cytotoksyczności po zastosowaniu inhibitora SWI/SNF – PFI3. Mój udział procentowy szacuję na 3%.

Adrianna Stępień

(podpis)

Łódź, 11.09.2025r.....

(miejsce, data)

Mgr. Kinga Kołacz-Milewska
Katedra Biofizyki Ogólnej,
Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki,
Pomorska 141/143, 90-236 Łódź

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

1) Gronkowska, K.; **Kołacz-Milewska, K.**; Michlewska, S.; Płoszaj, T.; Borowiec, M.; Robaszkiewicz, A. Interaction of HIF1A with BRG1 and p300 confers paclitaxel-induced drug resistance by enabling the overexpression of ABCC genes, Mol Ther Oncol. doi:1016/j.omton.2025.201049

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w wykonywaniu części doświadczalnej badań w tym analiz poziomu mRNA i poziomu białek (ryc.2 A-D) oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 6%.

5) Gronkowska, K.; **Kołacz-Milewska, K.**; Michlewska, S.; Robaszkiewicz, A. P53 supresses transcription of the p300-E2F1-dependent gene subset by maintaining KDM5B associated with gene promoters, bioRxiv 2025.08.25.672089; doi: 10.1101/2025.08.25.672089

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na pomocy przy wykonywaniu części doświadczalnej badań w tym oznaczeniu koimmunoprecypitacji białek (Ryc. 2J) oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 6%.

Kinga Kołacz-Milewska

(podpis)

Łódź 11.09.2025

(miejsce, data)

Dr n. med. Tomasz Płoszaj
Zakład Genetyki Klinicznej,
Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi,
ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

1) Gronkowska, K.; Michlewska, S.; **Płoszaj, T.**; Strachowska, M.; Stępień, A.; Borowiec, M.; Bednarek, A.; Robaszkiewicz, A. BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel, bioRxiv 2025.05.01.651609;

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przeprowadzeniu sekwencjonowania Sangera, sekwencjonowania NGS oraz sprawowaniu nadzoru merytorycznego nad eksperymentami wykorzystującymi analizę bioinformatyczną. Mój udział procentowy szacuję na 4%.

2) Gronkowska, K.; Kołacz-Milewska, K.; Michlewska, S.; **Płoszaj, T.**; Borowiec, M.; Robaszkiewicz, A. Interaction of HIF1A with BRG1 and p300 confers paclitaxel-induced drug resistance by enabling the overexpression of ABCC genes, Mol Ther Oncol. doi:10.1016/j.omton.2025.201049

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przeprowadzeniu sekwencjonowania NGS oraz sprawowaniu nadzoru merytorycznego nad eksperymentami wykorzystującymi analizę bioinformatyczną. Mój udział procentowy szacuję na 4%.

Tomasz Płoszaj

(podpis)

Łódź, 12.09.25.....

(miejsce, data)

prof. dr hab. n. med. Maciej Borowiec
Zakład Genetyki Klinicznej,
Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi,
ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź

OŚWIADCZENIE

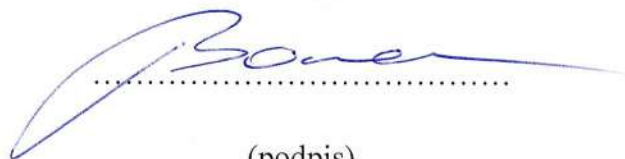
Oświadczam, że w pracy:

1) Gronkowska, K.; Michlewska, S.; Płoszaj, T.; Strachowska, M.; Stępień, A.; **Borowiec, M.**; Bednarek, A.; Robaszkiewicz, A. BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance induced by paclitaxel, bioRxiv 2025.05.01.651609;

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na redagowaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 1%.

2) Gronkowska, K.; Kołacz-Milewska, K.; Michlewska, S.; Płoszaj, T.; **Borowiec, M.**; Robaszkiewicz, A. Interaction of HIF1A with BRG1 and p300 confers paclitaxel-induced drug resistance by enabling the overexpression of ABCC genes, Mol Ther Oncol. doi:1016/j.omton.2025.201049

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na redagowaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 1%.



(podpis)

Łódź, 17.09.2025

(miejsce, data)

prof. dr hab. n. med. Andrzej K. Bednarek
Zakład Kancerogenezy Molekularnej
Oddziału Nauk Biomedycznych Wydziału Lekarskiego, Uniwersytet Medyczny w Łodzi,
ul. Żeligowskiego 7/9, 90-752 Łódź

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

1) Gronkowska, K.; Michlewska, S.; Płoszaj, T.; Strachowska, M.; Stepień, A.; Borowiec, M.;
Bednarek, A.; Robaszkiewicz, A. BRG1 targeting overcomes ABCC-based multidrug resistance
induced by paclitaxel, bioRxiv 2025.05.01.651609;

mój wkład w powstanie tej pracy polegał na redagowaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój
udział procentowy szacuję na 1%.



(podpis)