

## Streszczenie pracy doktorskiej w języku polskim

Tytuł pracy doktorskiej: „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 terapie celowane 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 PF13 lub degradacja ATPazy 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-Chek1/2-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*.

Karolina Gronkowska