



UNIWERSYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI
Oddział Nauk Biomedycznych Wydziału Lekarskiego

**Analiza mechanizmu uwrażliwiania komórek
nowotworowych na cytostatyki za pomocą inhibitorów
naprawy pęknięć dwuniciowych DNA**

mgr Paulina Kopa-Stojak

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. n. biol. Tomasza Popławskiego
w Katedrze Genetyki Molekularnej
Uniwersytetu Łódzkiego

Łódź, kwiecień 2022

Streszczenie

Wstęp

Większość obecnie stosowanych chemioterapii polega na uszkodzeniu DNA w szybko dzielących się komórkach, w tym nowotworowych. U niektórych chorych dochodzi do rozwoju oporności komórek nowotworowych na stosowane chemioterapeutyki i progresji choroby. Głównym mechanizmem leżącym u podstaw tej oporności jest podwyższenie efektywności naprawy uszkodzeń DNA. Zablokowanie naprawy uszkodzeń DNA za pomocą specyficznych inhibitorów może przełamać oporność na chemioterapeutyki uszkadzające DNA, co otworzyło nowy kierunek badań dotyczących modulowania odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA, aby uzyskać kontrolę nad tym procesem i skierować go przeciwko komórkom nowotworowym. Spośród chemioterapeutyków uszkadzających DNA najczęściej stosowane są związki, które pośrednio i bezpośrednio indukują pęknięcia dwuniciowe DNA takie jak związki platyny czy też inhibitory topoisomerazy I i II. Główną rolę w naprawie DSB u ssaków odgrywa niehomologiczne łączenie końców (NHEJ) oraz naprawa przez rekombinację homologiczną (HRR). Innowacyjnym podejściem jest więc zastosowanie czynników wywołujących DSB oraz inhibitorów naprawy DSB szlaku NHEJ, co może pozwolić na uwrażliwienie komórek nowotworowych na leki.

Cel

Celem pracy była analiza efektu terapeutycznego zastosowania terapii skojarzonej w leczeniu glejaka wielopostaciowego oraz gruczolakoraka jelita grubego oraz określenie mechanizmu uwrażliwiania komórek nowotworowych na standardową terapię przy pomocy inhibitorów naprawy pęknięć dwuniciowych DNA.

Materialy i metody

Do oceny efektu terapeutycznego zastosowania leczenia skojarzonego (inhibitorami Topo2 (α/β), cisplatyną/inhibitorem Topo2) oraz wpływu inhibitorów NHEJ (NU7441, SCR7) na uwrażliwienie komórek na standardową terapię posłużyły linie komórkowe: glejaka wielopostaciowego (M059K, M059J) oraz gruczolakoraka jelita grubego (LoVo). Do określenia cytotoksyczności badanych chemioterapeutyków zastosowano test kolorymetryczny. Test kometowy posłużył do określenia efektu

genotoksycznego analizowanej terapii skojarzonej z DRI. Cytometria przepływowa została zastosowana w celu zbadania wpływu analizowanych kombinacji na cykl komórkowy oraz apoptozę.

Wyniki

W przeprowadzonych badaniach po raz pierwszy wykazano silny synergizm działania NK314 (nowy inhibitor Topo2 α) ze standardowo stosowanym etopozydem (inhibitorem Topo2 β) w dwóch liniach glejaka (M059K i M059J), co może przyczynić się do zwiększenia skuteczności terapeutycznej leczenia glejaka wielopostaciowego.

NU7441 wpływa na wzrost cytotoksyczności terapii skojarzonej (cisplatyna/inhibitor Topo2 oraz inhibitor Topo2 α /Topo2 β). Ponadto, inhibitor ten zwiększa poziom DSB oraz spowalnia mechanizm ich naprawy. Uzyskane wyniki wskazują również na wpływ NU7441 na modulację cyklu komórkowego, a także indukcję apoptozy. Mechanizm uwrażliwiania komórek gruczolakoraka jelita grubego na terapię skojarzoną cisplatyna/etopozyd poprzez działanie SCR7 powiązany był ze wzmocnieniem efektu cytotoksycznego, indukcją DSB, spowolnieniem naprawy DNA oraz akumulacją komórek w fazie S cyklu komórkowego.

Wnioski

Zastosowanie kombinacji dwóch inhibitorów Topo2 (α/β) jest potencjalnie obiecującym schematem terapii przeciwnowotworowej glejaków. Inhibitory naprawy pęknięć dwuniciowych DNA uwrażliwiają komórki nowotworowe glejaka wielopostaciowego i jelita grubego na cisplatynę/inhibitor Topo2 oraz inhibitor Topo2 α /Topo2 β . Z przedstawionych wyników wynika, iż mechanizm uwrażliwienia komórek linii nowotworowych glejaka wielopostaciowego i jelita grubego polega na indukcji uszkodzeń DNA, spowolnieniu naprawy DNA, modulacji cyklu komórkowego oraz indukcji apoptozy.

Summary

One of the proposed strategies to overcome cancer resistance to standard treatment is a combined therapy with two (or more) drugs with different molecular targets. Such solution is effective only when both drugs act synergistically (25–27). In my study I was able to demonstrate a strong synergism for combined treatment of novel Topo2 inhibitor – NK314 with etoposide in two glial cell lines – M059K and M059J for the first time. In addition, I observed weak synergism for a combined treatment with cisplatin/etoposide for LoVo cells. A cisplatin/Topo2 inhibitor combined treatment, particularly in cells with active DNA-PK, may be ineffective due to antagonism. However, this effect may be revised by using DRI (20). In addition, other data indicate an increased sensitivity of the cells lacking DNA-PK and decreased expression of ATM to Topo2 inhibitors (28), which is consistent with my results comparing wild-type (M059K) and mutant, DNA-PK deficient (M059J) cells. The cisplatin/etoposide combined therapy is a well-known therapeutic approach, with confirmed synergy (29,30). However, employing Topo2 (α/β) is a novel therapeutic approach - particularly promising due to strong synergism, which seems to be shown when combining the treatment of etoposide with NK314. Unfortunately, the combined therapy is not sufficient in all cases. As data suggested, DDR inhibition disrupts the ability to activate DNA repair mechanism in cancer cells, therefore this process seems to be a novel therapeutic target (22–24). Inhibition of DNA repair mechanism should increase the sensitivity of cancer cells for standard combined treatment at lower dose (31).

The results obtained in my studies showed that in each of analyzed models using NU7441 increased the cytotoxicity of the combined treatment with cisplatin/Topo2 inhibitor and Topo2 β /Topo2 α inhibitors. Furthermore, this inhibitor significantly increases DNA damage for cisplatin/etoposide (for LoVo cells). The analysis of DNA repair kinetics showed a significant role of NU7441 in reduction of this mechanism efficiency, which is in accordance with the other results (32). However, it should be pointed that NU7441 acts against other PIKK, not only DNA-PK (17), and Topo2 inhibitor-induced DNA damage is not only repaired by canonical NHEJ, but also alternative pathway (33). The obtained results also indicate the effect of NU7441 on the modulation of cell cycle, especially on cell accumulation in G1 phase (M059K cells) and S phase (LoVo cells). The lack of cell cycle modulation in M059J cells, DNA-PK deficient was confirmed in another study (32). For glioblastoma cell lines (M059K and M059J), despite the literature reference, I was unable to observe the induction of apoptosis for a combined therapy with Topo2 β /Topo2 α inhibitors after using NU7441. This may be a result of difference in the inhibitor dose and the response to NHEJ inhibitor among different cell lines (34,35).

My study allows to determine that the mechanism of sensitization of adenocarcinoma cells in combined treatment with cisplatin/etoposide by SCR7 is associated with the enhancement of cytotoxic effect (with the extension of dose range with synergism of action), DNA damage induction, reduction of DNA repair efficiency and cell accumulation in S phase of the cell cycle. My results are consistent with previous research, which pointed that using SCR7 sensitizes cancer cells to Topo2 inhibitors (36), induces DNA damage and decreases DNA repair mechanism activity (confirmed on the multiform myeloma model). Other data also suggested impact of SCR7 on apoptosis induction. In my study I was not able to demonstrate this effect. The observed differences may be a result of the employed model and doses of SCR7 (37).