

STRESZCZENIE

„Wykorzystanie szlaku kinazy ATR/CHK1 w celu zwiększenia efektywności terapii olaparibem. Porównanie efektów terapeutycznych w modelu *in vitro* oraz *in vivo* raka jajnika opornego na leczenie inhibitorem PARP”

Niskozróżnicowany surowiczy rak jajnika (HGSOC, ang. *high-grade serous ovarian cancer*) to najczęstszy i najgorzej rokujący typ histologiczny raka jajnika, który cechuje się wysoką heterogennością i w przypadku nawrotów uważany jest za chorobę przewlekłą. Od pewnego czasu w leczeniu HGSOC coraz większą rolę odgrywają leki ukierunkowane molekularnie. Olaparib, to niskocząsteczkowy inhibitor polimerazy poli(ADP)rybozy (PARPi, ang. *poly(ADP)ribose polymerase inhibitor*) stosowany w raku jajnika zwykle w leczeniu podtrzymującym platynowrażliwego HGSOC, który został po raz pierwszy zarejestrowany w leczeniu raka jajnika w 2014 roku. Przeprowadzane w kolejnych latach badania kliniczne umożliwiły rozszerzenie wskazań do stosowania tego leku w terapii HGSOC, uwzględniając charakterystykę guzów pacjentek, które mogą uzyskać największe korzyści terapeutyczne. Mechanizm przeciwnowotworowego działania olaparibu w komórkach HGSOC opiera się na wykorzystaniu zjawiska syntetycznej letalności. W przypadku komórek nowotworowych z mutacjami w genach *BRCA1/2*, zaburzającymi szlak naprawy DNA przez rekombinację homologiczną (HR, ang. *homologous recombination*), zahamowanie dodatkowo alternatywnych szlaków naprawy regulowanych przez PARP z użyciem olaparibu prowadzi do akumulacji uszkodzeń DNA prowadzących w konsekwencji do śmierci komórki. Jednak istotnym problemem w terapii raka jajnika z użyciem olaparibu jest nabywanie oporności na ten lek, co znacząco ogranicza potencjał PARPi u pacjentek z HGSOC. Jak dotąd, poznano część mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój oporności na ten PARPi w raku jajnika. Aktualnie podejmowane są także próby przełamania oporności na olaparib z zastosowaniem celowanych terapii skojarzonych. Jedną z obecnie badanych strategii ponownego uwrażliwiania komórek HGSOC na olaparib jest inhibicja szlaku ATR/CHK1, który odpowiedzialny jest za regulację odpowiedzi na uszkodzenia DNA oraz przebiegu cyklu komórkowego. Dalsze badania nad nabywaniem i przełamaniem oporności na olaparib, uwzględniające różnorodność komórek HGSOC, mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia tych zjawisk, a w efekcie poprawę skuteczności terapii raka jajnika przedłużającej czas życia pacjentek.

Uwzględniając powyższe przesłanki, celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena przeciwnowotworowego działania oraz potencjału terapeutycznego połączenia olaparibu z inhibitorem kinazy ATR (ATRi) lub kinazy CHK1 (CHK1i) odpowiednio w modelu *in vitro* oraz *in vivo* HGSOC z mutacjami w genach *BRCA1* i/lub *BRCA2* (*BRCA1/2^{MUT}*) oraz nabytą opornością na olaparib. Jednocześnie porównano skuteczność badanych kombinacji olaparibu ze skutecznością każdego z inhibitorów osobno w hamowaniu wzrostu i przeżycia opornych komórek HGSOC. Ponadto, celem pracy było poznanie mechanizmów związanych z nabywaniem oporności na olaparib oraz jej przełamaniem poprzez inhibicję szlaku ATR/CHK1.

W pierwszej części badań *in vitro* wyprowadzono linię komórkową raka jajnika PEO1-OR oporną na olaparib z macierzystej linii wrażliwej PEO1 oraz zbadano molekularne mechanizmy odpowiedzialne za nabywanie fenotypu opornego. Jednym ze zidentyfikowanych w warunkach

in vitro mechanizmów oporności była selekcja klonalna w kierunku komórek posiadających rewersję mutacji w genie *BRCA2* przywracająca prawidłową ramkę odczytu. Następnie wytypowano stężenia inhibitorów wykazujących w kombinacji synergistycznie działanie przeciwnowotworowe w komórkach linii wrażliwych (PEO1 i PEO4) przy jednoczesnym niewielkim wpływie na przeżycie komórek linii niewrażliwej (PEO1-OR) w celu porównania na poziomie molekularnym odpowiedzi komórek HGSOc zależne od wrażliwości na PARPi. W związku z tym zbadano między innymi ekspresję polimerazy PARP1 i glikohydrolazy PARG, kinazy ATR i CHK1 oraz ich fosforylację, a także białek zaangażowanych w szlaki naprawy DNA (*BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51*, *53BP1*, γ H2AX). Ponadto oceniono rolę glikoproteiny P w odpowiedzi na badane inhibitory oraz zbadano przebieg cyklu komórkowego i poziom uszkodzeń DNA indukowanych przez badane związki.

Kolejny etap badań *in vitro* obejmowało porównanie przeciwnowotworowego działania inhibitorów stosowanych osobno, jak i w kombinacji w wyższych stężeniach wykazujących synergistyczne działanie przeciwnowotworowe w komórkach PEO1-OR. Co ważne, potwierdzono, że inhibicja szlaku ATR/CHK1 umożliwia przełamanie oporności na olaparib w warunkach *in vitro*. Dodatkowo, zbadano odpowiedź uwrażliwionych komórek PEO1-OR na badane kombinacje, w tym oceniono udział apoptozy, aktywność kaspaz-3/7 oraz ekspresję panelu 27 białek zaangażowanych w szlak naprawy DNA.

W następnej części badań *in vitro* skupiono się na roli cząsteczek mikroRNA (miRNA) w nabywaniu i przełamywaniu oporności na olaparib. W tym celu przeprowadzono profilowanie ekspresji miRNA we wszystkich trzech liniach komórkowych HGSOc. Następnie wykonano analizy bioinformatyczne umożliwiające zidentyfikowanie genów docelowych dla miRNA o zmienionej ekspresji oraz procesów komórkowych i szlaków sygnałowych związanych z wytypowanymi genami. Na koniec oceniono związek pomiędzy miRNA o zmienionej ekspresji w linii PEO1-OR oraz ich genami docelowymi a przeżyciem pacjentek z surowiczym rakiem jajnika na podstawie danych klinicznych z repozytorium.

Ostatni etap badań obejmował ocenę potencjału terapeutycznego kombinacji olaparibu z inhibitorami szlaku ATR/CHK1 w warunkach *in vivo* w mysim modelu opornego na olaparib heteroprzeszczepu guza pochodzącego od pacjentki z HGSOc. Co ważne, potwierdzono, że dodanie do olaparibu ATRi lub CHK1i prowadzi do synergistycznego zahamowania wzrostu guzów opornych na olaparib. Dodatkowo, scharakteryzowano zmiany zachodzące podczas nabywania oporności na olaparib oraz odpowiedź uwrażliwionych guzów na badane kombinacje, w tym przeprowadzono analizy histopatologiczne oraz badania molekularne.

Podsumowując, zrealizowane w ramach niniejszej rozprawy badania potwierdziły, że dodanie ATRi lub CHK1i do olaparibu przełamuje oporność na PARPi w komórkach raka jajnika z nabytą opornością na olaparib. Synergistyczne przeciwnowotworowe działanie kombinacji olaparibu z inhibitorami szlaku ATR/CHK1 stwierdzono zarówno w modelu *in vitro* opartym o ludzką linię komórkową HGSOc, jak i w mysim modelu *in vivo* opartym o heteroprzeszczep guza pozyskanego od pacjentki z HGSOc. Uzyskane wyniki wskazują na duży potencjał celowanej terapii skojarzonej łączącej olaparib z inhibitorami szlaku ATR/CHK1 u opornych na olaparib pacjentek z rakiem jajnika będących nosicielkami mutacji w genach *BRCA1/2*.

ABSTRACT

**„Targeting the ATR/CHK1 pathway to increase the efficacy of olaparib therapy.
A comparison of therapeutic effects in ovarian cancer models
resistant to PARP inhibitors *in vitro* and *in vivo*”**

High-grade serous ovarian cancer (HGSOC) is the most common and lethal histotype of ovarian cancer, characterized by tumor heterogeneity and regarded as a chronic condition upon recurrence. Recently, targeted therapy drugs have gained increasing relevance in HGSOC treatment. Olaparib, a small-molecule poly(ADP)ribose polymerase inhibitor (PARPi), received its initial approval for ovarian cancer therapy in 2014. Currently, olaparib is primarily recommended for use in HGSOC as maintenance therapy for platinum-sensitive patients. Clinical trials assessing olaparib's efficacy in various HGSOC cohorts have allowed for the expansion of its indications based on the characteristics of patients' tumors, which help predict drug efficacy. Olaparib's antitumor mechanism of action relies on the concept of synthetic lethality. In the context of *BRCA1/2*-mutated tumors with homologous recombination deficiency, this concept refers to a phenomenon where simultaneous inhibition of alternative DNA repair pathways controlled by PARP1 with olaparib leads to the accumulation of DNA damage and cell death. Unfortunately, acquired resistance to olaparib poses a significant challenge in the treatment of ovarian cancer, limiting its effectiveness in HGSOC patients. To date, several mechanisms of resistance to PARPi have been elucidated in ovarian cancer. Nowadays, combination targeted therapies constitute a promising approach to overcoming olaparib resistance. Current studies investigate the potential of inhibiting the ATR/CHK1 pathway, regulating DNA damage response and cell cycle, to resensitize HGSOC to olaparib. Future studies linking HGSOC heterogeneity with acquiring and overcoming resistance to olaparib can enhance our understanding of these processes, leading to the development of therapies with enhanced efficacy in ovarian cancer.

In view of the above, the presented doctoral dissertation aimed to assess the antitumor activity and therapeutic potential of combining olaparib with the ATR kinase inhibitor (ATRi) and CHK1 kinase inhibitor (CHK1i) in both *in vitro* and *in vivo* models of olaparib-resistant *BRCA1/2*^{MUT} HGSOC, respectively. Additionally, the activity of each single-agent inhibitor was compared with their combinations regarding tumor growth inhibition and survival. Furthermore, the conducted studies sought to elucidate the mechanisms associated with both conferring and overcoming resistance to olaparib through the ATR/CHK1 pathway inhibition.

In the first part of *in vitro* studies, the olaparib-resistant ovarian cancer PEO1-OR cell line was developed from the parental olaparib-sensitive PEO1 cell line. Molecular mechanisms underlying the resistant phenotype were established, which included the subclonal enrichment of the *BRCA2* secondary mutation restoring the protein's open reading frame. Subsequent investigations enabled me to identify concentrations of combined inhibitors that exerted synergistic antitumor activity in olaparib-sensitive cell lines (PEO1 and PEO4), while minimally affecting the survival of the olaparib-resistant cell line (PEO1-OR). Using these selected doses, HGSOC cell responses were compared across cell lines with varying sensitivities to olaparib. This comparison encompassed the PARP1 polymerase and PARG glycohydrolase expression, ATR and CHK1 kinases expression and

phosphorylation as well as levels of DNA damage repair-related proteins (BRCA1, BRCA2, RAD51, 53BP1, γ H2AX). Moreover, we investigated the role of glycoprotein P (MDR1), changes in cell cycle progression, and DNA damage in the context of the HGSOC responses to tested inhibitors.

In the subsequent phase of *in vitro* studies, the antitumor activity of each single-agent inhibitor was compared with their combinations at higher concentrations, which demonstrated synergistic activity in PEO1-OR cells. Importantly, overcoming resistance to olaparib through targeted inhibition of the ATR/CHK1 pathway was confirmed. Furthermore, the response of PEO1-OR cells resensitized to olaparib with the ATR/CHK1 pathway inhibitors was characterized. This characterization included the role of apoptosis, caspase-3/7 activity, and the expression of 27 proteins involved in DNA damage response.

The subsequent part of *in vitro* studies was dedicated to investigating the role of microRNA (miRNA) in both acquiring and overcoming resistance to olaparib. To begin, miRNA profiles were established in all three HGSOC cell lines. Subsequently, bioinformatic analyses were conducted to identify genes targeted by differentially-expressed miRNAs and to unveil enriched biological processes and signaling pathways linked to these genes. Lastly, the association between miRNAs that were differentially-expressed in the PEO1-OR cell line, along with their target genes, and survival outcomes of HGSOC patients based on available clinical data.

The final part of the studies was focused on assessing the therapeutic potential of combining olaparib with the ATR/CHK1 pathway inhibitors *in vivo*, utilizing the olaparib-resistant mouse xenograft model of HGSOC derived from a patient's tumor. Notably, the addition of ATRi or CHK1i to olaparib resulted in synergistic growth inhibition of tumors with acquired resistance to olaparib. Moreover, changes associated with acquiring and overcoming resistance to olaparib were characterized through histopathological and molecular analyses of the resensitized tumors.

In summary, conducted studies confirmed that adding ATRi or CHK1 to olaparib effectively overcomes resistance to tested PARPi in HGSOC cells that had acquired resistance to olaparib. Synergistic antitumor activity of olaparib combined with the ATR/CHK1 pathway inhibitors was documented in both *in vitro* the HGSOC cell line model and *in vivo* in the HGSOC patients-derived xenograft model. These findings highlight the potential of a targeted therapy combining olaparib with the ATR/CHK1 pathway inhibitors for ovarian cancer patients harboring *BRCA1/2* mutations.