

Lek. Dawid Mehlich

**Poszukiwanie racjonalnych strategii przełamania
chemiooporności potrójnie ujemnego raka piersi - kinaza MLK4
jako nowy cel terapeutyczny**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. Dominika Nowis

Promotor pomocniczy: dr Anna Marusiak

Badania przeprowadzono w Laboratorium Medycyny Doświadczalnej, Centrum Nowych Technologii UW i zakończono w Laboratorium Molekularnej OnkoSygnalizacji, Międzynarodowy Instytut Mechanizmów i Maszyn Molekularnych Polskiej Akademii Nauk.



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023 r.

Streszczenie w języku polskim

Rak piersi jest najczęściej diagnozowanym nowotworem złośliwym i obok raka płuca stanowi główną przyczynę zgonów nowotworowych u kobiet w Polsce i na świecie. Podtyp potrójnie ujemny raka piersi (*ang. triple-negative breast cancer, TNBC*) charakteryzuje się brakiem obecności receptorów dla estrogenu i progesteronu oraz brakiem zwiększonej ekspresji receptora HER2. Na tle innych podtypów raka piersi, nowotwory potrójnie ujemne wyróżnia wysoka złośliwość, agresywny przebieg kliniczny choroby i niekorzystne rokowanie. Na przestrzeni ostatnich lat przeprowadzono szereg badań podstawowych i klinicznych, które pozwoliły na opracowanie nowych metod leczenia TNBC, do których należą między innymi immunoterapia, terapia z wykorzystaniem inhibitorów PARP oraz terapia z wykorzystaniem koniugatów związków cytotoksycznych i przeciwciał. Pomimo znacznego postępu badawczego, obecne możliwości leczenia celowanego TNBC pozostają ograniczone, a chemioterapia nadal jest najpowszechniej stosowaną metodą leczenia systemowego u chorych z tym nowotworem. Pierwotna i nabyta oporność komórek nowotworowych na chemioterapeutyki stanowi główną przeszkodę w uzyskaniu skuteczności klinicznej stosowanego leczenia. Istnieje zatem wyraźna potrzeba badań podstawowych, które pozwolą na lepsze poznanie mechanizmów leżących u podłoża chemiooporności i będą stanowiły pierwszy krok w kierunku opracowania nowych strategii terapeutycznych. Kinazy białkowe to enzymy, które poprzez reakcje fosforylacji (przenoszenia reszt kwasu fosforowego na substraty) koordynują aktywację wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału i tym samym mogą regulować wiele procesów biologicznych. Nadmierna aktywacja kinaz białkowych odgrywa istotną rolę w patogenezie i nabywaniu chemiooporności wielu nowotworów, w tym potrójnie ujemnych nowotworów piersi. Drobnocząsteczkowe inhibitory kinaz mogą być wykorzystane do przełamania lekooporności komórek nowotworowych i poprawy wyników leczenia w terapii skojarzonej z chemioterapią. Mimo to w dotychczasowych badaniach klinicznych z udziałem chorych na TNBC, inhibitory kinaz wykazywały jedynie umiarkowaną skuteczność.

Pierwszy artykuł wchodzący w skład cyklu (Mehlich i Marusiak, *Cancer Letters*) to praca przeglądowa, w której przedstawiłem dotychczasowe badania kliniczne i przedkliniczne opisujące skuteczność terapeutyczną drobnocząsteczkowych inhibitorów kinaz w leczeniu TNBC. W artykule tym opisałem heterogenność w obrębie potrójnie ujemnych nowotworów piersi, która może w istotnym stopniu ograniczać skuteczność terapii celowanych. Ponadto,

przeprowadzona przeze mnie analiza wykazała, że dotychczasowe badania przedkliniczne i kliniczne skupiały się na terapiach ukierunkowanych na względnie niewielką część najlepiej poznanych kinaz. W oparciu o dotychczas zgromadzone dane uzasadnione wydaje się zatem poszukiwanie nowych kinaz, które mogą stanowić potencjalny cel terapii TNBC.

W drugim artykule wchodzącym w skład niniejszego cyklu (Mehlich i wsp., Cell Death and Disease), przedstawiłem oryginalne badania, które pozwoliły na kompleksowe scharakteryzowanie roli kinazy białkowej MLK4 w regulacji chemiooporności TNBC. Kinaza MLK4 należy do grupy kinaz MAP3K. Analiza danych uzyskanych metodą sekwencjonowania następnej generacji, wykazała, że gen kodujący kinazę MLK4 (*MAP3K21/KIAA1804*) ulega amplifikacji i zwiększonej ekspresji w ponad 20% przypadków raka piersi i ponad 50% przypadków raków o podtypie potrójnie ujemnym. Badania przeprowadzone wcześniej przez nasz zespół wykazały, że kinaza ta promuje proliferację i inwazyjny wzrost komórek raka piersi w modelach *in vitro* oraz *in vivo*. W ramach realizacji mojej pracy doktorskiej, przeprowadziłem analizę danych transkryptomicznych zgromadzonych w bazie GEO NCBI, która wykazała, że zwiększona ekspresja kinazy MLK4 w bioptatach pobranych od chorych z rakami potrójnie ujemnymi poddawanych chemioterapii przedoperacyjnej wiąże się z gorszą odpowiedzią na leczenie i niekorzystnym rokowaniem. W kolejnych doświadczeniach zaobserwowałem, że kinaza MLK4 promuje chemiooporność ludzkich linii komórek potrójnie ujemnego raka piersi w modelach *in vitro* oraz w mysim modelu ksenoprzeszczepienia *in vivo*. Zarówno wyciszenie ekspresji genu dla MLK4 jak i zablokowanie funkcji katalitycznej tej kinazy przy pomocy drobnocząsteczkowych inhibitorów uwrażliwiało komórki nowotworowe na klinicznie stosowane chemioterapeutyki. Ponadto, zahamowanie aktywności MLK4 nie nasilało cytotoksycznego działania chemioterapii względem kontrolnych komórek nienowotworowych. Wykorzystując metody cytometrii przepływowej i mikroskopii konfokalnej zaobserwowałem, że w komórkach z wyciszoną ekspresją genu dla MLK4 dochodzi do nasilonej indukcji apoptozy oraz akumulacji uszkodzeń DNA. Aby lepiej zrozumieć, w jaki sposób kinaza MLK4 promuje oporność na chemioterapię, przeprowadziłem kolejne eksperymenty z wykorzystaniem metod proteomicznych, testów reporterowych oraz modeli komórkowych z delecją genu *MLK4* wprowadzoną metodą CRISPR/Cas9. Doświadczenia te wykazały, że kinaza MLK4 poprzez aktywację kinazy ATM reguluje proces naprawy podwójnych pęknięć nici DNA indukowanych przez chemioterapeutyki. Następnie przeprowadziłem analizę profilu ekspresji genów w inkubowanych z chemioterapeutykami komórkach z wyciszoną i zachowaną ekspresją genu dla MLK4, wykorzystując metodę RNA-seq. Analiza ta wykazała, że MLK4 odpowiada za indukcję szlaku przekazywania sygnału

ATM-NEMO i aktywację czynników transkrypcyjnych z grupy NF- κ B, które promują przeżycie komórek nowotworowych w odpowiedzi na chemioterapię.

Podsumowując, kinazy białkowe mogą stanowić atrakcyjny cel w terapii i przełamywaniu chemiooporności TNBC. Kolejne badania przedkliniczne i kliniczne z wykorzystaniem drobnocząsteczkowych inhibitorów kinaz powinny uwzględniać heterogenność biologiczną i zróżnicowaną odpowiedź na leczenie w tej grupie nowotworów. Wysoce uzasadnione jest prowadzenie badań mających na celu poszukiwanie nowych celów terapeutycznych. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują na to, że zahamowanie kinazy MLK4 może okazać się skuteczną strategią przełamywania chemiooporności u dużej części chorych z rakami potrójnie ujemnymi. Drobnocząsteczkowe inhibitory kinazy MLK4 mogą zatem pozwolić na opracowanie nowych, skuteczniejszych niż dotychczasowe, terapii skojarzonych w leczeniu tych nowotworów. Ponadto, uzyskane przeze mnie wyniki opisują niekanoniczne i do tej pory nieznane funkcje kinazy MLK4 w regulacji procesu naprawy DNA.