



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**
Uniwersytet Łódzki

InterDOC-START – Interdyscyplinarne Studia
Doktoranckie

Maciej Sobczak

**Epigenetyczne mechanizmy regulujące
proliferyzację i oporność komórek
nowotworowych na leczenie
cytostatykami w badaniach *in vitro*
oraz *in silico***

Praca doktorska wykonana w Katedrze
Biofizyki Ogólnej Instytutu Biofizyki
Uniwersytetu Łódzkiego

Promotor:

Dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz,
profesor UŁ

Katedra Biofizyki Ogólnej,
Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki

Promotor pomocniczy:

Dr Tomasz Płoszaj

Zakład Genetyki Klinicznej,

Wydział Lekarski, Uniwersytet
Medyczny w Łodzi

Epigenetic mechanisms regulating the proliferation
and resistance of cancer cells to treatment with
cytostatic drugs in *in vitro* and *in silico* studies



Łódź 2022

*Składam serdeczne podziękowania dla **Pani dr hab. Agnieszki Robaszkiewicz, prof. UŁ**, oraz dla **Pana dr n.med. Tomasza Płoszaja** za nieocenioną pomoc, opiekę merytoryczną oraz cierpliwość okazaną w okresie przygotowania niniejszej pracy doktorskiej.*

*Z całego serca dziękuję **pracownikom i doktorantom Katedry Biofizyki Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego** za wspaniałą atmosferę pracy oraz wsparcie w trakcie pracy badawczej.*

Spis treści

Źródła finansowania pracy doktorskiej.....	4
Dorobek naukowy	5
Staże zagraniczne.....	7
Wstęp	7
Cel pracy	10
Materiały i metody.....	11
Hodowla komórkowa oraz traktowanie inhibitorami.....	11
Indukowanie oporności na cisplatynę	11
Analizy <i>in silico</i>	12
Analizy <i>in vitro</i>	13
Analizy statystyczne.....	17
Omówienie wyników	17
Wnioski	27
Literatura.....	28
Streszczenie pracy doktorskiej w języku polskim	31
Streszczenie pracy doktorskiej w języku angielskim.....	34

Załączniki:

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

Źródła finansowania pracy doktorskiej

Grant Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Sonata DEC-2013/11/D/NZ2/00033 pt. "Transkrypcyjno-epigenetyczna rola polimerazy poli(ADP-rybozy)-1 w warunkowaniu ekspresji czynników prozapalnych kontrolowanych przez oś NF-κB w mieloidalnych komórkach efektorowych", kierownik: dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz, prof. UŁ.



Grant Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach konkursu 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



Narodowe Centrum
Badań i Rozwoju



Praca doktorska została przygotowana w ramach projektu "InterDOC-STARt – Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie na Wydziale BiOŚ UŁ” - Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, Oś priorytetowa III. Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju, Działanie 3.2 Studia doktoranckie. Nr projektu: POWR.03.02.00-IP.08-00-DOK/16. Realizowany w latach 2018-2022. Kierownik – prof. dr hab. Agnieszka Marczak.



Fundusze
Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Narodowe Centrum
Badań i Rozwoju



Dorobek naukowy

Niniejsza rozprawa doktorska oparta jest na trzech artykułach oryginalnych i jednej pracy przeglądowej publikowanych w recenzowanych czasopismach.

Sobczak, M.; Pitt, A.R.; Spickett, C.M.; Robaszkiewicz, A. PARP1 Co-Regulates EP300–BRG1-Dependent Transcription of Genes Involved in Breast Cancer Cell Proliferation and DNA Repair. *Cancers* 2019, 11, 1539.

IF₂₀₁₉ = 6,126, MNiSW = 140 pkt

Sobczak, M.; Pietrzak, J.; Płoszaj, T.; Robaszkiewicz, A. BRG1 Activates Proliferation and Transcription of Cell Cycle-Dependent Genes in Breast Cancer Cells. *Cancers* 2020, 12, 349. IF₂₀₁₉ = 6,126, MNiSW = 140 pkt

Sobczak, M.; Strachowska, M.; Robaszkiewicz, A. Udział kompleksów SWI/SNF opartych na aktywności BRG1 w determinowaniu fenotypu komórek nowotworowych. *Postepy Biochem.* 2020, 10–18.

MNiSW = 20 pkt

Sobczak, M.; Strachowska, M.; Gronkowska, K.; Robaszkiewicz, A. Activation of *ABCC* Genes by Cisplatin Depends on the CoREST Occurrence at Their Promoters in A549 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Cancers* 2022, 14, 894

IF₂₀₂₀ = 6,639, MNiSW = 140 pkt

Suma: 440 pkt MNiSW, IF = 18,891

Pozostały dorobek naukowy:

Sobczak, M.; Zyma, M.; Robaszkiewicz, A. The Role of PARP1 in Monocyte and Macrophage Commitment and Specification: Future Perspectives and Limitations for the Treatment of Monocyte and Macrophage Relevant Diseases with PARP Inhibitors. *Cells* 2020, 9, 2040.

IF₂₀₂₀ = 6,6, MNiSW = 140 pkt

Sobczak, M.; Strachowska, M.; Gronkowska, K.; Karwaciak, I.; Pułaski, Ł.; Robaszkiewicz, A. LSD1 Facilitates Pro-Inflammatory Polarization of Macrophages by Repressing Catalase. *Cells* 2021, 10, 2465.

IF₂₀₂₀ = 6,6, MNiSW = 140 pkt

Sobczak, M. A brief dive into the phenomenon of cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Acta Univ. Lodz. Folia Biol. Oecologica* 2021, 17, 37–41.

MNiSW = 20 pkt

Suma: 300 pkt MNiSW, IF = 13,2

Komunikaty zjazdowe

Sobczak, M.; Robaszkiewicz, A. Profil ekspresji genów komórek nowotworowych linii MCF7 i MDA-MB-231 w analizie *in silico*. V edycja konferencji Nauk o Życiu BioOpen, Łódź, Polska 30-31.05.2019

Strachowska, M.; **Sobczak, M.;** Gronkowska, K.; Robaszkiewicz, A. Effects of LSD1 inhibition on macrophage specialization into a pro-inflammatory phenotype. 1st International Electronic Conference on Molecular Sciences: Druggable Targets of Emerging Infectious Diseases, konferencja online 1-14.09.2021

Sobczak, M.; Robaszkiewicz, A. Analiza *in silico* czynników regulujących ekspresję genów kodujących transportery z rodziny ABC w komórkach A549. VI edycja konferencji Nauk o Życiu BioOpen, konferencja online 15-16.04.2021

Strachowska, M.; **Sobczak, M.;** Gronkowska, K.; Robaszkiewicz, A. LSD1 contributes to defining pro-inflammatory phenotype of human macrophages by repressing catalase. SFRR-INTERNATIONAL 2021 VIRTUAL MEETING, konferencja online 15–18.03.2021

Sobczak, M.; Robaszkiewicz A. BRG1 i Ep300 jako regulatory ekspresji genów w komórkach nowotworu piersi w badaniach *in silico*. Młodzi Naukowcy w Polsce – Badania i Rozwój, konferencja online 26.11.2021

Staże zagraniczne

Staż zagraniczny finansowany w ramach Projektu InterDOC-STARt – Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie na Wydziale BiOŚ UŁ w German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Niemcy (1.05.2021 - 31.07.2021).

W ramach stażu wykonywałem metody takie jak izolacja frakcji cytoplazmatycznej białek, izolacja frakcji jądrowej białek, immunoprecypitacja białek, Western Blot, immunoprecypitacja chromatyny, Real-time PCR, barwienie immunoflorescencyjne preparatów biologicznych, przygotowywanie prób do sekwencjonowania ATAC-seq. Ponadto obrabiałem surowe dane ATAC-seq oraz analizowałem i wizualizowałem otrzymane wyniki ATAC-seq z wykorzystaniem programowania w środowisku R.

Wstęp

Mimo wielu dekad badań, choroby nowotworowe wciąż pozostają jedną z najczęstszych przyczyn zgonów. Wedle danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), w 2020 roku na choroby nowotworowe zmarło 10 milionów pacjentów, a jako najczęściej występujące nowotwory podaje się nowotwory piersi, płuc i jelita grubego [1]. Choroby nowotworowe definiuje się jako choroby powstające wskutek niekontrolowanego podziału komórek, które posiadają szereg zmian genetycznych w odniesieniu do ich prawidłowych odpowiedników. W dalszych etapach rozwoju guza nowotwór może przedostać się do węzłów chłonnych, naciekać tkanki otaczające guz, lub rozsiewać się do daleko położonych tkanek. Inwazyjny fenotyp komórki nowotworowej spowodowany jest szeregiem mutacji w obrębie jej genomu, co przekłada się bezpośrednio na zmiany w jej transkryptomie. Z kolei zmiany na poziomie transkrypcji uwarunkowane są zmianami w funkcjonowaniu enzymów epigenetycznych warunkujących dostępność chromatyny dla maszynery transkrypcyjnej. Do takich enzymów należą m.in. acetylotransferaza histonowa EP300 (białko wiążące E1A P300) i BRG1 (gen związany z Brahma 1), będący składnikami kompleksu SWI/SNF (SWI, ang. Switch; SNF, ang. Sucrose Non-Fermenting). Z danych literaturowych wiadomo, że między tymi enzymami dochodzi do ścisłej współpracy na przykład w regulowaniu ekspresji genów związanych z naprawą uszkodzeń DNA, których regiony promotorowe

charakteryzują się obecnością motywów dla czynników transkrypcyjnych E2F oraz wyspami CpG [2]. BRG1 rozpoznaje acetylowane przez acetylotransferazy histonowe reszty lizyny, a następnie usuwa białka histonowe. W wyniku tego chromatyna ulega rozluźnieniu i nabiera transkrypcyjnie aktywnego charakteru, a to z kolei umożliwia interakcję maszynerii transkrypcyjnej z regionami promotorowymi poszczególnych genów [2]. Co więcej, dobrze udokumentowana jest rola tych enzymów w procesie onkogenezy w przypadku wielu typów nowotworów. BRG1 wpływa na proliferację komórek bezpośrednio regulując przebieg cyklu komórkowego oraz reguluje ekspresję genów zależnych od czynników E2 (E2F) m.in. cykliny A czy cykliny E. Co więcej, BRG1 wraz z białkami z rodziny retinabloma (RB) i deacetylazą histonową (HDAC) reguluje aktywność wyżej wspomnianych cyklin, nadzorując w ten sposób przejście z fazy cyklu komórkowego G1 do fazy S [3]. Ponadto, aktywność BRG1 została powiązana z wieloma procesami komórkowymi takimi jak szlaki WNT i PI3K/AKT, a także z ekspresją transporterów z rodziny ABC (ang. ATP-binding cassette) [4]. Wykazano, że pod wpływem traktowania m.in. dokсорubicyną oraz paklitakselem dochodziło do wzmożonego oddziaływania między BRG1 i niektórymi promotorami genów kodujących transportery ABC, a jego inhibicja prowadziła do uwrażliwienia badanych komórek na chemioterapeutyki [5]. Poza regulacją proliferacji, warto również podkreślić rolę BRG1 w procesie naprawy uszkodzeń DNA. BRG1 może wpływać dwójako na ten proces: pośrednio poprzez regulację ekspresji genów, których produkty zaangażowane są w szlaki naprawy DNA; lub bezpośrednio poprzez interakcję z miejscami pęknięć, gdzie BRG1 rozluźnia chromatynę, co umożliwia oddziaływanie z uszkodzonym DNA białek katalizujących jego naprawę [6–8]. Podobnie jak BRG1, drugi z enzymów - acetylotransferaza EP300 jest zaangażowana w liczne procesy komórkowe. Jest ona regulatorem procesu proliferacji, przebiegu cyklu komórkowego, naprawy DNA oraz śmierci komórkowej. W przypadku nowotworu piersi, EP300 jest bezpośrednio zaangażowane w proces wzrostu guza i powstawania przerzutów [9]. Ponadto, doniesienia literaturowe ukazują rolę EP300 w powstawaniu oporności wielolekowej (MDR) w odpowiedzi na leczenie chemioterapeutykami. Zjawisko nabywania przez komórkę nowotworową oporności wielolekowej jest procesem bardzo złożonym, który przebiega na wielu płaszczyznach. Komórka nowotworowa może jej nabrać między innymi poprzez aberracje w transporcie leków do komórki jak i nadmiernym ich usuwaniu, zmiany w obrębie metabolizmu leków, czy deregulację procesów naprawy

uszkodzeń DNA oraz śmierci komórkowej [10]. W nowotworze opornym na cisplatynę zaobserwowano nadekspresję S-transferazy glutationowej (GST), która do cząsteczki leku przyłącza glutation (GSH). Utworzony w ten sposób mniej toksyczny kompleks cisplatyna-GSH opuszcza komórkę za pośrednictwem białek-transporterów z rodziny ABC. Transportery te, ulegają nadekspresji w wielu rodzajach nowotworów, a ich wysoka ekspresja jest jednym z czynników warunkujących oporność na chemioterapeutyki [11]. Zgodnie z danymi literaturowymi, induktorem ekspresji transporterów ABC może być stres komórkowy uwarunkowany np. stresem oksydacyjnym czy toksycznością zastosowanych leków [12]. Jednym z leków, z zastosowaniu którego w terapii wiąże się duże ryzyko rozwoju oporności nowotworu jest cisplatyna. Mimo, że w leczeniu nowotworów jest stosowana od roku 1978, wciąż jest ona przepisywana w leczeniu wielu typów nowotworów np. niedrobnokomórkowego raka płuca [13]. Jest ona czynnikiem alkilującym, którego działanie polega na tworzeniu adduktów z DNA co blokuje jego replikację [14]. W odpowiedzi na indukowane cisplatyną uszkodzenia DNA, dochodzi do aktywacji kinaz ATM (ang. ataxia telangiectasia mutated) i ATR (ang. Ataxia telangiectasia and Rad3 related), które fosforylują liczne białka efektorowe w tym p53, które pod wpływem uszkodzeń DNA indukowanych przez cząsteczki leku zatrzymują podziały komórek i zapoczątkowują procesy jej śmierci [15]. Co ciekawe, p53 zostało powiązane ze stymulacją ekspresji niektórych transporterów ABC, razem z acetylotranferazą EP300 [16].

W niniejszej pracy opisano dwa, nowe i wcześniej nieopisywane mechanizmy epigenetyczne zachodzące w komórkach nowotworowych. Pierwszy z nich dotyczy roli BRG1, EP300 oraz PARP1 w regulacji ekspresji genów związanych z proliferacją i naprawą uszkodzeń DNA w komórkach nowotworu piersi; podczas gdy drugi mechanizm opisuje zależność między aktywacją p53 i obecnością kompleksu CoREST w obrębie sekwencji promotorowych genów z rodziny ABC a ich ekspresją w dwóch typach nowotworów ludzkich – potrójnie ujemnym nowotworze piersi, oraz niedrobnokomórkowym raku płuc. Biorąc pod uwagę liczne badania kliniczne, gdzie stosuje się terapie skojarzone chemioterapeutyków i inhibitorów enzymów epigenetycznych, prezentowane w niniejszej pracy mechanizmy stanowią potencjalne punkty wyjścia dla nowych terapii przeciwnowotworowej.

Cel pracy

Celem powyższej pracy było wyłonienie enzymu lub enzymów epigenetycznych, które regulują ekspresję kluczowych dla inwazji i ochrony przed chemioterapią komórki nowotworowej procesów komórkowych takich jak proliferacja i naprawa uszkodzeń DNA, oraz zweryfikowanie ich roli w nabywaniu przez nowotwór oporności wielolekowej.

W ramach niniejszej pracy zrealizowano następujące cele szczegółowe:

1. Wyłonienie zestawów genów których odmienna ekspresja może stymulować proliferację i naprawę uszkodzeń DNA w komórce nowotworowej w oparciu o analizę transkryptomu (analiza danych RNA-seq) wybranych nowotworowych linii komórkowych w odniesieniu do komórek prawidłowych.
2. Wyłonienie modyfikacji reszt histonowych oraz motywów DNA charakterystycznych dla czynników transkrypcyjnych występujących w obrębie regionów promotorowych genów wybranych w etapie pierwszym w oparciu o analizę danych ChIP-Seq.
3. W oparciu o wyniki analizy przeprowadzonej na etapie drugim, wyjaśnienie mechanizmu regulacji ekspresji genów zaangażowanych w proliferację i naprawę DNA w komórkach nowotworowych przez BRG1 i acetylotransferazę EP300 w komórkach MCF7 i MDA-MB-231.
4. Weryfikacja hipotezy o udziale białka PARP1 w regulacji aktywności kompleksu BRG1-EP300 oraz transkrypcji BRG1-EP300-zależnych genów w komórkach linii MCF7 i MDA-MB-231.
5. Wyłonienie czynników transkrypcyjnych i innych białek zaangażowanych w regulowanie transkrypcji wiążących się w obrębie regionów promotorowych genów kodujących wybrane transportery z rodziny ABC w komórkach linii A549 w oparciu o analizę *in silico*.
6. Wyjaśnienie roli kompleksu CoREST oraz białka p53 w determinowaniu odpowiedzi sekwencji promotorowych wybranych genów ABC na działanie cisplatyny w komórkach linii A549 i MDA-MB-231.

Materiały i metody

Hodowla komórkowa oraz traktowanie inhibitorami

Podczas badań wykorzystano komercyjne nowotworowe linie komórkowe: dwie linie nowotworu piersi MCF7, MDA-MB-231, oraz linię nowotworu płuca A549. Linie MCF7 i A549 zakupione zostały z ATCC; natomiast MDA-MB-231 z Sigma-Aldrich. Komórki A549 i MCF7 hodowane były w pożywce DMEM z dodatkiem 10% FBS (surowica bydlęca), z dodatkiem antybiotyków penicylina-streptomycyna (kolejno 50 U/mL oraz 50 µg/mL) w atmosferze 5% CO₂. Komórki MDA-MB-231, zgodnie z zaleceniami producenta, na początkowym etapie komórki hodowano w medium L15 z dodatkiem 15% FBS, z dodatkiem antybiotyków penicylina-streptomycyna (kolejno 50 U/mL oraz 50 µg/mL) bez CO₂. Po pięciu pasażach, komórki przyzwyczajono do pożywki DMEM z dodatkiem 10% FBS, z dodatkiem antybiotyków penicylina-streptomycyna (kolejno 50 U/mL oraz 50 µg/mL) z 5% CO₂.

Przed traktowaniem inhibitorami komórki wysiewano na płytce i utrzymywano w fazie logarytmicznego wzrostu. Inhibitory podawano w następujących stężeniach: C646 5 µM oraz 10 µM (iEp300), PFI-3 10 µM (iSWI/SNF), PD0332991 1 µM (iCDK4/6), olaparib 1 µM (iPARP1), butyran sodu 250 µM (iHDAC1), SP2509 (iLSD1 0,1 µM), cisplatyna 10 µM.

Indukowanie oporności na cisplatynę

Komórki linii A549 i MDA-MB-231 hodowano w pożywce DMEM z dodatkiem 10%, z dodatkiem antybiotyków penicylina-streptomycyna (kolejno 50 U/mL oraz 50 µg/mL) z 5% CO₂ w butelkach hodowlanych o powierzchni 25 cm³. Przez pięć miesięcy, średnio co trzy tygodnie (w zależności od stanu komórek i ich zdolności proliferacyjnych) komórki były traktowane 10 µM cisplatyną. Dawka została dobrana w taki sposób by odpowiadać stężeniu, które utrzymuje się we krwi pacjenta podczas kuracji [17]. Następnie komórki inkubowano z lekiem przez 48 godzin. Po upływie czasu inkubacji, komórki przemywano PBS i zmieniano pożywkę hodowlaną na pożywkę bez dodatku cisplatyny.

Analizy *in silico*

Do analizy transkryptomów mającej na celu porównanie ekspresji pomiędzy komórkami nowotworowymi i prawidłowymi wybrano ogólnodostępne dane RNA-seq dla linii MCF7, MDA-MB-231, guza pierwotnego piersi oraz prawidłowych komórek piersi, które następnie pobrano z bazy NCBI GEO. Analizę przeprowadzono przy użyciu darmowego oprogramowania dostępnego na stronie internetowej The Galaxy Project. Pierwszym krokiem było wykorzystanie narzędzia FASTQ Groomer w celu ujednolicenia formatu wartości przypisywanym poszczególnym zsekwencjonowanym nukleotydów podczas sekwencjonowania. Następnie, dane zostały zmapowane do ludzkiego genomu referencyjnego hg19 przy użyciu programu TopHat. Składania transkryptów dokonano przy pomocy narzędzia Cufflinks ze wskazaniem referencji pobranej z UCSC Table Browser – UCSC Known Gene. Transkrypty zostały połączone w kompletny transkryptom z wykorzystaniem narzędzia Cuffmerge, a różnicowa ekspresja została obliczona przy pomocy programu Cuffdiff. Na potrzebę dalszej analizy, geny które ulegały nadekspresji w komórkach nowotworowych w porównaniu z komórkami prawidłowymi zostały pogrupowane względem biologicznych procesów, w które są one zaangażowane przy użyciu programu GOrilla.

Do analizy modyfikacji histonowych w obrębie regionów promotorowych wytypowanych w pierwszym etapie badań wykorzystano dane ChIP-seq dla linii komórkowej MDA-MB-231 zdeponowane w NCBI GEO, a do samej analizy ponownie użyto oprogramowania dostępnego na stronie internetowej The Galaxy Project. Po ujednoliceniu formatu danych przez program FASTQ Groomer, przeprowadzono mapowanie do genomu referencyjnego hg19 programem Bowtie. Peak-calling wykonano programem MACS. Otrzymane piki wizualizowano przy pomocy UCSC Genome Browser. Regiony promotorowe i wyspy CpG zlokalizowano przy pomocy tabel pobranych z UCSC Table Browser: regiony promotorowe - wgEncodeRegTfbsClusteredV3; wyspy CpG - cpgIslandExt. Do analizy motywów rozpoznawanych przez czynniki transkrypcyjne w obrębie regionów promotorowych wykorzystano oprogramowanie TomTom dostępne na stronie meme-suite.org. Program ten, porównuje sekwencję wprowadzoną jako „zapytanie”, z sekwencjami rozpoznawanymi przez znane czynniki transkrypcyjne zdeponowane np. w bazie JASPAR. TomTom zestawia analizowaną sekwencję z sekwencjami wzorcowymi w

postaci macierzy a następnie oblicza ich stopień dopasowania w postaci wartości P motywu. W celu obliczenia stopnia dopasowania sekwencji, algorytm wykorzystuje szereg funkcji i testów statystycznych takich jak: współczynnik korelacji Pearsona, test ilorazu wiarygodności, test χ^2 Pearsona, dokładny test Fishera, dywergencję Kullbacka-Leiblera, odległość euklidesową oraz funkcję podobieństwa Sandelina-Wassermana. Następnie program z wykorzystaniem poprawki Bonferroniego przelicza wartości P, na współczynnik określający oczekiwaną ilość dopasowań sekwencji badanej do sekwencji referencyjnej o podobnej lub większej wartości dopasowania, czyli wartość E [18]. Wyniki analizy prezentowane są w formie graficznej, która pozwala ocenić częstość występowania poszczególnych zasad azotowych w obrębie danego motywu, podczas gdy dołączona do grafiki wartość E świadczy o istotności statystycznej dopasowania.

W celu zweryfikowania czynników transkrypcyjnych oddziałujących z regionami ± 2 kpz od miejsca startu transkrypcji (TSS) wybranych genów kodujących transportery ABC (ABCC2, ABCC3, ABCC5, ABCC10, ABCG2) w komórkach linii A549 wykorzystano dane zdeponowane w UCSC Table Browser w ramach projektu ENCODE 3 TFBS. Przeanalizowano wszystkie czynniki transkrypcyjne zdeponowane w wyżej wspomnianym projekcie. Wyniki wyszukiwania przesłano na stronę The Galaxy Project, gdzie możliwa była wizualizacja wyników.

Analizy *in vitro*

Pełna lista odczynników oraz dokładny opis wykonywanych procedur znajdują się w publikacjach włączonych do niniejszej rozprawy doktorskiej.

Pierwszą serię eksperymentów poświęcono wyjaśnieniu mechanizmu regulacji ekspresji genów związanych z procesami proliferacji i naprawy uszkodzeń DNA w komórkach linii MCF7 i MDA-MB-231 przez BRG1 i EP300. Linie komórkowe dobrano tak by odpowiadały liniom, na których uzyskano dane analizowane w badaniach *in silico*. Badania rozpoczęto od potwierdzenia czy zachodzi fizyczna interakcja między wyżej wspomnianymi enzymami. W tym celu przeprowadzono immunoprecypitację białka BRG1 połączoną z detekcją przy pomocy techniki Western blot. Następnie

analizowano wpływ badanych enzymów na ekspresję genów, na promotorach których obecna była acetylacja i miejsce wiążące BRG1: *CDK2/4*, *PCNA*, *CCNB*, *CHEK2*, *BRCA1/2*, *XRCC1/2*, *LIG1*, *EXO1*, *NEIL3*. Ekspresję genów na poziomie mRNA i białka badano po zastosowaniu inhibitorów kompleksu SWI/SNF (PFI-3 10 μ M) i EP300 (C646 10 μ M), oraz specyficznego dla BRG1 siRNA. Po potraktowaniu komórek inhibitorami oraz siRNA komórki zebrano i wyizolowano mRNA, które następnie poddano reakcji odwrotnej transkrypcji i analizie ilościowej Real-time PCR; oraz lizaty białkowe analizowane przy pomocy Western blot. W celu porównania efektu inhibicji wybranych enzymów z efektem spowodowanym inhibicją CDK4/6 na ekspresję genów, które podlegają transkrypcyjnej regulacji przez BRG1-EP300. W tym celu potraktowano komórki MCF7 i MDA-MB-231 inhibitorem CDK4/6 (PD0332991 1 μ M), a następnie badano ekspresję genów na poziomie mRNA przy użyciu Real-time PCR; poziomy badanych białek przy użyciu techniki Western blot. Do zweryfikowania mechanizmu represji wybranych genów przy dłuższej ekspozycji na inhibitory komórki linii MCF7 potraktowano iCDK4/6, iSWI/SNF, iEP300 i inkubowano przez 48 godzin, a następnie przeprowadzono immunoprecypitację chromatyny z detekcją przy pomocy Real-time PCR. W celu zweryfikowania krótkoterminowej odpowiedzi kompleksu represora na inhibicję SWI/SNF i EP300, przeprowadzono 6-godzinną inkubację z inhibitorami, a następnie przeprowadzono immunoprecypitację chromatyny z oceną ilościową Real-time PCR [19].

Celem drugiego etapu prac eksperymentalnych było zweryfikowanie hipotezy o roli białka PARP1, jako regulatora aktywności kompleksu BRG1-EP300. W etapie tym zastosowano te same modele komórkowe co w etapie pierwszym dla zachowania spójności badań i wyników. Etap ten rozpoczęto od przeprowadzenia immunoprecypitacji białka PARP1 i wizualizacji jego fizycznych interakcji z podjednostkami kompleksu SWI/SNF przy pomocy Western blot. Następnie przy zastosowaniu inhibitora PARP (olaparib 1 μ M) i siRNA anty-PARP1 sprawdzono wpływ inhibicji PARP1 na ekspresję genów, których ekspresja zależna jest od aktywności BRG1-EP300. Po zakończonej inkubacji wyizolowano mRNA, przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji i analizowano ilościowo przy pomocy Real-time PCR; oraz przygotowano lizaty białkowe, które analizowano przy pomocy techniki Western blot. Efekt inhibicji PARP na acetylację reszt histonowych i obecność histonu H3 w pobliżu regionów promotorowych

genów *CDK4*, *NEIL3*, *LIG1* badano z wykorzystaniem ChIP/Real-time PCR. By wykluczyć, że obserwowana zależność jest wynikiem interakcji PARP1 i HDAC1, potraktowano komórki MCF7 i MDA-MB-231 iPARP, iHDAC (butyran sodu 250μM), iPARP/iHDAC (jednoczesne podanie inhibitorów), a ekspresję genów *CDK4*, *NEIL3*, *LIG1* badano przy pomocy Real-time PCR. Następnie wykorzystano immunoprecypitację białek by potwierdzić fizyczną interakcję EP300 i PARP oraz obecność reszt ADP-rybozy na białka BRG1 i EP300. By potwierdzić czy ADP-rybozylacja warunkuje aktywność BRG1, EP300 czy może obydwu enzymów, przeprowadzono eksperyment, po zastosowaniu iSWI/SNF, siBRG1 i iPARP mierzono poziom ekspresji genów, w obrębie promotorów których wykryto obecność PARP1 i BRG1, lecz nie EP300. W tym celu wykonano analizę Real-time PCR [20].

Celem trzeciego etapu badań było zademonstrowanie mechanizmu regulacji ekspresji genów kodujących transportery z rodziny ABC, których nadekspresja przyczynia się do rozwoju oporności nowotworu na leczenie chemioterapeutykami. W tym etapie zastosowano dwie linie komórkowe – MDA-MB-231, oraz A549. Każda z użytych linii występowała w dwóch wariantach: 1. Typu dzikiego; 2. Komórki z wyindukowaną opornością na cisplatynę. Modele komórkowe zostały dobrane tak by zademonstrować stałość mechanizmu w różnych typach nowotworów. MDA-MB-231 zastosowano celem utrzymania spójności badań z poprzednich etapów, podczas gdy linia niedrobnokomórkowego raka płuc - A549 została wytypowana ze względu na powszechność stosowania cisplatyny w terapii tego typu nowotworu. W pierwszym etapie porównano żywotność komórek nowotworowych linii A549 typu dzikiego oraz A549 opornych na cisplatynę, pod wpływem traktowania szeregiem stężeń cisplatyny (0; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50; 100 (μM)), doksorubicyny (0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1 (μM)) i paklitakselu (0; 0,0005; 0,001; 0,005; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 (μM)) przy pomocy testu żywotności komórek z wykorzystaniem metabolizacji resazuryny. Analiza wykazała, że w przypadku komórek nowotworowych, u których indukowano oporność na cisplatynę, zaobserwowano mniejszą śmiertelność a co za tym idzie większą tolerancję na podane leki w całym testowanym zakresie stężeń. Następnie, porównano poziomy ekspresji wybranych transporterów ABC w A549 typu dzikiego i w A549 opornych na cisplatynę. Interakcję CoREST oraz jego składowych – LSD1 i HDAC1 z regionami promotorowymi genów kodujących *ABCC3* i *ABCC10*

sprawdzono przy pomocy ChIP/Real-time PCR. Wpływ inhibitorów białek wchodzących w skład kompleksu CoREST - HDAC1 (butyran sodu 250 μ M), i LSD1 (SP2509 0,1 μ M) na ekspresję genów kodujących białka ABCC3 i ABCC10 w komórkach A549 opornych na cisplatynę zbadano przy pomocy Real-time PCR, natomiast poziom białek będących produktami tych genów przy pomocy techniki Western blot. W celu zweryfikowania funkcji EP300 jako regulatora ekspresji genów kodujących ABCC3 oraz ABCC10, zastosowano inhibicję EP300 (C646 5 μ M) w komórkach A549 typu dzikiego i opornego na cisplatynę. Następnie zbadano efekt inhibicji acetylotransferazy na poziomie mRNA i białka przy pomocy kolejno Real-time PCR i Western blot. Porównanie ilościowego oddziaływania EP300 z regionami promotorowymi ABCC3 i ABCC10 między A549 typu dzikiego i A549 opornych na cisplatynę przeprowadzono przy pomocy ChIP/Real-time PCR oraz mikroskopii konfokalnej. Odpowiedź genów ABCC3 i ABCC10 na pojedynczą dawkę cisplatyny (10 μ M) w komórkach A549 typu dzikiego zmierzono przy pomocy Real-time PCR i Western blot. By sprawdzić czy pojedyncza dawka cisplatyny przy jednoczesnej inhibicji składników kompleksu CoREST będzie w stanie stymulować ekspresję genu ABCC3, potraktowano komórki A549 typu dzikiego cisplatyną, cisplatyną/iHDAC, iEP300/iHDAC, cisplatyną/iEP300/iHDAC, a następnie wykonano analizy Real-time PCR i Western blot. Do oceny oddziaływania EP300 z regionem promotorowym ABCC10 po dostarczeniu jednorazowej dawki cisplatyny posłużyła technika ChIP/Real-time PCR. By porównać poziom interakcji białka p53 z regionem promotorowym genu ABCC10 między komórkami A549 typu dzikiego i A549 opornych na cisplatynę wykorzystano ChIP/Real-time PCR. Rolę p53 w stymulacji ekspresji genu ABCC10 w obydwu wariantach komórek A549 oceniano przy pomocy Real-time PCR i Western blot po uprzednim wyciszeniu ekspresji p53 przy pomocy siRNA anty-p53. Poziom interakcji p53 z promotorem ABCC10 po podaniu pojedynczej dawki cisplatyny mierzono metodą ChIP/Real-time PCR. Rolę p53 w procesie oddziaływania EP300 z chromatyną komórek A549 typu dzikiego i A549 opornych na cisplatynę pod wpływem pojedynczej ekspozycji na cisplatynę obrazowano przy pomocy mikroskopii konfokalnej. Wpływ p53 na ekspresję genów ABCC3 i ABCC10 badano poprzez wyciszenie ekspresji p53 przy pomocy siRNA anty-p53 a następnie mierzono na poziomie mRNA i białka przy pomocy kolejno Real-time PCR i Western blot. W celu sprawdzenia uniwersalności zaprezentowanego w komórkach A549 mechanizmu, część powyższych eksperymentów

przeprowadzono na linii komórkowej MDA-MB-231. Na początku zbadano interakcje CoREST z regionami promotorowymi genów kodujących transportery ABCC4 i ABCC10 w MDA-MB-231 typu dzikiego. Następnie, celem potwierdzenia, że CoREST jest odpowiedzialny za hamowanie ekspresji transportera ABCC4 w opornych na cisplatynę MDA-MB-231 potraktowano je iHDAC, iLSD. Ilościową analizę poziomu ekspresji ABCC4 na poziomie mRNA i białka zbadano kolejno przy pomocy Real-time PCR i Western blot. Efekt stymulacji MDA-MB-231 typu dzikiego przy pomocy jednorazowej dawki cisplatyny na ekspresję ABCC4 i ABCC10 mierzono metodami Real-time PCR (mRNA) i Western blot (białko). W następnym kroku potwierdzono rolę enzymu EP300 na ekspresję transportera ABCC10 w wariantcie MDA-MB-231 opornym na cisplatynę. W tym celu potraktowano komórki iEP300, cisplatyną, iEP300/cisplatyną. Wyniki mierzono przy pomocy Real-time PCR i Western blot. W ostatniej analizie, potwierdzono rolę p53, jako regulatora ekspresji ABCC4 i ABCC10 w obydwu badanych wariantach komórek MDA-MB-231. Ekspresję mierzono na poziomie mRNA (Real-time PCR), oraz białka (Western blot) [21].

Analizy statystyczne

Wszystkie wyniki zaprezentowane są jako wartości średnich $\pm$ SEM (Standardowy błąd średniej). Do policzenia różnic w średnich między dwiema grupami wykorzystywano test t-Studenta, lub test Manna-Whitneya, natomiast test analizy wariancji (ANOVA) lub test Kruskala-Wallisa, obydwa z odpowiednimi testami post-hoc posłużyły do porównywania różnic między kilkoma grupami. Do analizy normalności rozkładu badanych prób wykorzystano test Shappiro-Wilka. Za próg istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$.

Omówienie wyników

W pierwszym etapie prac zastosowano narzędzia bioinformatyczne w celu analizy porównawczej transkryptomu ludzkiej komórki nowotworu piersi w odniesieniu do ludzkiej komórki prawidłowej piersi. Po zakończonej analizie danych RNA-seq,

Wielkość poszczególnych liter reprezentujących zasady azotowe w pokazuje prawdopodobieństwo występowania w danej zasady azotowej w prezentowanym motywie. Wartość E obrazuje statystyczną istotność dopasowania sekwencji badanej z sekwencjami zdeponowanymi w referencyjnej bazie danych.

Analiza pokazała, że badane sekwencje w dużej mierze składają się z wysp CpG, co świadczy o tym, że faktycznie są to elementy potencjalnie regulujące ekspresję badanych genów. Niestety, z uwagi na duży odsetek powtórzeń par G-C wskazanie konkretnych czynników oddziałujących z tymi sekwencjami było niemożliwe. W związku z tym skupiono się na modyfikacjach reszt histonowych, a dokładnie na samych acetylacjach histonowych reszt lizyny. Enzymem, który znany jest z wprowadzania tego typu modyfikacji jest acetylotransferaza EP300. Z danych literaturowych wynika, że EP300 wraz z innymi białkami takimi jak BRG1 regulują ekspresję genów związanych z naprawą DNA, których promotory posiadają motywy dla czynników E2F i charakteryzują się obecnością wysp CpG [2]. W celu sprawdzenia wyżej wspomnianej zależności w komórkach nowotworu piersi, analizowano regiony promotorowe badanych genów pod kątem występowania wysp CpG, acetylacji H3K27ac, sekwencji rozpoznawanych przez czynniki E2F, oraz sekwencji rozpoznawanych przez BRG1. Zestawienie to pokazało, że znaczna większość genów związanych z naprawą DNA i proliferacją komórki nowotworowej posiada w obrębie swojej sekwencji promotorowej wszystkie cztery wyżej wymienione elementy. Powyższe przykłady sugerują, że za nadekspresję genów odpowiedzialnych za podziały mitotyczne, oraz odporność na uszkodzenia DNA komórek nowotworu piersi, mogą regulować acetylotransferaza EP300 i podjednostka kompleksu SWI/SNF – BRG1.

Następnie, postanowiono zweryfikować hipotezę o potencjalnej interakcji między BRG1 i EP300, oraz zbadać mechanizm ich oddziaływania na ekspresję wytypowanych genów. By potwierdzić zachodzenie w komórkach MCF7 i MDA-MB-231 interakcji między BRG1 i EP300, ale także HDAC1 opisywanych przez Pietrzak et al., wykonano immunoprecypitację BRG1 [2]. W badanym precypitacie wykryto obecność EP300, HDAC1, co jednoznacznie potwierdza hipotezę o ich fizycznej interakcji. Z kolei analiza ekspresji genów w obydwu badanych liniach komórkowych – MCF7 i MDA-MB-231, wykazała, że zastosowanie inhibitorów - C646 (EP300) oraz PFI-3 (SWI/SNF) obniżyło ekspresję: *CDK2/4*, *PCNA*, *CCNB*, *CHEK2*, *BRCA1/2*, *XRCC1/2*, *LIG1*, *EXO1*, *NEIL3*. W celu wykluczenia nieswoistości działania inhibitora BRG1, zastosowano także

wyciszenie BRG1 przy pomocy siRNA, co wpłynęło na ekspresję wyżej wspomnianych genów dokładnie w taki sam sposób jak inhibicja enzymu. Biorąc pod uwagę funkcje pełnione przez powyższe geny, gdzie *CDK2/4*, *PCNA*, *CCNB*, *CHEK2* zaangażowane są w kontrolę przebiegu cyklu komórkowego, natomiast produkty genów *BRCA1/2*, *XRCC1/2*, *LIG1*, *EXO1*, *NEIL3* są składowymi szlaków naprawy uszkodzeń DNA takich jak BER, NER, SSBR, MMR, i HR [22,23], to zahamowanie ekspresji tych genów pod wpływem obniżenia aktywności enzymatycznej badanych białek bezpośrednio wskazuje na zaangażowanie BRG1-EP300 w stymulację wzrostu guza, oraz odpowiedzi nowotworu na potencjalne czynniki uszkadzające DNA. Z drugiej strony, obniżenie ekspresji na poziomie mRNA jak i białka, enzymów zaangażowanych w progresję cyklu komórkowego takich jak CDK2 i CDK4 może prowadzić do jego zatrzymania. Jak opisywano w pracy doktorskiej dr Julity Pietrzak, zastosowanie inhibitorów zarówno EP300 jak i SWI/SNF doprowadziło do blokady cyklu komórkowego i zatrzymania podziałów komórek MCF7 i MDA-MB-231 w fazie G1 [24]. Zainicjowało to powstanie hipotezy zakładającej, że inhibicja BRG1-EP300 może zmniejszać ekspresję genów pośrednio poprzez zmniejszenie aktywności CDK4. By to sprawdzić przeprowadzono serię eksperymentów z wykorzystaniem inhibitora CDK4/6 - PD0332991. Co ciekawe, efekt inhibicji CDK4/6 na ekspresję genów zależnych od BRG1-EP300 oraz przebieg cyklu komórkowego, dokładnie odwzorowywał efekt, który niosła ze sobą inhibicja BRG1-EP300. Świadczy to, że wszystkie obserwowane pod wpływem zahamowania aktywności EP300 lub BRG1 są efektem zmniejszenia aktywności CDK4. Kolejne pytanie, które pojawiło się w związku z mechanizmem działania BRG1-EP300, jest związane z przyczyną osłabienia transkrypcji genów zależnych od BRG1-EP300. Po zainhibowaniu BRG1, EP300 oraz CDK4/6, na promotorach *CDK4*, *NEIL3*, *LIG1* zaobserwowano zwiększoną obecność białek RB1, HDAC1, oraz metylotransferazy EZH2, przy jednoczesnym oddysocjowaniu od promotora EP300 i redukcji poziomu acetylacji. Sugeruje to, że pod nieobecność na chromatynie BRG1 oraz EP300, na promotorach badanych genów dochodzi do wiązania kompleksu represora zawierającego RB1, HDAC1 i EZH2, który zapobiega ekspresji genów BRG1-EP300-zależnych.

Zademonstrowane powyżej zależności rysują podstawy mechanizmu, który wyjaśnia rolę odgrywaną przez BRG1-EP300 w rozwoju komórki nowotworowej. Istotnym jest, że prezentowany model zakłada dwojakość działania BRG1: po pierwsze BRG1 rozpoznaje acetylowane w komórce nowotworowej histony i katalizuje ich

wysunięcie rozluźniając w ten sposób chromatynę, co umożliwia interakcję z danym promotorem aparatury transkrypcyjnej; po drugie zapobiega wiązaniu kompleksu represora zawierającego białko RB1, HDAC1 oraz metylotransferazę EZH2, będącą składnikiem kompleksu polikomb 2 (PRC2), poprzez podtrzymanie podziałów mitotycznych komórek.

W drugim etapie prac zajęto się zagadnieniem związanym z regulacją aktywności kompleksu BRG1-EP300, a mianowicie jego interakcji z polimerazą poli(ADP-rybozy) 1 (PARP1). Podczas analizy danych CHIP-seq, odkryto, że w regionach promotorowych BRG1-EP300-zależnych genów takich jak: *NEIL3*, *LIG1*, *CDK4*, oprócz acetylacji histonowych

i związanego BRG1, można odnaleźć także białko PARP1. To doprowadziło do powstania hipotezy o interakcji kompleksu BRG1-EP300 z białkiem PARP1. By zweryfikować tę hipotezę, przeprowadzono immunoprecypitację białka PARP1. W immunoprecypitatach białka PARP1 wykryto obecność składowych kompleksu SWI/SNF takich jak: ARIDA1, SMARCC1, SMARCC2, BRG1 oraz acetylotransferazy EP300, co potwierdziło hipotezę o ich fizycznej interakcji. Z kolei wyciszenie białka PARP1 przy pomocy PARP1-specyficznego siRNA, oraz inhibicja przy pomocy inhibitora PARP – olaparibu, spowodowały spadek ekspresji genów BRG1-EP300-zależnych (z wyjątkiem genu *XRCC2*, w którego przypadku po zastosowaniu olaparibu i siRNA ekspresja genu wzrosła), który obserwowano wcześniej w następstwie inhibicji BRG1, EP300 lub CDK4 we wcześniejszym etapie badań. Zastosowanie w powyższym eksperymencie siRNA i olaparibu miało dwojaki charakter. Po pierwsze, z uwagi na to, że olaparib nie jest inhibitorem specyficznym tylko dla białka PARP1, a inhibuje także inne białka z tej rodziny, zastosowanie siRNA, potwierdziło, że obrazowany spadek ekspresji badanych genów zależy faktycznie od PARP1. Po drugie, zastosowanie olaparibu pokazało, że do regulacji ekspresji badanych genów nie jest jedynie wymagana obecność PARP1, ale także jego enzymatyczna aktywność ADP-rybozylazy. Zarówno w immunoprecypitatach BRG1 jak i immunoprecypitatach EP300, wykryto obecność reszt ADP-rybozy, co świadczy o tym, że obydwa enzymy nie tylko oddziałują fizycznie z PARP1, ale są przez niego ADP-rybozylowane. Funkcjonalny wpływ ADP-rybozylacji na zaprezentowany we wcześniejszej części pracy model, w którym BRG1 usuwa acetylowane przez EP300 histony w celu stymulacji ekspresji genów, potwierdzono poprzez zmierzenie poziomu acetylacji i obecności histonu 3 (H3) przy promotorach *CDK4*, *NEIL3*, *LIG1*

poprzedzone zahamowaniem aktywności białka PARP1. Po zatrzymaniu aktywności enzymatycznej PARP1 za pomocą olaparibu, zaobserwowano spadek poziomu acetylacji oraz akumulację H3 w stosunku do promotora *XRCC1*, który nie oddziałuje z PARP1. Świadczy to, że brak aktywności enzymatycznej PARP1 spowodował obniżenie aktywności EP300 – co tłumaczy spadek acetylacji promotorów *CDK4*, *NEIL3*, *LIG1*. Z kolei, zmniejszenie poziomu acetylacji reszt histonowych uniemożliwiło kompleksowi SWI/SNF rozpoznanie histonów i usunięcie ich, przez co chromatyna pozostała w nawiniętej na histony, mniej dostępnej transkrypcyjnie formie. Biorąc pod uwagę, że spadek acetylacji analizowanych promotorów mógł także wynikać z aktywności deacetylaz histonowych, np. HDAC1, której rola w represji genów pod nieobecność BRG1 i EP300 została opisana wcześniej, przeanalizowano wpływ inhibicji PARP1, HDAC, oraz jednoczesnej inhibicji obydwu tych enzymów na ekspresję genów *CDK4*, *NEIL3* oraz *LIG1*. Zastosowanie inhibitora deacetylazy histonowej nie zahamowało ich ekspresji, podczas gdy dodatek iPARP spowodował obniżenie ekspresji badanych genów (nie był widoczny także efekt kumulacyjny spowodowany jednoczesnym hamowaniem PARP1 i HDAC). Sugeruje to, że prezentowana zależność między regulacją ekspresji badanych genów a aktywności PARP1 nie dotyczy deacetylaz histonowych. Ostatnim pytaniem, które pozostawało bez odpowiedzi było, czy ADP-rybozylacja wpływa bezpośrednio na aktywność BRG1, EP300 czy może obydwu enzymów. By to sprawdzić wytypowano szereg genów, które na swoich promotorach mają motywy wiążące BRG1, PARP1, lecz nie EP300. Spośród testowanych genów, ekspresja *CDC8*, *RAD51AP*, *RPA1*, *RAD1*, *IL21R* wzrosła pod wpływem inhibicji BRG1 oraz wyciszenia BRG1, natomiast inhibicja PARP, nie wywołała żadnego efektu. Oznacza to, że w przypadku tej puli genów, ADP-rybozylacja nie wpływa na aktywność enzymatyczną BRG1. Podążając za tą myślą można przypuszczać, iż zmiany w aktywności BRG1-EP300 są podyktowane ADP-rybozylacją EP300, a nie BRG1.

Podsumowując ten etap badań, można bez wątplenia powiedzieć, że PARP1 wchodzi w fizyczną interakcję z BRG1-EP300. Co więcej, w przypadku genów *CDK4*, *NEIL3*, *LIG1* (zależnych od BRG1-EP300), PARP1 i jego aktywność enzymatyczna są niezbędne by EP300 acetylowało występujące w pobliżu ich promotorów reszty histonowe, co skutkuje rozpoznaniem acetylowanych histonów oraz ich usunięciem przez kompleks SWI/SNF.

Biorąc pod uwagę obecność BRG1 na promotorach genów takich jak *ABCC2*, *ABCC5* i *ABCC10*, której w przypadku dwóch ostatnich genów towarzyszył wysoki stopień acetylacji, dalsza część pracy poświęcona została regulowaniu transkrypcji genów z rodziny ABC przez wzgląd na udokumentowany udział przynajmniej części z nich w lekooporności komórek nowotworowych. Do analizy czynników transkrypcyjnych i białek wiążących się w obrębie sekwencji promotorowych rozciągających się od miejsca startu transkrypcji (TSS) do ± 2 kpz wybrano geny z rodziny ABCC takie jak *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC5*, *ABCC10* oraz *ABCG2* oraz linię niedrobnokomórkowego raka płuca, do leczenia którego stosowana jest powszechnie cisplatyna. W uzyskanej linii A549 odpornej na cisplatynę nadekspresji ulegały geny *ABCC1* oraz *ABCC10*, natomiast bez zmian pozostawały geny *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC5* i *ABCG2*. W sekwencji promotorowej genu *ABCC3*, który nie ulegał nadekspresji w naszym modelu odpornej na cisplatynę linii A549, wykryto obecność białek takich jak czynnik wyciszający RE 1 (REST), sparowane amfipatyczne białko helikarne Sin3A (Sin3A) i swoista dla lizyny demetylaza histonowa 1A (KMD1A/LSD1), będącymi składowymi represorowego kompleksu CoREST. Dla kontrastu, w przypadku *ABCC10*, który ulega nadekspresji, w analizowanym regionie chromatyny zaobserwowano jedynie oddziaływanie z podjednostką A polimerazy RNA II (POLR2A), lecz nie kompleksem CoREST. Biorąc pod uwagę powyższe zależności, postawiono pytanie, czy kompleks CoREST jest przyczyną braku nadekspresji *ABCC3* w zastosowanym modelu opornych na cisplatynę komórek linii A549. Jako, iż obecność CoREST, LSD1 oraz HDAC1 na promotorze *ABCC3* przy jej jednoczesnym braku na promotorze *ABCC10*, została potwierdzona na naszym modelu komórkowym, przeprowadzono analizę funkcjonalną mającą na celu ocenę wpływu LSD1 i HDAC1 na ekspresję badanych transporterów ABC. W opornych na cisplatynę komórkach A549 zastosowanie SP2509 (iLSD1) oraz butyranu sodu (iHDAC), spowodowało wzrost ekspresji *ABCC3*, lecz nie wpłynęło na już wysoki poziom ekspresji *ABCC10*. Pokazuje to, że zastosowanie inhibitorów kompleksu CoREST pozwoliło na aktywację promotora *ABCC3*, co z kolei powodowało wzrost jego transkrypcji. Brak odpowiedzi *ABCC10* na inhibicję CoREST jest w pełni uzasadniony tym, że obecności CoREST nie stwierdzono na promotorze *ABCC10*, dzięki czemu jego ekspresja w komórkach opornych na cisplatynę była na stałym i stosunkowo wysokim poziomie. Powyższe przykłady obrazują rolę CoREST w hamowaniu ekspresji niektórych genów ABC, podczas gdy ekspresja

innych ABC w miarę nabywania oporności na cisplatynę przez komórkę nowotworową wzrasta, czego przykładem jest analizowany transporter ABCC10. W związku z tym postawiono pytanie, jakie czynniki mogą być odpowiedzialne za wzrost ekspresji wyżej wymienionego białka. W świetle doniesień literaturowych jednym z białek aktywowanych przez uszkodzenia DNA indukowane cisplatyną jest p53, które zostało powiązane z regulacją aktywności promotora genu kodującego ABCB1 [25]. Postanowiono zatem zweryfikować wpływ p53 na ekspresję genu *ABCC10*, którego sekwencja promotorowa jest wolna od CoRESTu. W linii odpornej na cisplatynę nie zaobserwowano akumulacji p53 na promotorze genu *ABCC10*, a wyciszenie p53 nie wpłynęło na jego ekspresję. Z kolei po podaniu komórkom A549 typu dzikiego jednej dawki cisplatyny można było zaobserwować akumulację p53 na promotorze *ABCC10*. Wyniki te sugerują, że p53 bezpośrednio nie odpowiada za wysoki poziom ekspresji *ABCC10* w linii odpornej, to pod wpływem uszkodzeń DNA indukowanych cisplatyną akumuluje się na jego promotorze. Dlatego postanowiono zweryfikować hipotezę o potencjalnym udziale p53 w oddziaływaniu aktywatorów transkrypcji z sekwencją promotorową genu *ABCC10*. W literaturze można znaleźć informacje o współpracy p53 i EP300. Ito et al. zaproponował mechanizm, wedle którego w odpowiedzi na stres komórkowy EP300 acetyluje p53, co prowadzi do jego stabilizacji i akumulacji [26]. Dodatkowo, za współpracą tych enzymów przemawia także fakt, że p53 rekrutuje EP300 do promotorów p53-zależnych [27]. Postanowiono zatem sprawdzić czy ekspresja genu *ABCC10* jest zależna od EP300. Zastosowanie iEP300 - C646, zmniejszyło ekspresję *ABCC10* w obydwu wariantach komórek A549 – typu dzikiego i opornych na cisplatynę, podczas gdy ekspresja *ABCC3* pozostała bez zmian (ze względu na przebywający na jego promotorze CoREST). Istotnym jest, że efekt inhibicji EP300 był znacznie wyraźniejszy w wariantcie opornym na cisplatynę, co wiąże się bezpośrednio z wysoką bazową ekspresją tego genu. Z kolei, nadekspresja *ABCC10* w komórkach opornych na cisplatynę jest związana z dużo większą, stałą interakcją EP300 z promotorem *ABCC10*, jak i generalnie z chromatyną (w odniesieniu do komórek typu dzikiego), co zostało zbadane przy pomocy immunoprecypitacji chromatyny, oraz wybarwienia frakcji EP300 związanej z chromatyną i obrazowania z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Następnym krokiem było zatem potwierdzenie, czy wzmożona ekspresja *ABCC10* oraz *ABCC3* (przy zahamowaniu aktywności enzymów wchodzących w skład kompleksu CoREST), jest efektem działania cisplatyny. Pojedyncza dawka

cisplatyny (10 μ M) była w stanie pobudzić ekspresję *ABCC10* w komórkach typu dzikiego oraz spowodować akumulację EP300 na jego promotorze. Co więcej, pobudzający ekspresję *ABCC10* efekt cisplatyny był znoszony przez zatrzymanie aktywności enzymatycznej EP300 inhibitorem C646. Natomiast w przypadku *ABCC3*, pojedyncza dawka cisplatyny nie wpłynęła na jego ekspresję. Dopiero zahamowanie aktywności HDAC spowodowało wzrost poziomu *ABCC3* wywołany cisplatyną. Wiedząc, że pod wpływem uszkodzeń indukowanych cisplatyną, na promotorze *ABCC10* dochodzi do rekrutacji zarówno p53 jak i EP300, postanowiono sprawdzić czy akumulacja EP300 jest zależna od p53. Zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopu konfokalnego obrazowały proces zmian interakcji EP300 z chromatyną pod wpływem traktowania cisplatyną w zależności od poziomu p53. W komórkach typu dzikiego zaobserwowano znaczny wzrost interakcji EP300-DNA, co dalej potwierdza fakt, że cisplatyna jest induktorem relokacji EP300 na chromatynę. Co istotne, nowotwór oporny na cisplatynę, posiada stałą pulę EP300 konstytutywnie związanego z chromatyną, a akumulacja EP300 na chromatynie indukowana cisplatyną nie jest tak wyraźna jak w przypadku komórek typu dzikiego. Co istotne, wyciszenie p53, hamowało wiązanie EP300 z chromatyną, co jednoznacznie wskazuje, że p53 odgrywa główną rolę w opisywanym procesie. Kluczowym jest, że wyciszenie p53 hamowało wzrost ekspresji *ABCC10* indukowany pojedynczą dawką cisplatyny. Wskazuje to, że p53 nie reguluje bezpośrednio ekspresji *ABCC10*, ale jest on czynnikiem niezbędnym do rekrutacji EP300 do regionu promotorowego genu kodującego transporter *ABCC10*.

W celu sprawdzenia prawdziwości opisywanego mechanizmu także w innych typach nowotworów zastosowano drugi model komórkowy - linię potrójnie ujemnego nowotworu piersi MDA-MB-231. Do analizy wykorzystano gen *ABCC4* o analogicznym do *ABCC3* w komórkach A549 poziomie ekspresji - niskim zarówno w komórkach typu dzikiego jak i komórkach z indukowaną lekoopornością. W linii MDA-MB-231 promotor *ABCC4* charakteryzował się obecnością kompleksu CoREST, podczas gdy promotor *ABCC10* nie oddziaływał z tym kompleksem. Testy z wykorzystaniem inhibitorów HDAC i LSD1, wykazały, że w opornym na cisplatynę wariancie komórek MDA-MB-231 inhibicja LSD1 wzmocniła ekspresję *ABCC4*, podczas gdy żaden z inhibitorów nie wpłynął na wysoką w tym wariancie komórek, bazową ekspresję *ABCC10*. Podobnie jak w przypadku A549, pojedyncza dawka cisplatyny powodowała rekrutację EP300 do promotora *ABCC10* co odzwierciedla znaczny wzrost jego ekspresji w komórkach typu

dzikiego. W MDA-MB-231 opornych na cisplatynę obserwowano brak zmian w ekspresji ABCC10 w odpowiedzi na pojedynczą dawkę cisplatyny, podczas gdy zastosowanie inhibitora EP300 znacznie ją obniżało, a jednocześnie dodanie iEP300 łącznie z cisplatyną znosiło jej dodatni efekt, co odzwierciedla w pełni mechanizm obserwowany poprzednio w komórkach A549. Dalsze analizy potwierdziły zaangażowanie p53 w proces rekrutacji EP300 na chromatynę, gdyż komórki typu dzikiego z wyciszonym p53 nie odpowiadały wzrostem ekspresji ABCC10 na traktowanie cisplatyną. Z kolei w komórkach opornych na cisplatynę ekspresja ABCC10 nie zmieniała się niezależnie od wyciszenia p53.

W obydwu liniach komórkowych zaprezentowano nowy i wcześniej nieopisywany mechanizm powstawania lekooporności, bazując na regulacji ekspresji transporterów z rodziny ABC. W powyższym mechanizmie, po ekspozycji komórki nowotworowej na cisplatynę za pośrednictwem p53 dochodzi do rekrutacji acetylotransferazy EP300 do regionów promotorowych genu *ABCC10*, co wzmacnia jego ekspresję i stymuluje do powstania opornego na cisplatynę fenotypu komórki nowotworowej. Z drugiej strony, w przypadku transporterów nieulegających nadekspresji w komórkach opornych na cisplatynę (ABCC3 w komórkach A549 i ABCC4 w komórkach MDA-MB-231), ich promotory charakteryzują się obecnością kompleksu CoREST, który zapobiega przyłączeniu się EP300 i tym samym zapobiega wzrostowi ekspresji danego genu.

W niniejszej pracy, zaprezentowano dwa nowe, wcześniej nieopisywane w literaturze mechanizmy regulacji ekspresji genów w komórkach nowotworowych. Zwracają one uwagę na ważną rolę wybranych enzymów epigenetycznych w regulacji kluczowych dla komórki nowotworowej procesów biologicznych takich jak proliferacja, naprawa uszkodzeń DNA oraz rozwój oporności na chemioterapię. Wykazano, że acetylotransferaza EP300 wraz z BRG1 są zaangażowane w proces wzrostu guza oraz jego odporności na uszkodzenia DNA, a białko PARP1 poprzez ADP-rybozylację reguluje aktywność pierwszego z enzymów. W kontekście regulacji aktywności BRG1-EP300 przez białko PARP1, warto także rozważyć potencjalne zastosowanie inhibitorów PARP w terapii przeciwnowotworowej wycelowanej w szlaki sygnalizacyjne odpowiedzialne za proliferację, a także naprawę uszkodzeń DNA w nowotworze piersi. Co więcej, zademonstrowano, że kompleks CoREST jest kluczowym elementem regulacji ekspresji wybranych transporterów ABCC, których to ekspresję hamuje wiążąc się do ich sekwencji promotorowych. Z drugiej strony, w odpowiedzi na cisplatynę, wykazano istotną rolę szlaków prowadzących do aktywacji p53, który okazał się

niezbędny w procesie wiązania EP300 do sekwencji promotorowych genów nieulegających represji przez kompleks CoREST. Prezentowane zależności posiadają nie tylko wartość naukową, ale potencjalnie mogą być także wykorzystane w badaniach nad nowymi terapiami przeciwnowotworowymi.

Wnioski

Opierając się na wynikach otrzymanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Zależna od BRG1-EP300 regulacja ekspresji genów związanych z procesami proliferacji i naprawy DNA w badanych liniach nowotworu piersi przebiega bezpośrednio i pośrednio. Po pierwsze, BRG1-EP300 mogą bezpośrednio wiązać się do sekwencji promotorowych genów, gdzie EP300 acetyluje histonowe reszty lizyny, które następnie są rozpoznawane przez BRG1. Kompleks SWI/SNF usuwa acetylowane histony, a chromatyna nabiera dostępnej dla maszyneryi transkrypcyjnej konformacji. Mechanizm pośredni polega na regulacji ekspresji genów E2F-zależnych, poprzez oddziaływanie na tempo proliferacji komórek. Interakcja BRG1-EP300 jest odpowiedzialna za wysoki poziom transkrypcji genów zaangażowanych w podziały mitotyczne, które z kolei aktywują transkrypcję genów kontrolowanych przez czynniki z rodziny E2F.
2. Dodatkowym komponentem kompleksu BRG1-EP300 może być białko PARP1. ADP-rybozyluje ono BRG1 i EP300, przy czym w niniejszej pracy wykazano, że wyżej wspomniana modyfikacja potranslacyjna wpływa na zdolność EP300 do acetylowania reszt histonowych w sekwencjach promotorowych genów *LIG1*, *NEIL3*, *CDK4*.
3. Kompleks CoREST jest odpowiedzialny za hamowanie ekspresji transporterów z rodziny ABC w odpowiedzi na działanie cisplatyny w komórkach linii A549 i MDA-MB-231. Zatem zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej inhibitorów białek składowych tego kompleksu – HDAC/LSD1, może wiązać się ze stymulacją ekspresji transporterów z rodziny ABC.

Literatura

1. Cancer Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed on 6 April 2022).
2. Pietrzak, J.; Płoszaj, T.; Pułaski, Ł.; Robaszkiewicz, A. EP300-HDAC1-SWI/SNF Functional Unit Defines Transcription of Some DNA Repair Enzymes during Differentiation of Human Macrophages. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **2019**, *1862*, 198–208, doi:10.1016/j.bbagr.2018.10.019.
3. Hendricks, K.B.; Shanahan, F.; Lees, E. Role for BRG1 in Cell Cycle Control and Tumor Suppression. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 362, doi:10.1128/MCB.24.1.362-376.2004.
4. Wu, Q.; Lian, J.B.; Stein, J.L.; Stein, G.S.; Nickerson, J.A.; Imbalzano, A.N. The BRG1 ATPase of Human SWI/SNF Chromatin Remodeling Enzymes as a Driver of Cancer. *Epigenomics* **2017**, *9*, 919–931, doi:10.2217/epi-2017-0034.
5. Wu, Q.; Sharma, S.; Cui, H.; LeBlanc, S.E.; Zhang, H.; Muthuswami, R.; Nickerson, J.A.; Imbalzano, A.N. Targeting the Chromatin Remodeling Enzyme BRG1 Increases the Efficacy of Chemotherapy Drugs in Breast Cancer Cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 27158–27175, doi:10.18632/oncotarget.8384.
6. Ribeiro-Silva, C.; Aydin, Ö.Z.; Mesquita-Ribeiro, R.; Slyskova, J.; Helfricht, A.; Marteijs, J.A.; Hoeijmakers, J.H.J.; Lans, H.; Vermeulen, W. DNA Damage Sensitivity of SWI/SNF-Deficient Cells Depends on TFIIH Subunit P62/GTF2H1. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–14, doi:10.1038/s41467-018-06402-y.
7. Kwon, S.J.; Park, J.H.; Park, E.J.; Lee, S.A.; Lee, H.S.; Kang, S.W.; Kwon, J. ATM-Mediated Phosphorylation of the Chromatin Remodeling Enzyme BRG1 Modulates DNA Double-Strand Break Repair. *Oncogene* **2014**, *34*, 303–313, doi:10.1038/onc.2013.556.
8. Qi, W.; Chen, H.; Lu, C.; Bu, Q.; Wang, X.; Han, L. BRG1 Promotes Chromatin Remodeling around DNA Damage Sites. *Animal Cells Syst. (Seoul)*. **2018**, *22*, 360, doi:10.1080/19768354.2018.1525429.
9. Ring, A.; Kaur, P.; Lang, J.E. EP300 Knockdown Reduces Cancer Stem Cell Phenotype, Tumor Growth and Metastasis in Triple Negative Breast Cancer. *BMC Cancer* **2020**, *20*, 1–14, doi:10.1186/S12885-020-07573-Y/FIGURES/6.
10. Gillet, J.P.; Gottesman, M.M. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *596*, 47–76, doi:10.1007/978-1-60761-416-6_4.
11. Theile, D.; Wizgall, P. Acquired ABC-Transporter Overexpression in Cancer Cells: Transcriptional Induction or Darwinian Selection? *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2021**, *394*, 1621–1632, doi:10.1007/S00210-021-02112-3/FIGURES/3.
12. Miller, D.S. Regulation of ABC Transporters Blood–Brain Barrier: The Good, the Bad, and the Ugly. *Adv. Cancer Res.* **2015**, *125*, 43–70, doi:10.1016/BS.ACR.2014.10.002.

13. Fennell, D.A.; Summers, Y.; Cadranel, J.; Benepal, T.; Christoph, D.C.; Lal, R.; Das, M.; Maxwell, F.; Visseren-Grul, C.; Ferry, D. Cisplatin in the Modern Era: The Backbone of First-Line Chemotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Treat. Rev.* **2016**, *44*, 42–50, doi:10.1016/J.CTRV.2016.01.003.
14. Wishart, D.S.; Feunang, Y.D.; Guo, A.C.; Lo, E.J.; Marcu, A.; Grant, J.R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Sayeeda, Z.; et al. DrugBank 5.0: A Major Update to the DrugBank Database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D1074–D1082, doi:10.1093/nar/gkx1037.
15. O’Grady, S.; Finn, S.P.; Cuffe, S.; Richard, D.J.; O’Byrne, K.J.; Barr, M.P. The Role of DNA Repair Pathways in Cisplatin Resistant Lung Cancer. *Cancer Treat. Rev.* **2014**, *40*, 1161–1170, doi:10.1016/J.CTRV.2014.10.003.
16. Scotto, K.W. Transcriptional Regulation of ABC Drug Transporters. *Oncogene* **2003**, *22*, 7496–7511, doi:10.1038/sj.onc.1206950.
17. Charlier, C.; Kintz, P.; Dubois, N.; Plomteux, G. Fatal Overdosage with Cisplatin. *J. Anal. Toxicol.* **2004**, *28*, 138–140, doi:10.1093/JAT/28.2.138.
18. Gupta, S.; Stamatoyannopoulos, J.A.; Bailey, T.L.; Noble, W.S. Quantifying Similarity between Motifs. *Genome Biol.* **2007**, *8*, 1–9, doi:10.1186/GB-2007-8-2-R24/TABLES/3.
19. Sobczak, M.; Pietrzak, J.; Płoszaj, T.; Robaszkiewicz, A. BRG1 Activates Proliferation and Transcription of Cell Cycle-Dependent Genes in Breast Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12*, 349, doi:10.3390/cancers12020349.
20. Sobczak; Pitt; Spickett; Robaszkiewicz PARP1 Co-Regulates EP300–BRG1-Dependent Transcription of Genes Involved in Breast Cancer Cell Proliferation and DNA Repair. *Cancers (Basel)*. **2019**, *11*, 1539.
21. Sobczak, M.; Strachowska, M.; Gronkowska, K.; Robaszkiewicz, A. Activation of ABCC Genes by Cisplatin Depends on the CoREST Occurrence at Their Promoters in A549 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Cancers* **2022**, *Vol. 14*, Page 894 **2022**, *14*, 894, doi:10.3390/CANCERS14040894.
22. Chun, J.; Buechelmaier, E.S.; Powell, S.N. Rad51 Paralog Complexes BCDX2 and CX3 Act at Different Stages in the BRCA1-BRCA2-Dependent Homologous Recombination Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **2013**, *33*, 387–395, doi:10.1128/MCB.00465-12.
23. Christmann, M.; Kaina, B. Transcriptional Regulation of Human DNA Repair Genes Following Genotoxic Stress: Trigger Mechanisms, Inducible Responses and Genotoxic Adaptation. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 8403–8420, doi:10.1093/nar/gkt635.
24. Pietrzak, J. Oddziaływanie PARP1 z Chromatyną Jako Mechanizm Regulujący Nabywanie Tolerancji Na Bakteryjną Endotoksynę Przez Ludzkie Monocyty i Makrofagi, University of Lodz, 2021.
25. Bush, J.A.; Li, G. Cancer Chemoresistance: The Relationship between P53 and Multidrug Transporters. *Int. J. Cancer* **2002**, *98*, 323–330, doi:10.1002/IJC.10226.
26. Ito, A.; Lai, C.H.; Zhao, X.; Saito, S.; Hamilton, M.H.; Appella, E.; Yao, T.P.

P300/CBP-Mediated P53 Acetylation Is Commonly Induced by P53-Activating Agents and Inhibited by MDM2. *EMBO J.* **2001**, 20, 1331, doi:10.1093/EMBOJ/20.6.1331.

27. Kaypee, S.; Sahadevan, S.A.; Patil, S.; Ghosh, P.; Roy, N.S.; Roy, S.; Kundu, T.K. Mutant and Wild-Type Tumor Suppressor P53 Induces P300 Autoacetylation. *iScience* **2018**, 4, 260, doi:10.1016/J.ISCI.2018.06.002.

Streszczenie pracy doktorskiej w języku polskim

Tytuł pracy doktorskiej: **Epigenetyczne mechanizmy regulujące proliferację i oporność komórek nowotworowych na leczenie cytostatykami w badaniach *in vitro* oraz *in silico***

Mimo wielu lat badań nad biologią komórki nowotworowej, choroby nowotworowe wciąż pozostają nagłym problemem dla współczesnej medycyny. Światowa Organizacja Zdrowia podaje, że w 2020 roku na nowotwory zmarło około 10 milionów pacjentów, co podkreśla jak ważne jest opracowanie skutecznej terapii przeciwnowotworowej. Inwazyjność komórek nowotworowych determinowana jest zmianami na poziomie transkrypcji, które z kolei zależą od aktywności epigenetycznych enzymów regulujących dostępność chromatyny dla maszynery transkrypcyjnej. Do takich enzymów zalicza się między innymi BRG1 i EP300. Pierwszy z nich jako podjednostka kompleksu SWI/SNF, odpowiedzialny jest za rozpoznawanie modyfikacji reszt histonowych takich jak acetylacje. Modyfikacje te z kolei wprowadzane są przez enzymy z grupy acetylotransferaz, których przedstawicielem jest acetylotransferaza EP300. BRG1 reguluje proliferację komórek poprzez determinowanie ekspresji genów zależnych od czynników E2F m.in. cykliny A oraz cykliny E. Ponadto wraz z białkami z rodziny retinoblastoma i deacetylazą histonową warunkuje aktywność cykliny A i cykliny E przez co determinuje przejście z fazy cyklu komórkowego G1 do fazy S. Ważnym aspektem jest także wpływ BRG1 na proces naprawy DNA. Wchodzi on w interakcję miejscami pęknięć DNA, gdzie rozluźnia chromatynę co umożliwia przyłączenie się białek związanych z naprawą uszkodzeń DNA. Ponadto pod wpływem niektórych cytostatyków odnotowano wzmożone oddziaływanie BRG1 z sekwencjami promotorowymi niektórych genów kodujących transportery z rodziny ABC, a jego inhibicja prowadziła do uwrażliwienia komórek nowotworowych na chemioterapię.

Proces nabywania oporności wielolekowej jest procesem złożonym. W procesie tym może dochodzić do hamowania transportu dokomórkowego leku, jego detoksykacji, stymulowania procesów naprawy uszkodzeń DNA, które indukowane są przez chemioterapeutyki, a także promowanie usuwania cytostatyków z komórki. Ostatni mechanizm jest w znacznym stopniu powiązany z aktywnością transporterów z rodziny

ABC, które ulegają nadekspresji w komórkach lekoopornych. Jednym z powszechnie stosowanych w trakcie chemioterapii cytostatyków jest cisplatyna, która indukuje uszkodzenia DNA prowadzące do aktywacji białka p53 i tym samym wprowadza komórki nowotworowe na ścieżkę apoptozy. Jednakże w literaturze można odnaleźć informacje, że p53 może być zaangażowane w regulowanie ekspresji niektórych transporterów ABC.

Celem niniejszej pracy było wyłonienie enzymu lub grupy enzymów epigenetycznych regulujących ekspresję kluczowych dla promowania inwazyjnego charakteru i ochrony przed uszkodzeniami DNA indukowanymi chemioterapią procesów komórkowych takich jak proliferacja, naprawa uszkodzeń, a także określenie ich roli w nabywaniu przez nowotwór oporności wielolekowej.

W pierwszym etapie badań porównywano transkryptom komórek nowotworowych linii przedinwazyjnego nowotworu piersi, MCF7 i MDA-MB-231 z transkryptomem prawidłowych komórek piersi. Analiza danych RNA-seq pozwoliła wyłonić szereg genów związanych z procesami proliferacji i naprawy uszkodzeń DNA, które ulegają nadekspresji w komórkach nowotworowych w odniesieniu do komórki prawidłowej. Następnie analizowano dane ChIP-seq, pod kątem modyfikacji reszt histonowych występujących w pobliżu regionów promotorowych genów wyłonionych w analizie danych RNA-seq. Analizy wykazały, że w pobliżu promotora badanych genów obecna jest acetylacja histonowych reszt lizyny, a same promotory zawierają wyspy CpG, jak i sekwencje rozpoznawane przez czynniki transkrypcyjne E2F. Ponieważ acetylotransferaza EP300 i członek kompleksu SWI/SNF – BRG1 zostały opisane w literaturze jako enzymy oddziałujące z promotorami genów związanych z naprawą DNA, które charakteryzowały się obecnością acetylacji, wysp CpG i miejscami wiązania czynników E2F w makrofagach ludzkich, postanowiono sprawdzić czy tożsama zależność ma miejsce także w komórkach nowotworu piersi. W serii eksperymentów wykazano, że BRG1 i EP300 wchodzi w fizyczną interakcję oraz regulują ekspresję genów związanych z proliferacją i naprawą uszkodzeń DNA w komórkach nowotworu piersi. Ponadto wykazano, że enzymy nasilają transkrypcję genów E2F-zależnych za pośrednictwem CDK4, a brak ich aktywności był związany z zatrzymaniem komórki w fazie G1 cyklu komórkowego i formacją kompleksu represora na promotorach trzech zależnych od BRG1-EP300 genów związanych funkcjonalnie z naprawą DNA.

W drugiej części pracy weryfikowano hipotezę o udziale białka PARP1 w regulacji aktywności BRG1-EP300 w komórkach nowotworu piersi. Analizy wykazały, że PARP1 występuje w części promotorów charakteryzujących się obecnością BRG1, wchodzi w fizyczną interakcję z BRG1-EP300, a inhibicja enzymatycznej aktywności PARP1 prowadzi do zahamowania ekspresji genów BRG1-EP300-zależnych. Ponadto wykazano, że ADP-rybozylacja katalizowana przez białko PARP1 determinuje aktywność enzymatyczną EP300 i transkrypcję części genów, dla których EP300 działa jako aktywator.

Stwierdzona obecność BRG1 i acetylacji w regionach genów takich jak *ABCC5* i *ABCC10* zwróciła uwagę na rolę modulowalnej ekspresji transporterów ABC przez komórki nowotworowe w odpowiedzi na chemioterapeutyki, stąd ostatnia część pracy poświęcona została określeniu transkrypcyjnej kontroli genów z rodziny ABC, które predysponują komórkę nowotworową do przeżycia w obecności leków. Jako model do badań wybrano linię niedrobnokomórkowego raka płuca oporną na cisplatynę, która jest często stosowanym lekiem w przypadku tego rodzaju nowotworu. Wedle prezentowanego mechanizmu, pod wpływem uszkodzeń DNA indukowanych cisplatyną wzrasta interakcja p53 z DNA, która pośredniczy w rekrutacji EP300 do regionów promotorowych genu kodującego między innymi transporter *ABCC10*, co powoduje wzrost jego ekspresji. Promotory transporterów *ABCC3* i *ABCC4*, których nadekspresji nie obserwowano w linii odpornej na cisplatynę, charakteryzują się obecnością kompleksu CoREST co zapobiega wzrostowi transkrypcji genów *ABCC3* i *ABCC4* w odpowiedzi na cisplatynę a jego represyjny wpływ może być zahamowany przy pomocy inhibitorów LSD1 i HDAC.

W pracy opisano dwa nowe mechanizmy epigenetyczne, które regulują procesy proliferacji, naprawy uszkodzeń DNA i rozwoju oporności wielolekowej na cisplatynę w komórkach nowotworowych. Pierwszy mechanizm zakłada kluczowość kompleksu składającego się z BRG1, EP300 oraz białka PARP1 dla kontrolowania transkrypcji genów zaangażowanych w proliferację i naprawę uszkodzeń DNA w komórkach nowotworu piersi. Wykazano funkcjonalną zależność pomiędzy wymienionymi trzema enzymami, gdzie zahamowanie aktywności któregośkolwiek z nich prowadziło do znacznego spadku ekspresji kontrolowanych przez ten kompleks genów. Z kolei drugi mechanizm zakłada, że p53 oraz CoREST są bezpośrednio zaangażowane w regulację transkrypcji genów związanych z procesem usuwania z komórek nowotworowych

chemioterapeutów. Na powyższych przykładach zaprezentowano, że opisywane mechanizmy stanowią nie tylko cenne odkrycie naukowe, ale także mogą znaleźć zastosowanie w projektowaniu przyszłych terapii przeciwnowotworowych.

Streszczenie pracy doktorskiej w języku angielskim

Title of the thesis: **Epigenetic mechanisms regulating the proliferation and resistance of cancer cells to treatment with cytostatic drugs in in vitro and in silico studies**

In spite of many years of intensive research on malignancy, the treatment of cancer remains a challenge for modern medicine. According to the World Health Organization approximately 10 million of patients died for cancer in 2020. It highlights the urgent need of implementation of efficient anti-cancer therapy. Invasive character of cancer cells is conferred by inter alia alteration in their transcriptom, which in turn, depends on the activity of epigenetic enzymes that are involved regulation of chromatin accessibility. Such enzymes include, for example, BRG1 and EP300. The first enzyme, as an active component of SWI/SNF complex, is responsible for recognition of histone lysine residue modifications. These include acetylation, which is inserted by enzymes belonging to the acetyltransferase family that is represented by EP300. BRG1 has been shown to determine cell proliferation by regulating expression of E2F-dependent genes such as cyclin A or cyclin E, as well their activity in cooperation with RB-family proteins and histone deacetylase. Furthermore, BRG1 is involved in DNA damage repair process since it interacts with DNA damage sites and unwinds the chromatin, thereby allowing for DNA damage repair machinery to bind. Notably, BRG1 was found to accumulate on the promoters of genes encoding ABC-family transporters, and its inhibition led to chemosensitization of cancer cells. The active drug efflux underlies, at

least to certain extent, the phenomenon of cisplatin-resistance during anticancer therapies. acquisition is a complex matter. This platinum-containing drug is one of the most commonly prescribed compound for the treatment of various malignancies, which acts as a DNA-damage inducer. The damage leads to activation of the p53 protein, that in turn is expected to predispose cancer cells to the apoptotic pathway. However, available bibliographic data indicates the involvement of p53 in transcriptional upregulation of some ABC genes, including ABCB1.

The aim of this thesis was to identify an enzyme or group of epigenetic enzymes capable of determining expression of genes that promote cancer cell phenotype and protection from chemotherapy-induced DNA damage processes. These include cancer cell proliferation, DNA damage repair and acquisition of multidrug-resistance.

In the first stage of studies, the transcriptomes of ductal carcinoma in situ, MCF7, MDA-MB-231 were compared to the transcriptome of non-cancerogenic breast cells. RNA-seq data analysis resulted in identification of subset of genes that are overexpressed in cancer as well as related to proliferation and DNA damage repair. Next, ChIP-Seq-based analysis of acetylation status, CpG status and E2F motif occurrence at the promoters of genes selected at previous step, disclosed the considerable overlap among all considered features. Bearing in mind that the EP300 and a member of SWI/SNF complex – BRG1 were previously described as enzymes interacting with promoters of genes involved in DNA damage repair that were characterized by histone acetylation, presence of E2F binding motives and CpG islands in human macrophages, we decided to check whether similar dependence occurs in breast cancer cells. In the series of in vitro experiments the physical interaction between BRG1 and EP300, as well as their involvement in regulation of genes related to cell proliferation and DNA damage repair pathways in breast cancer had been confirmed. Moreover, it was proposed that both enzymes enhance transcription of E2F-dependent genes via facilitation expression of CDK4. On the other hand, the lack of their activity resulted in G1 arrest and formation of repressor complex at the promoters of genes functionally involved in DNA damage repair and enriched in BRG1-EP300 complexes.

In the second stage, the hypothesis of PARP1 contribution to BRG1-EP300 regulation of gene transcription in breast cancer was tested. Analyses showed that PARP1 interacts with a subset of promoters recognized by BRG1. Importantly, as it engages in physical interaction with BRG1-EP300, PARP1 inhibition led to repression of BRG1-

EP300-dependent genes. Moreover, PARP1-mediated ADP-rybosylation determined enzymatic activity of EP300 as well as transcription activated by EP300.

Considering the occurrence of BRG1 and histone acetylation at the *ABCC5* and *ABCC10* gene promoters, the last part of the thesis have been dedicated to search for transcriptional control of genes encoding ABC transporters, that predispose cancer cell to survive under genotoxic stress such as chemotherapy. The cisplatin-resistant phenotype of non-small cell lung cancer cell line was chosen for experiments, as cisplatin is commonly prescribed for the treatment of aforementioned cancer type. According to the described mechanism, cisplatin-induced DNA damage allow p53 to enrich on the DNA. Moreover, p53 mediates EP300 recruitment to the promoter of *ABCC10*, which is transcriptionally controlled in EP300 in cisplatin-resistant cells. Promoters of *ABCC3* and *ABCC4* transporters are characterized by presence of CoREST complex, which restricts expression of *ABCC3* and *ABCC4* genes in response to cisplatin. The transcriptional repression may be reversed by HDAC and LSD1 inhibitors.

The submitted thesis describes two new epigenetic mechanisms, which oversee cellular processes such as proliferation, DNA damage repair, and cisplatin resistance acquisition in cancer cells have been described. The first mechanism describes importance of a complex composed of BRG1, EP300 and PARP1 for transcriptional control of genes involved in cell proliferation and DNA damage response in breast cancer cells. The functional interdependence between all-three abovementioned enzymes was shown, while inhibition of either of them considerably repressed expression of genes controlled by BRG1-EP300-PARP1. The latter mechanism presents the contribution of p53 and CoREST in transcriptional control of genes functionally linked to the efflux of chemotherapeutics. The above-described molecular circuits present a valuable scientific discovery, but might have also potential to improve future anti-cancer therapies.

Kopie publikacji włączonych do rozprawy doktorskiej

Article

PARP1 Co-Regulates EP300–BRG1-Dependent Transcription of Genes Involved in Breast Cancer Cell Proliferation and DNA Repair

Maciej Sobczak ¹, Andrew R. Pitt ², Corinne M. Spickett ² and Agnieszka Robaszkiewicz ^{1,*} 

¹ Department of General Biophysics, Institute of Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland; maciej.sobczak@unilodz.eu

² School of Life & Health Sciences, Aston University, Aston Triangle, Birmingham B4 7ET, UK; a.r.pitt@aston.ac.uk (A.R.P.); c.m.spickett@aston.ac.uk (C.M.S.)

* Correspondence: agnieszka.robaszkiewicz@biol.uni.lodz.pl; Tel.: +48-42-635-4449; Fax: +48-42-635-4449 or +48-42-635-4473

Received: 17 August 2019; Accepted: 5 October 2019; Published: 11 October 2019



Abstract: BRG1, an active subunit of the SWI/SNF chromatin-remodeling complex, enables the EP300-dependent transcription of proliferation and DNA repair genes from their E2F/CpG-driven promoters in breast cancer cells. In the current study, we show that BRG1–EP300 complexes are accompanied by poly-ADP-ribose polymerase 1 (PARP1), which emerges as the functional component of the promoter-bound multiprotein units that are capable of controlling gene expression. This enzyme is co-distributed with BRG1 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. ADP-ribosylation is necessary to maintain active transcription, since it ensures an open chromatin structure that allows high acetylation and low histone density. PARP1-mediated modification of BRG1 and EP300 does not affect the association of enzymes with gene promoters; however, it does activate EP300, which acetylates nucleosomes, leading to their eviction by BRG1, thus allowing mRNA synthesis. Although PARP1 was found at BRG1 positive/H3K27ac negative promoters of highly expressed genes in a transformed breast cancer cell line, its transcriptional activity was limited to genes simultaneously controlled by BRG1 and EP300, indicating that the ADP-ribosylation of EP300 plays a dominant role in the regulation of BRG1–EP300-driven transcription. In conclusion, PARP1 directs the transcription of some proliferation and DNA repair genes in breast cancer cells by the ADP-ribosylation of EP300, thereby causing its activation and marking nucleosomes for displacement by BRG1. PARP1 in rapidly dividing cells facilitates the expression of genes that confer a cancer cell phenotype. Our study shows a new mechanism that links PARP1 with the removal of DNA damage in breast cancer cells via the regulation of BRG1–EP300-dependent transcription of genes involved in DNA repair pathways.

Keywords: poly-ADP-ribose polymerase 1 (PARP1); brahma-related gene 1 (BRG1); histone acetyltransferase p300 (EP300); gene transcription; cancer cell

1. Introduction

The pharmacological effects of inhibitors of poly-ADP-ribose polymerases (PARPs) in anticancer therapies are attributed to impairing DNA damage removal, since PARP1 plays a crucial role in the recruitment of repair machinery, mainly in an ADP-ribosylation-dependent manner [1,2]. Lesion recognition followed by the recruitment of poly-ADP-ribose polymerase 1 (PARP1) to sites of DNA damage and ADP-ribosylation of its automodification domain are prerequisites for the binding of XRCC1, POLB, LIG3, or ALC1, which are involved in base excision repair (BER), single-strand break repair (SSBR), and nucleotide excision repair (NER) [3,4]. However, PARP1 also facilitates

alternative and conventional non-homologous end-joining (NHEJ) as well as homologous recombination (HR), therefore helping to protect genome integrity and preventing destabilization of the genome resulting from double-strand breaks [5–7]. According to the “access–repair–restore” model, nucleic acid repair is preceded by chromatin reorganization, since DNA lesions are curtailed by DNA-associated proteins [8]. Thus, local chromatin rearrangements are required to allow the assembly of the multiprotein machinery that removes lesions. Recent findings identified a link between PARP1 activity, nucleosome density, and the efficiency of some repair pathways, including HR [9]. In the study referred to, auto-ADP-ribosylated PARP1 serves as an indispensable anchor that provides a platform at the damage site for the functional interaction between the nucleosome-evicting brahma-related gene 1 (BRG1; the SWI/SNF chromatin-remodeling enzyme) and the NAD-dependent deacetylase sirtuin-1 (SIRT1), which activates BRG1 by erasing lysine acetylation, thus promoting DNA end-joining. BRG1 interacts with the poly-ADP-ribose polymer through its ATPase domain rather than the N- or C-terminal tails, and is recruited to genomic regions enriched in PARP1. A previous paper reported the interaction of BRG1 with PARP1 and other histone-remodeling enzymes at the genomic level, where nucleosome-evicting ATPase cooperated with PARP1 and histone deacetylases (HDACs: HDAC2 and HDAC9) at the promoters of α -MHC and β -MHC, thereby preventing cardiac differentiation and maintaining the proliferation potential of the precursors [10]. However, the molecular mechanism that drives PARP1/BRG1-dependent up- or down-regulation of gene transcription has not yet been identified. The suggestion that PARP1 enables the binding of EP300 to the promoters of cell cycle-dependent genes in proliferating cells in an ADP-ribosylation-independent manner focused our attention on the possible role of PAR-synthesizing enzymes in the transcriptional regulation of genes controlled by BRG–EP300–HDAC1 complexes [11]. Our recent discoveries regarding the above-mentioned chromatin-remodeling units showed that these enzymes control the transcription of proliferation and DNA repair genes in two considerably different breast cancer cell lines, MCF7 and MDA-MB-231, which differ in terms of their expressed hormone and HER2 receptors [12]. The nucleosomes of E2F/CpG-driven promoters in the two studied gene groups were acetylated by histone acetyltransferase p300 (EP300), causing them to be marked for BRG1-mediated eviction, and enabling paused RNA polymerase II to become active, leading to active gene transcription. This mechanism operates only in proliferating cells, which are also characterized by a high abundance of PARP1. This is because the *PARP1* promoter is controlled by BRG1–EP300–HDAC1 complexes and is repressed with respect to the growth arrest seen in the great majority of normal primary cells [11].

Based on these premises, we aimed to discover whether PARP1 co-regulates BRG1–EP300-dependent transcription, and if PARP1 can be considered an active component of such multiprotein complexes in the studied breast cancer cell lines. We also aimed to uncover the molecular mechanism that links PARP1 with BRG1-dependent transcription and verify possible PARP1 selectivity toward functionally related genes.

2. Results

2.1. PARP1 Physically Interacts with SWI/SNF in Breast Cancer Cells

Data from three biological replicates run in duplicate for the PARP immunoprecipitates (IP) and two biological replicates in duplicate for the control IP were analyzed. A total of 76 interacting proteins were identified that fulfilled the selection criteria (confidence scores >50, fold change >2 and *p*-values < 0.05; the full list of PARP1-interacting proteins and associated data are shown in Table S1). Since PARP1 has been previously identified as a cofactor of the transcriptional machinery that cooperates with histone-remodeling enzymes and transcription factors [13–16], we focused on the identification of proteins that physically interacted with PARP1 within the cell nucleus, and initially assessed the interaction data for new, previously unidentified chromatin-associated proteins that could be involved in the regulation of gene expression in a PARP1-dependent fashion. The analysis of PARP1 co-immunoprecipitated proteins by mass spectrometry identified DNA-bound subunits of RNA

polymerase and mediator complexes, as well as subunits of chromatin-remodeling complexes, such as Tip60, p400 (EP400), and SWI/SNF (ARID1A, SMARCC1, BRG1; Table S1), which were significantly overrepresented in PARP1 versus IgG pull-downs. Interestingly, brahma (BRM), the other ATPase subunit in SWI/SNF, was not detected among the significant number of interacting proteins identified in PARP1 immunoprecipitates in any of three biological replicates from peptide identification in Mascot. This finding may suggest that PARP1 cooperates only with BRG1-based SWI/SNF complexes. However, to conclude on PARP1–BRM physical and functional interaction, further examination is needed.

Among other histone writers, erasers, and readers, we also found HDAC1, which was recently reported by us to be a constitutive component the BRG1–EP300–HDAC1 complex and assembles at the cell cycle-driven gene promoters of, for example, DNA repair genes in human macrophages and breast cancer cells [11,12]. To verify that formaldehyde fixation of the nuclei did not lead to false positive readouts with mass spectrometry and whether PARP1 is a bona fide member of the SWI/SNF complexes, PARP1 was immunoprecipitated from intact cells, and pull-downs were tested using Western blotting for the presence of SWI/SNF components previously detected by mass spectrometry in fixed nuclei. Western blotting of PARP1 co-immunoprecipitated proteins confirmed the direct interaction of PARP1 with ARID1A and BRG1, but also with other subunits of SWI/SNF, such as SMARCC1 and SMARCC2, in the studied breast cancer cell lines (Figure 1B). Similarly, PARP1 was detected in BRG1 pull-downs (Figure 1C).

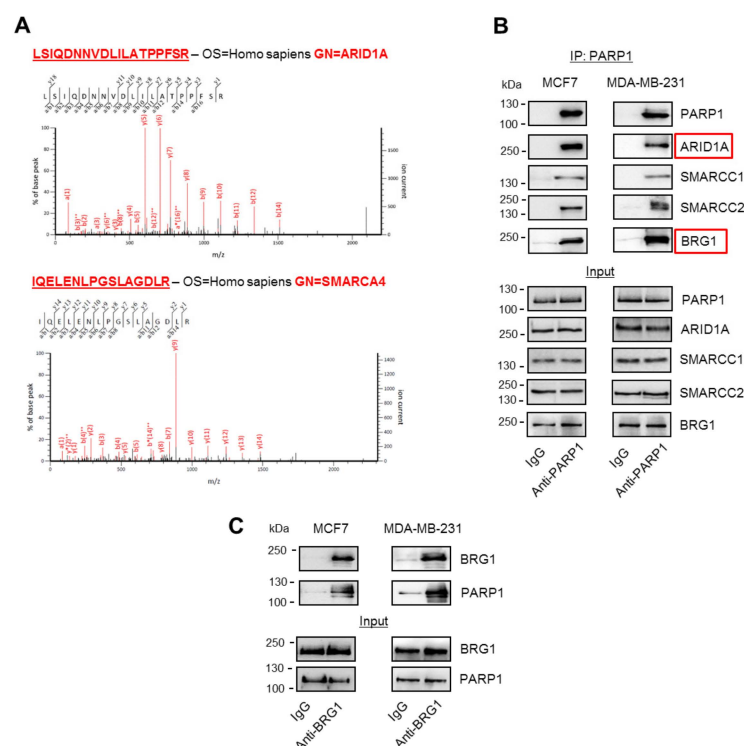


Figure 1. Poly-ADP-ribose polymerase 1 (PARP1) physically interacts with the brahma-related gene 1 (BRG1)-based SWI/SNF chromatin-remodeling complex. (A) Exemplar mass spectrometry (MSMS; representative peptides from three biological replicates visualized in Mascot) data for the identification of ARID1 and SMARCA4 as PARP1 interactors using PARP1 immunoenrichment. (B) PARP1 interaction with ARID1A, SMARCC1, SMARCC2, and SMARCA4/BRG1 was confirmed by PARP1 pull-down and protein detection by Western blotting in cell lysates of two breast cancer cell lines, MCF7 and MDA-MB-231. IgG served as an isotypic control. (C) PARP1 was also identified in BRG1 immunoprecipitates. Western blotting images show representative images of three biological, fully reproducible replicates.

2.2. PARP1 Is Co-Distributed with BRG1 at the Actively Transcribed Gene Promoters

To confirm the possible role of PARP1 in the regulation of SWI/SNF-dependent transcription, we first tested whether PARP1 occurrence in the genome of breast cancer cells was accompanied by BRG1. The residual signal from PARP1 and BRG1 is randomly distributed across genomes, and may reflect the antibody specificity (or lack thereof) or experimental challenges rather than (or in addition to) true protein occurrence. However, the local enrichment of these proteins can be observed, and PARP1 and BRG1-rich regions can be identified by Model-based Analysis of ChIP-Seq data (MACS). As described in the Methods section, for these proteins, we set a *p*-value cutoff for peak detection at 10^{-3} with three levels of regions around the peak region (1, 5, and 10 kbp) assessed.

BRG1 was distributed and perfectly centered on genomic regions enriched in PARP1 (Figure 2A). BRG1/PARP1 peaks appeared predominantly at the gene regulatory regions, i.e., at the promoters and enhancers (Figure 2B; definitions of terms are given in Section 4.9), where BRG1 showed a relatively strong correlation with histone modifications, which marked open chromatin and transcriptionally active regions (Figure 2C). Focusing only at the E2F/CpG-driven gene promoters (Table S2), most of the PARP1 peaks (80.2%) were localized at the BRG1/H3K27ac-featured regions adjacent (± 2 kbp) to the transcription start site (Figure 2D). This agrees with our and others' reports, where BRG1 has been documented to be associated with promoters of actively transcribed genes, characterized by histone marks, which are permissive for transcription, and the presence of CpG and E2F binding motifs. Our previous findings ascribed BRG1 as a master regulator of some H3K27ac positive promoters, which is essential for the initiation of mRNA synthesis [11,12].

PARP1/BRG1/H3K27ac-positive promoters represent genes that are functionally assigned to numerous processes that are crucial for the maintenance of intracellular homeostasis (Figure 2E; Table S3). To further investigate the molecular mechanisms that underlie the possible functional cross-talk between PARP1 and the BRG1-based SWI/SNF complex, we chose genes attributed to two groups, namely, DNA repair and positive regulation of the cell cycle. These groups were chosen because we recently selected them for an in-depth examination and explained a mutual interdependence between gene expression, BRG1 activity, promoter features, and cell proliferation status [12]. Most genes in the considered groups were over-expressed in at least one of the two fast-proliferating breast cancer cell lines when compared to normal cells derived from primary breast tissue (Figure 2F and Table S4). Particular attention was paid to three of our previously studied genes, *cyclin dependent kinase 4* (CDK4), *DNA ligase 1* (LIG1), and *nei like DNA glycosylase 3* (NEIL3). The transcription of these genes was driven by E2F/CpG/H3K27ac-positive promoters, which were found to be enriched in PARP1 in addition to BRG1 (Figure 2G). The molecular mechanism driving the transcription in MCF7 and MDA-MB-231 cells involved cooperation between EP300, which acetylated histones at the studied gene promoters, and BRG1, which evicted marked nucleosomes in proliferating cells [11,12].

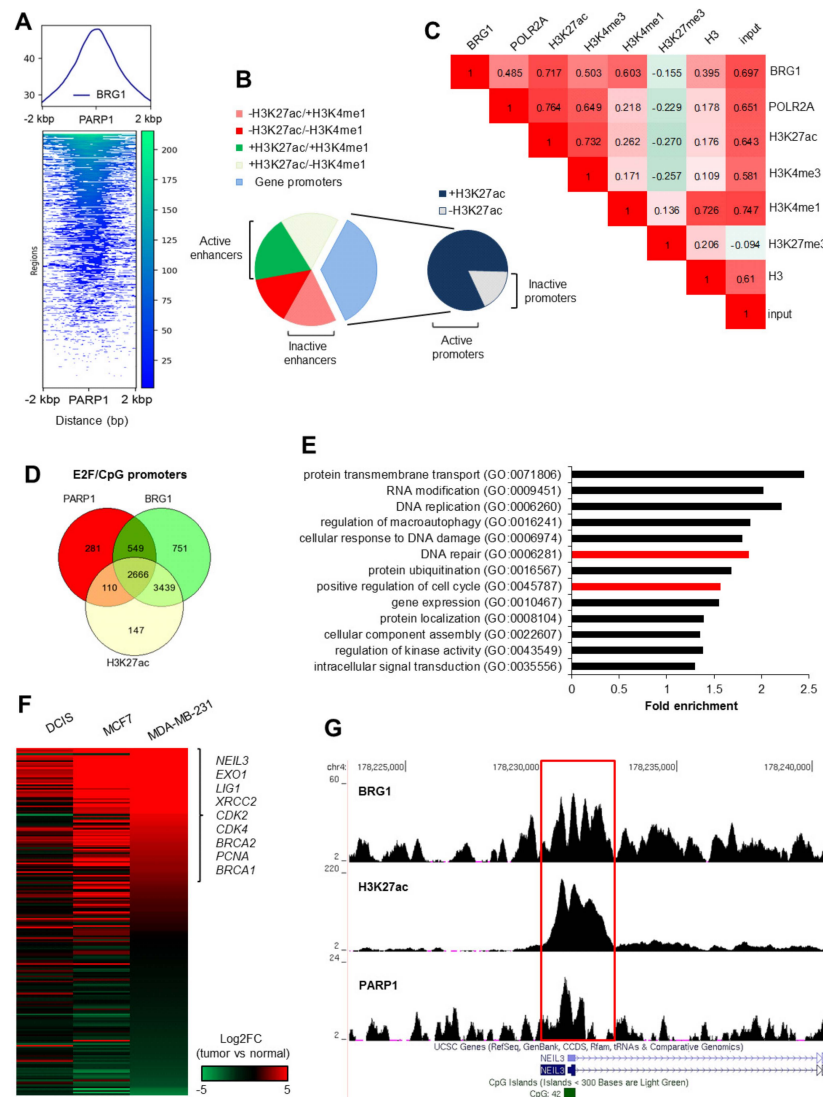


Figure 2. PARP1 co-occurs with BRG1 at the promoters of transcriptionally active genes in MDA-MB-231 cells. **(A)** An example computeMatrix/plotProfile plot of ChIP-Seq data for BRG1. BRG1 peaks are centered at PARP1-enriched regions in the genome of the MDA-MB-231 cell. **(B)** Association of PARP1/BRG1 peaks with gene regulatory regions shows a prevailing occurrence at the active gene promoters. Enhancers emerged based on H3K27ac/H3K4me1 status, whereas promoters were assumed as TSS $\pm$ 2 kbp. PARP1/BRG1-enriched regions were assigned to particular groups and quantified by bedtools Intersect intervals. **(C)** BRG1 distribution at the PARP1 peaks reveals a relatively strong correlation with histone markers and with POLR2A, which is typical for actively transcribed genes (multiBamSummary/plotCorrelation; PARP1 peaks in bed for scoring). **(D)** Venn diagram showing that a high proportion of PARP1 positive gene promoters are characterized by the presence of BRG1 and strong acetylation of H3K27. **(E)** Triple-positive gene promoters identified in **(D)** represent a functional association with numerous intracellular processes. GO-enriched terms were identified in AmiGO2. **(F)** Differential expression of genes from two selected GOs, i.e., DNA repair and positive regulation of the cell cycle (marked in red in **(E)**) in cancer cells (DCIS – ductal carcinoma in situ, pre-invasive malignancy of the breast and two breast cancer cell lines: MCF7 and MDA-MB-231) versus normal cells, as quantified by Cuffdiff. The heatmap shows Log2 of the calculated fold change (Log2FC; cancer versus normal cells). **(G)** UCSC Genome browser visualization of PARP1, BRG1, and H3K27ac enrichment using Model-based Analysis of ChIP-Seq data (MACS) (bigwig) at the NEIL3 promoter.

2.3. PARP1 Conditions Transcriptionally Permissive Chromatin Structure at BRG1/EP300-Dependent Genes

To verify the PARP1 contribution to the transcription of genes that are concomitantly controlled by BRG1–EP300 complexes (described by Sobczak et al. [12]), we targeted PARP1 with siRNA in both studied breast cancer cell lines and measured the mRNA levels of the selected genes representing two gene ontologies (Figure 3A). PARP1 silencing resulted in considerable suppression of most genes, with *XRCC2* being the only exception that responded to PARP1 deficiency, but not to inhibition with olaparib (iPARP, pan-PARP inhibitor) with increased transcription in MCF7 cells. Furthermore, to check whether the observed PARP1 impact on gene transcription required enzymatic activity, cells were treated with olaparib, a PARP inhibitor. Loss of this enzymatic activity phenocopied PARP1 protein deficiency for *CDK4*, *BRCA1*, *LIG1*, and *NEIL3*, indicating that poly-ADP-ribosylation plays a key role in maintaining a high transcription rate of the considered genes (Figure 3A,B, Table S5). Enzyme inhibition led to a dramatic decline in the cellular abundance of CDK4, LIG1, and NEIL3 proteins (Figure 3C). PARP1 deficiency repressed the transcription of the three studied genes: *CDK4*, *LIG1*, and *NEIL3* comparably to iSWI/SNF and iEP300 (no synergistic effect was observed according to Supplementary Figure S1 and Table S5; only *LIG1* in MDA-MB-231 cells responded with enhanced gene repression after the treatment of siPARP1 transfected cells with iEP300 and iSWI/SNF), suggesting that this enzyme operates with the same, previously studied regulatory mechanism that utilizes the activity of BRG1 and EP300 at the three gene promoters considered [11,12], and that PARP1 may positively affect at least one of the chromatin-remodeling enzymes. This set of data suggests that PARP1 may also operate independently of EP300 and BRG1 (e.g., as a repressor of *XRCC2* in MCF7 cells).

Since EP300 and BRG1 drive gene transcription by respectively acetylating and displacing histones, to allow assembly of the transcriptional machinery, we focused on nucleosome acetylation status and density as possible readouts of PARP1 activity to identify the molecular basis of the observed effect of poly-ADP-ribosylation on BRG1–EP300-dependent gene expression. PARP inhibition with olaparib led to a substantial loss of histone acetylation and was associated with an increase in histone density (Figure 3D; H3 enrichment and status of H3K27ac for each of the studied promoters can be found in Table S5: sheet: LIG1, NEIL3, CDK4 ChIP); the *XRCC1* promoter was used as a negative control since it lacks PARP1 (Figure S2; Table S5: sheet: *XRCC1* ChIP). This finding confirmed that ADP-ribosylation impacts BRG1–EP300 complexes in rapidly proliferating cells and defines the output of the considered chromatin-remodeling functional unit.

Knowing that BRG1 and EP300 co-occur at the studied gene promoters with HDAC1, the observed PARP1 effect on histone acetylation and gene transcription may result from PARP1 interaction with either of the two enzymes, since the subtle balance between acetylase and deacetylase activity determines the BRG1-dependent chromatin structure [11,12]. Thus, we tested whether poly-ADP-ribosylation inhibited HDAC1 activity at the gene promoters by comparing gene expression in the presence of HDAC and PARP inhibitors (Figure 3E). First, HDAC1 did not reduce the transcription of any of the three genes, and second, cell treatment with a mixture of both inhibitors suppressed *CDK4*, *LIG1*, and *NEIL3* in a similar way to iPARP only (PARP and HDAC activities had no synergistic impact on the gene expression; Table S5). This indicates that olaparib does not inhibit HDAC1 (or any other histone deacetylase, since we used a pan-HDAC inhibitor) activity from poly-ADP-ribosylation-dependent inhibition at the studied gene promoters.

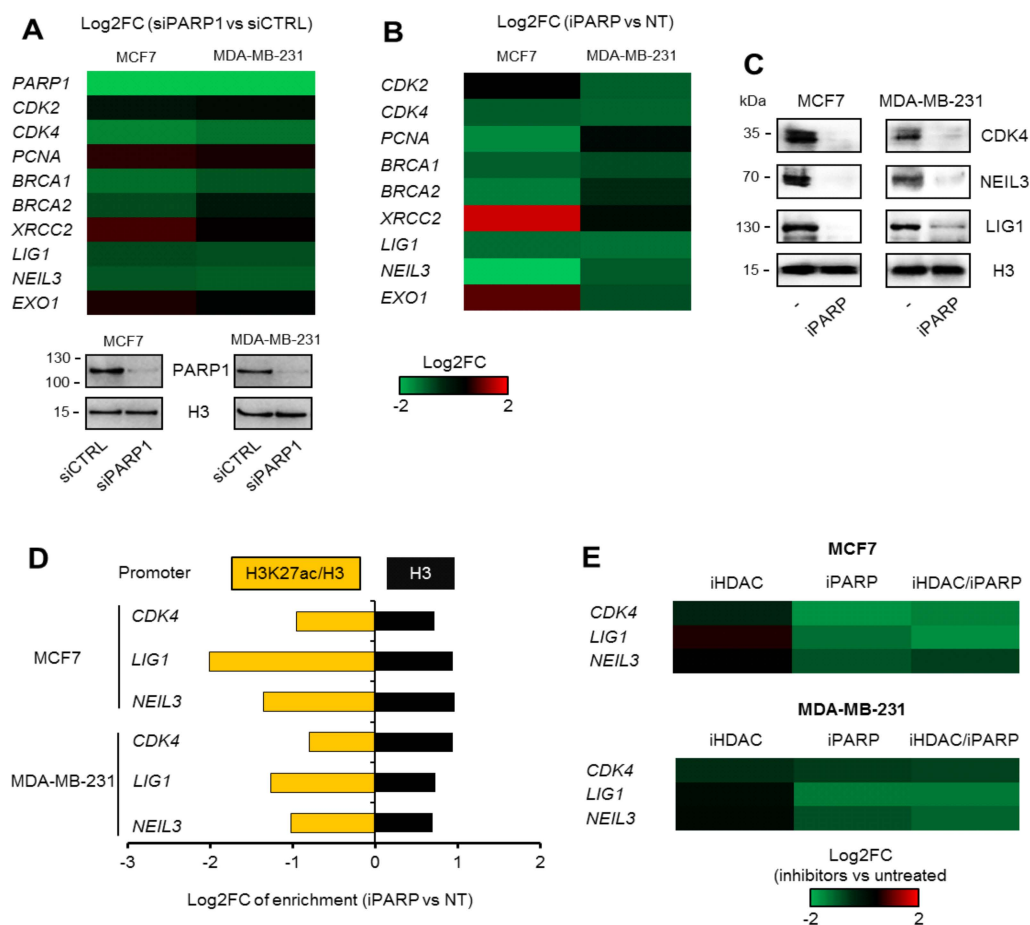


Figure 3. ADP-ribosylation confers open chromatin structure at the gene promoters. **(A)** PARP1 silencing leads to the suppression of most genes in MCF7 and MDA-MB-231 cells that feature PARP1/BRG1/H3K27ac-positive promoters. mRNA was compared 48 h after cell transfection with siCTRL and siPARP1. Log2 of the calculated fold change (Log2FC) shows gene expression in cells treated with inhibitors and normalized to untreated cells. The silencing of PARP1 was confirmed by Western blotting (below heatmap), and H3 was used as a loading control. A similar effect was observed upon PARP1 inhibition with olaparib (iPARP; 48 h) at both the mRNA **(B)** and protein level. **(C)** Representative pictures of protein detection by Western blotting. **(D)** Analysis of structure of selected PARP1-dependent gene promoters revealed a considerable loss of histone acetylation, but increased nucleosome density upon PARP1 inhibition for 24 h. Quantification was carried out by ChIP-qPCR, and data for specific antibodies were normalized first to 10% of the corresponding input and then to untreated control cells. **(E)** The iPARP effect on gene transcription with HDAC activity deficiency (cells were treated with both inhibitors for 48 h) was studied by real-time PCR. Results are presented as Log2 of the calculated fold change (inhibitor versus untreated; Log2FC).

2.4. Poly-ADP-Ribosylation of EP300 Drives BRG1–EP300-Dependent Gene Transcription

Identified PARP1 interaction with BRG1 frequently occurred at highly acetylated gene promoters (Figure 2B). The fact that at least some of them were previously confirmed to be enriched in BRG1–EP300 functional complexes [12] prompted us to check if EP300 interacted with PARP1 and if any of BRG1–EP300 components could undergo ADP-ribosylation in proliferating breast cancer cells.

Analysis of PARP1 pull-downs by Western blotting confirmed the physical interaction between PARP1 and EP300 (Figure 4A). Poly-ADP-ribose chains were detected in both immunoprecipitated enzymes, i.e., BRG1 and histone acetyltransferase, in the studied cancer lines (Figure 4B,C), thereby providing further evidence for a possible PARP1 role in the regulation of transcriptional activity of BRG1–EP300 complexes. Bearing in mind that the dependence of gene transcription on BRG1 and EP300 is conditioned by the association of enzymes with their gene promoters and then by the catalytic activity of chromatin-bound enzymes, we tested whether poly-ADP-ribosylation affected BRG1 and EP300 levels at the investigated promoters (Figure 4D). None of the studied genomic regions responded to PARP1 inhibition with substantial displacement or recruitment of chromatin remodeling enzymes, suggesting that poly-ADP-ribosylation determines the activity of enzymes rather than their occurrence at the gene promoters (Figure 4D, Table S5). The poly-ADP-ribosylation of EP300 enabled acetyltransferase activity that led to intensive nucleosome acetylation and eviction by BRG1, since cell treatment with a PARP inhibitor resulted in a dramatic loss of EP300-dependent acetylation of the studied gene promoters (Figure 3D, Table S5), without an apparent effect on the association of EP300 with the gene promoters and the HDAC1 role in gene transcription (Figures 4D and 3E).

To check if poly-ADP-ribosylation of BRG1 directly conditioned BRG1 activity and BRG1-dependent transcription, we tested the impact of the PARP1 inhibitor on the transcription of genes that are over-expressed in cancer cells and characterized by the occurrence of PARP1 and BRG1 at their promoters, but without considerable nucleosome acetylation (Figure 4D and Table S2). *IL1RL1* served as an example of repressed genes in MCF7 cells. Surprisingly, all of the genes found to be over-expressed that were considered in this experiment responded to SWI/SNF inhibition and silencing with increased transcription (Figure 4E, Table S5), suggesting that EP300 co-distribution with BRG1 might be a hallmark of gene promoters characterized by the pro-transcriptional activity of BRG1-based SWI/SNF complexes. However, this hypothesis requires further examination of a wider range of genes, especially because the considerable inhibitory role of BRG1 on gene transcription was observed in only one cell line. This finding also stresses the differences in gene transcription control in the two chosen cell lines. In any case, PARP1 was not involved in the transcriptional regulation of genes suppressed by the SWI/SNF complex; only one repressive effect was found for *RAD1* in MDA-MB-231 cells. Together, these data indicate that PARP1 co-regulates activity of promoter-bound BRG1–EP300 complexes, and that poly-ADP-ribosylation of EP300 is required to enable the BRG1-dependent eviction of acetylated nucleosome, and therefore the transcription of genes involved in key intracellular processes, such as cell division and the removal of DNA damage in breast cancer cells. This molecular mechanism of PARP1 action in BRG1–EP300 complexes is further supported by our previous findings, in which BRG1 emerged as a reader of nucleosome acetylation [11,12]. Thus, a low histone acetylation caused by PARP inhibition prevents histone eviction by BRG1.

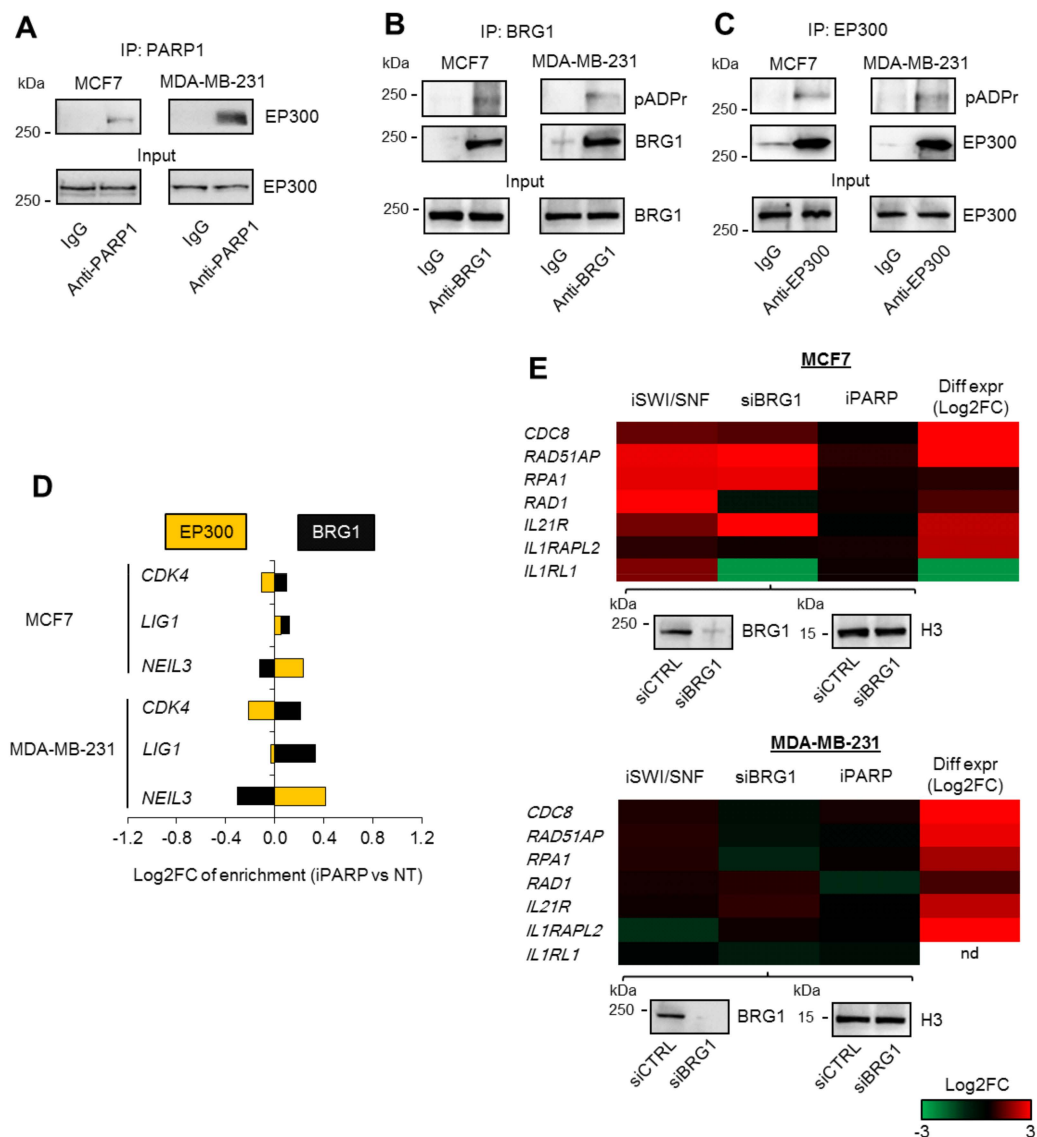


Figure 4. ADP-ribosylation of EP300 drives BRG1-dependent gene transcription. **(A)** The PARP1 interaction with EP300 was confirmed by visualization of EP300 by Western blot in PARP1 immunoprecipitates. **(B)** ADP-ribosylation of BRG1 was detected in BRG1 pull-downs by Western blot. **(C)** ADP-ribosylation of EP300 was detected as in **(B)** in EP300 pull-downs. **(D)** The effect of ADP-ribosylation on EP300 and BRG1 association with gene promoters in breast cancer cells was studied by ChIP-qPCR. Cells were supplemented with iPARP for 24 h prior to cell fixation. Data for anti-EP300 and anti-BRG1 were normalized to 10% input and then to untreated cells (Log2 enrichment vs. control cells). **(E)** The lack of contribution of ADP-ribosylation to the transcription of genes characterized by BRG1/PARP1 (no EP300) positive promoters was verified by comparing mRNA (real-time PCR) between the studied groups. For inhibitors, Log2FC was normalized to untreated cells, while data for BRG1 silencing were normalized to cells transfected with control siRNA. The efficiency of BRG1 silencing is confirmed by Western blot (below heatmaps). The column with differential expression shows gene transcription in MCF7 and MDA-MB-231 cell lines normalized to normal cells (data from RNA-Seq).

3. Discussion

Malignant transformation directs cellular changes and adaptive responses toward new requirements that cancer cells face during growth and metastasis. As long as the activation of oncogenes, loss of cell cycle checkpoint control, and impaired DNA repair capacity favor carcinogenesis, genome

integrity and cell cycle re-entrance will eventually become threatened due to increased energy demand, mild but persistent oxidative stress, and the modulation of signaling cascades necessary for tumor growth and the invasion of other tissues [17,18]. The altered expression of many gene products in response to cell transformation is affected by reprogramming the epigenome, resulting in changes in the transcription and reconstruction of the cellular proteome to meet emerging needs [19]. According to our findings, the activation of *PARP1* transcription as a consequence of the transition of a cell from quiescence to proliferation may help the cancer cell gain the necessary adaptive physiology by acting at the genomic level in two ways: directly, by contributing to DNA repair machineries, and indirectly, by affecting the transcription of BRG1–EP300 targets, among others, which enable the cancer cell to rapidly divide and resist DNA damaging agents [12,20–22]. Although the first aspects of this mechanism have been relatively deeply explored and the regulatory roles of PARP1 regarding the removal of DNA lesions and the transition between consecutive cell cycle phases in various modes—for example, the modulation of SP1 activity, H1 displacement at proliferation-relevant genes, and nuclear retention of PKM2—have been documented, the detailed molecular mechanism in regard to functionally linked genes has not been identified until now [23–25]. In this study, PARP1 was shown to be an active component of the transcription machinery that drives BRG1–EP300-dependent gene expression by the poly-ADP-ribosylation of EP300 in breast cancer cells. PARP1 was highly enriched at gene promoters characterized by the occurrence of not only BRG1 and EP300, but also E2F binding motif(s) and CpG islands. Since these features apply to many functionally linked genes, the role of PARP1 in defining the breast cancer phenotype at the transcription level is likely to go far beyond cell cycle progression and the removal of DNA damage. As shown in Figure 2E, triple-positive PARP1/BRG1/H3K27ac promoters represent the genes responsible for signal transduction and autophagy. Once poly-ADP-ribosylation is proved to be a co-activator of these genes, PARP inhibitors may be important to consider for pharmacological interventions that target and suppress mediators of pro-survival cascades at the genomic level. The role of poly-ADP-ribosylation in the fine-tuning of numerous intracellular processes simultaneously allows the maximization of the effectiveness of PARP1 inhibitors in rendering cancer cells vulnerable to anticancer drugs, which challenge PARP1-dependent or concurrent intracellular routes. Bearing in mind that the BRG1/EP300 complex was shown to operate at gene promoters in proliferating breast cancer cells and human macrophages due to an association with E2F transcription factors [12,26], the same PARP1-dependent mechanism of transcription control likely applies to other tumors, since the cell cycle status conditions both PARP1 expression and the activity of BRG1–EP300 complexes. Similarly, the energy status of proliferating cells demands a high ATP concentration; thus, the NAD^+/NADH redox ratio determines, for example, that PARP1 activity is five times higher in cancer cells than in normal, non-transformed cells [27]. Therefore, it might be possible to adapt PARP1 inhibitors for the modulation of intracellular processes in a wider range of cancers.

This study revealed a new mechanism that defines cancer cell responses to DNA lesions in a poly-ADP-ribosylation-dependent manner. Although the direct contribution of PARP1 to pathway repair at sites of damage is well acknowledged [28,29], we showed for the first time an impact on the repair mechanisms that is distant, gene promoter-related, and independent of lesion location. In this context, PARP inhibitors could be used to suppress the transcription of genes characterized by promoters enriched in PARP1, BRG1, and EP300, which represent executors that are crucial for BER, SSBR, NER, MMR, HR, and alt-NHEJ, since products of only the considered genes, i.e., *BRCA1/2*, *LIG1*, and *NEIL3*, contribute to more than one repair pathway [30,31]. Another benefit of using PARP inhibitors as DNA repair modulators acting at the level of the epigenome comes from the observation that poly-ADP-ribosylation is a co-activator of cell cycle-dependent genes that are simultaneously controlled by BRG1 and EP300, and are mostly over-expressed in the studied breast cancer cells, thus providing some selectivity toward this group. PARP1 was also found at gene promoters occupied by BRG1 alone, but cell treatment with olaparib did not reveal a considerable impact on the expression of these genes. Notably, the PARP1/BRG1 promoter response to an SWI/SNF inhibitor that is capable of impeding the activity of both ATPases (Figure 4D) suggested that (a) EP300 has a co-activating role with BRG1 at the

BRG1/EP300 promoters, and/or (b) the role of particular ATPases may be determined by EP300, and the lack of acetyltransferase may switch BRG1 to BRM activity. Although the scope of iSWI/SNFs is broader than that of iPARPs, the unexpected reaction of the chromatin to the loss of BRG1 and BRM activity may result in a coinciding repression and up-regulation of genes assigned to one regulatory circuit. Discrete inhibitors of the two ATPases mentioned, as well as further study on the mutual interdependence between these two enzymes, are needed for future clinical applications. Similarly, inhibitors of EP300 modulate the transcription of a significant number of genes at different levels; at the genome level by preventing acetylation of transcription co-factors and nucleosomes, and at the signaling cascade level by modifying signal transducers [32,33]. This all results in even less specificity toward the desired gene pool, and underlines the importance of the possible applications of PARP1 inhibitors. Some PARP-1 and PARP-2 inhibitors, such as olaparib, niraparib, rucaparib, veliparib, and talazoparib, which are small-molecule NAD⁺ mimetics, are currently being studied in later-stage clinical trials or are already approved for breast and ovarian cancer treatment with deleterious germline *BRCA1* and *BRCA2* mutations, which predispose women to develop triple-negative and hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancers, respectively [34,35]. Since PARP inhibitor monotherapy strategies are effective in cancers with homologous recombination repair defects and are relatively well-tolerated by patients, they can be considered for the treatment of a wider range of cancers, both in combined therapies, due to the well-established fact that these drugs sensitize cells to DNA-damaging chemotherapy and radiation therapy, or as an alternative to taxanes and a supplement to anthracyclines [36–38]. However, numerous phase I clinical trials utilizing a combination of cytotoxic chemotherapy with PARP inhibitors failed to confirm any beneficial effects of such combinations. Therefore, the use of these drugs in adjuvant or neoadjuvant settings may need substantial revision, while also taking into consideration the myelosuppressive effects of PARP inhibitors and the careful selection of anticancer agents in combination with DNA repair inhibitor(s). Nevertheless, the long list of promoters of functionally related genes that are enriched in PARP1 presented in this manuscript suggest the likely involvement of this enzyme regarding the modulation of other intracellular processes at the transcription level. These findings open the gate for new ideas and concepts regarding anticancer approaches, which require verification first in cell and animal models.

The described contribution of PARP1 to the regulation of BRG1–EP300 activity emphasizes the role of PARP1 in chromatin remodeling. Although a number of papers have documented this enzyme as a direct or indirect regulator of chromatin structure in a context-dependent fashion, none have provided an overall mechanism for functionally linked gene sets in particular. Transcription in cells is shaped by the poly-ADP-ribosylation of nucleosomes, histone writers and erasers (KDM5B), transcription factors (e.g., C/EBP β), or POL2 regulating co-factors (NELF), as well as physical, activity-independent interactions with gene promoters that define chromatin composition (LSD1, EP300) [13–16,39,40]. However, DNA motifs or chromatin signatures, which determine PARP1 distribution in the genome, remain unidentified. According to Gibson, PARP1 and ADP-ribosylation correlated with histone markers (H3K4me3 and H3K27ac) featuring actively transcribed genes and with POL2 pausing machinery in embryonic fibroblasts of mice [40]. These findings agree with our own, in which PARP1 was enriched at highly acetylated CpG islands, allowing immediate POL2 pausing or release in response to received signals [11,12]. The association of PARP1 with GC-rich regions impedes the identification of the PARP1-specific motif in promoter sequences. Since only 19% of PARP1 peaks in the genome of MDA-MB-231 cells occurred at BRG1 and H3K27ac negative promoters, and less than 3% outside of BRG1 peaks, these two features of promoters, together with E2F-binding motifs and CpG islands, seem to direct the enzyme to its destination regarding chromatin, whereby the poly-ADP-ribosylation of BRG1 and EP300 enables gene expression.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

Two epithelial, breast cancer cell lines, derived from metastatic sites, MCF7 (estrogen and progesterone receptors-positive, HER2-negative) and MDA-MB-231 (triple negative) were purchased from ATCC and Sigma Aldrich (Poznan, Poland), respectively. DMEM high glucose with L-glutamine with sodium pyruvate for MCF7, fetal bovine serum, and antibiotics (penicillin and streptomycin) were from Biowest (CytoGen, Zgierz, Poland), L15 Medium for MDA-MB-231, iSWI/SNF (PFI-3), iHDAC (sodium butyrate), anti-rabbit IgG (A0545) and anti-mouse IgG (A4416) (whole molecule)–peroxidase antibody produced in goat, BLUeye prestained protein ladder (#94964), oligonucleotides for real-time PCR, SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablets (PIC) were from Sigma Aldrich (Poznan, Poland). iPARP (olaparib, AZD-2281) was from Cayman Chemical (Biokom, Janki/Warsaw, Poland). Lipofectamine RNAiMAX, OptiMem, Dynabeads™ Protein G, glycogen, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate, TRI Reagent™, and RNase A were from ThermoFisher Scientific (ThermoFisher Scientific, Warsaw, Poland). KAPA HiFi™ HotStart ReadyMix (2×) from KapaBiosystems and Takyon™ No ROX SYBR Core Kit blue dTTP from Eurogentec were purchased from Polgen (Lodz, Poland). EvaGreen® Dye, 20X in water was purchased from Biotium (Corporate Place Hayward, Fremont, CA, USA). WB antibodies: anti-DNA Ligase I (sc-271678), anti-CDK4 (sc-23896), anti-NEIL3 (sc-393703), anti-pADPr (sc-56198), siPARP1 (sc-29437), and gallotannin were purchased from Santa Cruz Biotechnology (AMX, Lodz, Poland). ChIP grade antibodies: normal rabbit IgG (#2729), anti-ARID1A (#12354), anti-SMARCC2 (#12760), anti-BRG1 (#49360), anti-H3K27ac (#4353), anti-histone H3 (#4620), and anti-PARP1 (#9532) were purchased from Cell Signaling Technology (LabJOT, Warsaw, Poland). Human Cytokine and Chemokine Receptor Primer Library (HCCR-I) were from RealTime Primers (Prospecta, Warsaw, Poland). For the mass spectrometric analysis, all materials were from Thermo Fisher Scientific (Loughborough, UK) unless otherwise indicated. Porcine Trypsin (Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade) was from Promega (Southampton, UK), and general use Protease Inhibitor Cocktail (P2174) was from Sigma-Aldrich (Poole, UK).

4.2. Cell Culture and Treatment with Inhibitors

MCF7 were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, penicillin/streptomycin (50 U/mL and 50 µg/mL, respectively) in 5% CO₂, whereas MDA-MB-231 was cultured in F15 medium supplemented with 15% FBS and penicillin/streptomycin (50 U/mL and 50 µg/mL, respectively) without CO₂ equilibration. After freezing and thawing, cells were cultured in DMEM as described for MCF7 cells. iSWI/SNF (10 µM; PFI-3), iPARP1 (olaparib, 1 µM), and iHDAC1 (sodium butyrate, 250 µM) were added to cells 48 h prior to analysis.

4.3. Quantification of Gene Expression

mRNA quantification was conducted as described in Pietrzak et al. [11] using Takyon™ No Rox SYBR® MasterMix dTTP blue (Eurogentec—from local distributor—Polgen, Lodz, Poland) and CFX96 C1000 Touch (BioRad, Warsaw, Poland) for real-time PCR. The median average of ACTB, GAPDH, and B2M were used for normalization. Data in figures are shown as Log2FC with respect to untreated control or to siCTRL (indicated in figures or figure legends).

For protein detection, cell lysates were processed as previously described and visualized using SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate. Pictures were acquired with ChemiDoc-IT2 (UVP, Meranco, Poznan, Poland).

The following primer sets were used for the quantification of gene expression: CDK2, 5'-CAGGATGTGACCAAGCCAGT-3' (forward) and 5'-TGAGTCCAAATAGCCCAAGG-3' (reverse); CDK4, 5'-CTGGTGTGTTGAGCATGTAGACC-3' (forward) and 5'-AAACTGGCGCATCAGATCCTT-3' (reverse), XRCC2, 5'-TCGCCTGGTCTTTTGTGCA-3' (forward)

and 5'-TCTGATGAGCTCGAGGCTTTC-3' (reverse), *BRCA2*, 5'-CTTGCCCCCTTCGTCTATTTG-3' (forward) and 5'-TACGGCCCTGAAGTACAGTCT-3' (reverse), *LIG1*, 5'-CAGAGGGCGAGTTTGTCTTC-3' (forward) and 5'-AGCCAGTTGTGCGATCTCTT-3' (reverse), *EXO1*, 5'-AAACCTGAATGTGGCCGTGT-3' (forward) and 5'CCTCATTCCCAAACAGGGACT-3' (reverse), *NEIL3*, 5'-GGTCTCCACCCAGCTGTAAAG-3' (forward) and 5'-CACGTATCATTTTCATGAGGTGATG-3' (reverse), *PCNA*, 5'-TCTGAGGGCTTCGACACCTA-3' (forward) and 5'-TTCTCCTGGTTTGGTGCTTCA-3' (reverse); *BRG1*, 5'-AAGAAGACTGAGCCCCGACATTC-3' (forward) and 5'-CCGTTACTGCTAAGGCCTATGC-3' (reverse), *BRCA1*, 5'-TGCCCCACAGATCAACTGGAA-3' (forward) and 5'-CACAGGTGCCTCACACATCT-3' (reverse); *ACTB*, 5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3' (forward) and 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3' (reverse); *PARP1*, 5'-AAGCCCTAAAGGCTCAGAACG-3' and 5'-ACCATGCCATCAGCTACTCGGT-3'. *GAPDH* and *B2M* were from the Human Toll-like Receptor Signaling Primer Library (HTLR-I, RealTime Primers – from local distributor - Prospecta, Warsaw, Poland)).

4.4. PARP1 Co-Immunoprecipitation for Mass Spectrometry

2×10^7 MCF7 cells were trypsinized, washed 3× with cold PBS, and lysed on ice in hypotonic buffer (50 mM HEPES-KOH, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, and 0.5% NP-40, 0.25% TritonX-100). Nuclei were washed twice in PBS supplemented with protease inhibitor cocktail (10× stock added at 10% of volume, Sigma P2714 General Purpose) and fixed in 1% formaldehyde in PBS on stirrer for 10 min at room temperature. Formaldehyde was quenched by the addition of 125 mM glycine, and after 20 min of incubation, nuclei were washed twice in 10 mM Tri-HCl (pH = 8.0), 100 mM NaCl, and 1 mM EDTA, and finally resuspended in 10 mM Tri-HCl (pH = 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05 Na-deoxycholate, and 0.25% N-laurosarcosine. Nuclei were sonicated until the solution was transparent, TritonX-100 was added to 1% and then centrifuged ($10,000 \times g$, 4 °C, 10 min) to remove insoluble material. The supernatant was split into two samples, to which were added either control IgG–Dynabead or anti-PARP1–Dynabead conjugates (prepared by the incubation of 5 µg of antibody and 10 µL of magnetic beads in 10 mM Tri-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05 Na-deoxycholate, and 0.25% N-laurosarcosine for at least 15 min). After overnight incubation on a roller shaker at 4 °C, the supernatant was removed, and the beads were washed 5× with 50 mM HEPES-KOH (pH = 7.5), 500 mM LiCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, and 0.7% Na-deoxycholate; twice with 50 mM NaCl in TE buffer (10 mM Tris pH = 8.0, 1 mM EDTA); and twice with 50 mM ammonium bicarbonate using a magnetic stand. Then, the beads were incubated with trypsin (Promega Gold, 1 µg/µL) in 50 mM ammonium bicarbonate for 6 h at 36 °C, after which the supernatant was transferred to new tubes and dried in a SpeedVac vacuum concentrator (Eppendorf, Stevenage, UK).

4.5. Mass Spectrometry Analysis of PARP1 Co-Immunoprecipitates

Tryptic digest samples were resuspended in 25 µL of 2% acetonitrile in water and 0.5% formic acid. Peptides were separated and analyzed using a U3000 nanoflow LC system (Thermo) connected to a 5600 Triple ToF mass spectrometer (Sciex, Warrington, UK). Then, 10 µL of sample was loaded onto a 0.5×5 mm PepMap C18 trap, washed with buffer A (2% acetonitrile 98% water containing 0.5% formic acid) for 4 min, and then separated by a 90-minute gradient from 2% to 40% buffer B (98% acetonitrile, 2% water containing 0.5% formic acid) on a 0.075×150 mm PepMap C18 column (Thermo Fisher Scientific, Loughborough, UK). MSMS data were collected for precursors of 2^+ to 5^+ charge state in the range m/z 350–1250 Th using a top 10 data dependent acquisition method, collecting MS data for 200 ms and MSMS data for 100 ms, with dynamic exclusion for 15 s and a standard rolling collision energy settings. MSMS data was collected in the range of m/z 50–2000 Th. All other settings were optimized for peptides using a standard mixture. Samples were run as biological replicates. MSMS data was analyzed using Progenesis QIP (Waters, Manchester, UK) for label-free quantitative analysis and Mascot (Matrix Science, London) for protein identification. Data was loaded as .wiff

files into Progenesis QIP, automatically aligned, and peak picked using the default settings; then, the alignment was manually improved where necessary. Default settings were used for peak picking, and Hi-N was used for quantification. Data was exported to Mascot using the default settings. For the Mascot analysis, the SwissProt Mammalian database (2018_09) was searched, allowing 50 ppm error for MS and 100 ppm for MS/MS data, two missed cleaves, methionine oxidation as a variable modification, and an overall FDR of <1%. Data was re-imported into Progenesis QIP for further quantitative analysis. Protein identifications were deemed significant if more than two peptides were identified with an overall confidence score greater than 50, but more stringent criteria were applied for proteins to be further investigated. Quantification data was considered significant where the ANOVA *p*-value was less than 0.05, the fold change was greater than 2, and the highest mean was in the PARP immunoprecipitation.

4.6. Co-Immunoprecipitation and Western Blot

MCF7 and MDA-MB-2331 cells were lysed in 20 mM Tris-HCl (pH = 7.5), 75 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 10% glycerol, 0.1% Tween20, and PIC (IP buffer); sonicated with the ultrasonic homogenizer Bandelin Sonopuls (HD 2070; 10 impulses, 60%); and centrifuged (10,000× *g*, 4 °C, 10 min). Supernatant was incubated with anti-PARP1, anti-BRG1, anti-EP300, and corresponding IgG at 4 °C for 2 h. For another 1 h, lysates were added with Dynabeads (5 µL); then, they were washed 5× with the IP buffer and once in 50 mM NaCl in TE buffer (10 mM Tris pH = 8.0, 1 mM EDTA). Beads were suspended in gel loading buffer supplemented with 5% β-mercaptoethanol, and heated at 70 °C for 10 min. Beads were collected on a magnetic stand and supernatant was separated by PAGE. BRG1, ARID1A, SMARCC1, SMARCC2, PARP1, EP300, H3, and poly-ADP-ribose were detected on nitrocellulose membranes after overnight staining with corresponding antibodies. For the detection of poly-ADP-ribosylation, cells were lysed and processed in the presence of a PARG inhibitor: 0.5 mM gallotannin.

Each immunoprecipitation followed by Western blot was repeated in three biological replicates. Each time, the striking difference in protein level being detected was observed between IgG (weak or lack of signal) versus anti-PARP1 (or anti-BRG1; strong and clear bands). Representative images were taken for figures.

4.7. Chromatin Immunoprecipitation

The immunoprecipitation of chromatin-bound proteins and histones was carried out according to the protocol previously described [11]. For the quantification of H3K27 acetylation, cells were lysed and processed in the presence of iHDAC (0.5 mM). Fragments spanning PARP1/BRG1/H3K27ac sites in selected gene promoters were amplified using KAPA HiFi™ HotStart ReadyMix supplemented with EvaGreen® Dye and 4% DMSO. Primers for *CDK4*, *LIG1*, *NEIL3*, and *XRCC1* promoters were as follows: *CDK4* prom, 5'-ATAACCAGCTCGCGAAACGA-3' and 5'-AGAGCAATGTCAAGCGGTCA-3', *LIG1* prom, 5'-AACACACTCAGATCCGCCAG-3' and 5'-GCTTCCACCGATTCTCCTC-3', *NEIL3* prom, 5'-GTAGGGAGCGACCTCAACAG-3' and 5'-AGTACAGCCTGGTCCTTCCA-3', *XRCC1* prom, 5'-TGGCCAGAAGGATGAGGTAG-3' (forward) and 5'-AGGAAACGCTCGTTGCTAAG-3' (reverse).

4.8. Transient Gene Silencing

For PARP1 and BRG1 silencing, MCF7 and MDA-MB-23 cells were seeded at the density of 100,000 cells per well, transfected on the following day with RNAiMAX-siRNA complexes (3 µL of transfection reagent and 20 nmol siRNA incubated in OptiMem for 20 min). The silencing was confirmed by real-time PCR and Western blot 48 h after cell transfection.

4.9. ChIP-Seq Analysis in Galaxy Version 19.05.dev [41]

The following, publically available, generated by other groups and deposited in the PubMed Central Database data from MDA-MB-231 cells were taken for ChIP-Seq analysis:

PARP1—GSM1517306 (SRR1593959), BRG1—GSM1856026 (SRR2171350), GSM1856027 (SRR2171351), and GSM1856028 (SRR2171352), H3K27ac—GSM1855991 (SRR2171311) and GSM1855992 (SRR2171312); H3K4me3—GSM1700392 (SRR2044734), H3K4me1—GSM2036932 (SRR3096750 and SRR3096751), H3K27me3—GSM949581 (SRR513994), H3K9ac—GSM1619765 (SRR1820123 and SRR1820124), H3—GSM2531568 (SRR5332805), POLR2A—GSM2309434 (SRR4240635), and Input—GSM1964894 (SRR2976843). FASTQ quality formats were unified to Sanger formatted with a FASTQ Groomer [26]. Reads were aligned to Human Genome version 19 using a Map with Bowtie for Illumina, and unmapped reads were filtered out. ChIP-seq peaks were called in MACS with a *p*-value cutoff for peak detection set at 10^{-3} . BRG1 co-occurrence at the PARP1 peaks was monitored by computeMatrix/plotProfile (PARP1 peaks in bed were used as regions to plot, while mapped BRG1 reads were used for scoring) [42]. The co-distribution of BRG1, POLR2A, and histone modifications at the PARP1-enriched regions was studied by MultBamSummary/plotCorrelation (regions of the genome were limited to PARP1 peaks in bed, mapped reads for scoring) [42]. Regions simultaneously enriched in BRG1, PARP1, H3K4me1, and H3K27ac were identified by returning intersects of the peaks in bed using bedtools Intersect intervals [43]. Regions localized outside of gene promoters and double positive for H3K4me1 and H3K27ac were assigned as active enhancers high in H3K4me1 and low in H3K27ac as inactive enhancers, while gene promoters were recognized by returning intersects of BRG1/PARP1 peaks and genomic regions ± 2000 bp centered on TSS (overlapping intervals of both datasets). Promoters defined by high H3K27ac and associated with the presence of gene transcripts (RNA-Seq results for MDA-MB-231) downstream of corresponding TSS were assumed as active, while the lack of promoter acetylation marked inactive gene promoters. Genomic intervals for E2F (overlaps of E2F1 and E2F4) and CpG islands were taken from the UCSC main tables wgEncodeRegTfbsClusteredV3 and cpGIslandExt, respectively. Intersects of TSS ± 2 kbp and CpG or E2F intervals were compared using bedtools Intersect intervals. The characteristics of gene promoters (occurrence of particular proteins and CpGs, histone modifications, E2F binding sites) were studied using Venn diagrams, which were created in <http://www.interactivenn.net/> from gene lists. The annotation of PARP1/BRG1/H3K27ac promoters to biological processes was carried out in AmiGO2 (test type—binominal, correction—FDR) [44]. PARP1, BRG1, and H3K27ac peaks were visualized in the UCSC Genome Browser.

The following, publicly available datasets for various breast cells, which have been generated by other groups, were downloaded from the PubMed Central Database data and used for ChIP-Seq analysis: data from normal breast, ductal carcinoma in situ (DCIS; pre-invasive malignancy of the breast), MCF7 and MDA-MB-231 cells were taken for RNA-Seq analysis: normal breast—GSM1695870 (SRR2040339), GSM1695872 (SRR2040341), GSM1695873 (SRR2040342), GSM1695874 (SRR2040343), GSM1695877 (SRR2040346), and GSM1695878 (SRR2040347); DCIS—GSM1695891 (SRR2040360), GSM1695898 (SRR2040367), GSM1695899 (SRR2040368), GSM1695882 (SRR2040351), GSM1695890 (SRR2040359), and GSM1695894 (SRR2040363); MCF7—GSM2422725 (SRR5094305), GSM2422726 (SRR5094306), GSM2422727 (SRR5094307), GSM2422728 (SRR5094308), GSM2422729 (SRR5094309), and GSM2422730 (SRR5094310); MDA-MB-231—GSM2422731 (SRR5094311), GSM2422732 (SRR5094312), GSM2422733 (SRR5094313), GSM2422734 (SRR5094314), GSM2422735 (SRR5094315), and GSM2422736 (SRR5094316). All samples were processed as described in Sobczak et al. [12]. Differential gene expression in cancer versus normal breast cells was calculated with Cuffdiff and shown as a heatmap for two selected GOs (positive regulation of cell cycle and DNA repair) [45].

5. Conclusions

In conclusion, our study describes a new mechanism regarding the regulation of the transcription of functionally linked genes that are significant for cancer cell physiology. Poly-ADP-ribosylation emerges as a chromatin remodeler that is capable of defining the activity of BRG1–EP300 complexes at the promoters of genes encoding cell cycle and DNA repair-promoting proteins. Although the PARP1 inhibitor olaparib emerges as a promising tool to modulate PARP1/BRG1/EP300-dependent gene expression due to its safety and well-established in vivo effects in cancer treatment, the functional

impact of DNA repair gene repression in anticancer therapies requires further investigation. In any case, our study provides a basis for the search for new combinations of iPARPs with other compounds to increase the beneficial effects of anticancer approaches.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/11/10/1539/s1>, Table S1. Protein List identified in PARP1 immunoprecipitates by Mass Spectrometry. Table S2. PARP1, BRG1, and H3K27ac distribution at the CpG/E2F positive gene promoters. Table S3. Full list of gene enrichment analysis for PARP1/BRG1/H3K27ac/E2F/CpG positive promoters. Table S4. Differential expression of proliferation and DNA repair genes in DCIS, MCF7 and MDA-MB-231 cells versus normal breast tissue. Table S5. Statistical analysis of data. Figure S1. Effect of PARP1 silencing, SWI/SNF inhibition, and EP300 inhibition on gene expression. Figure S2. Chip-qPCR data for effect of iPARP on the XRCC1 promoter.

Author Contributions: A.R.: conceptualization, supervision, bioinformatic analysis of DNA-bound proteins, experiments (PARP1 co-immunoprecipitation for mass spectrometry, Figures 2–4), writing; A.R.P. and C.M.S.: optimization and mass spectrometry analysis of PARP1 co-immunoprecipitates, M.S.: bioinformatic analysis of differentiation gene expression and experiments (Figures 1C and 2, Figures 3 and 4). Data shown in Figure 1A and Table S1 were collected at the Aston University in Birmingham, while all other experiments were conducted in the Department of General Biophysics, University of Lodz.

Funding: This research was funded by the Polish National Science Center, grant number DEC-2013/11/D/NZ2/00033 and A.R. was funded by Ministry of Science and Higher Education (776/STYP/11/2016).

Acknowledgments: A.R. acknowledges grants from the Polish National Science Center (DEC-2013/11/D/NZ2/00033) and Ministry of Science and Higher Education (776/STYP/11/2016); The visit of A.R. to the School of Life & Health Sciences at Aston University was funded by a FEBS Short-Term Fellowship.

Conflicts of Interest: Authors declare no conflict of interest.

References

1. Boussios, S.; Karathanasi, A.; Cooke, D.; Neille, C.; Sadauskaite, A.; Moschetta, M.; Zakynthinakis-Kyriakou, N.; Pavlidis, N. PARP Inhibitors in Ovarian Cancer: The Route to “Ithaca”. *Diagnostics* **2019**, *9*, 55. [CrossRef] [PubMed]
2. Faraoni, I.; Giansanti, M.; Voso, M.T.; Lo-Coco, F.; Graziani, G. Targeting ADP-ribosylation by PARP inhibitors in acute myeloid leukaemia and related disorders. *Biochem. Pharmacol.* **2019**, *167*, 133–148. [CrossRef] [PubMed]
3. Li, M.; Yu, X. The role of poly(ADP-ribosyl)ation in DNA damage response and cancer chemotherapy. *Oncogene* **2015**, *34*, 3349–3356. [CrossRef] [PubMed]
4. Pines, A.; Vrouwe, M.G.; Martijn, J.A.; Typas, D.; Luijsterburg, M.S.; Cansoy, M.; Hensbergen, P.; Deelder, A.; De Groot, A.; Matsumoto, S.; et al. PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. *J. Cell Biol.* **2012**, *199*, 235–249. [CrossRef] [PubMed]
5. Luijsterburg, M.S.; De Krijger, I.; Wiegant, W.W.; Shah, R.G.; Smeenk, G.; De Groot, A.J.; Pines, A.; Vertegaal, A.C.; Jacobs, J.J.; Shah, G.M.; et al. PARP1 Links CHD2-Mediated Chromatin Expansion and H3.3 Deposition to DNA Repair by Non-homologous End-Joining. *Mol. Cell* **2016**, *61*, 547–562. [CrossRef] [PubMed]
6. Yang, G.; Liu, C.; Chen, S.-H.; Kassab, M.A.; Hoff, J.D.; Walter, N.G.; Yu, X. Super-resolution imaging identifies PARP1 and the Ku complex acting as DNA double-strand break sensors. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 3446–3457. [CrossRef] [PubMed]
7. Lai, J.; Yang, H.; Zhu, Y.; Ruan, M.; Huang, Y.; Zhang, Q. MiR-7-5p-mediated downregulation of PARP1 impacts DNA homologous recombination repair and resistance to doxorubicin in small cell lung cancer. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 602. [CrossRef] [PubMed]
8. Soria, G.; Polo, S.E.; Almouzni, G. Prime, Repair, Restore: The Active Role of Chromatin in the DNA Damage Response. *Mol. Cell* **2012**, *46*, 722–734. [CrossRef]
9. Chen, Y.; Zhang, H.; Xu, Z.; Tang, H.; Geng, A.; Cai, B.; Su, T.; Shi, J.; Jiang, C.; Tian, X.; et al. A PARP1-BRG1-SIRT1 axis promotes HR repair by reducing nucleosome density at DNA damage sites. *Nucleic Acids Res.* **2019**. [CrossRef]
10. Hang, C.T.; Yang, J.; Han, P.; Cheng, H.-L.; Shang, C.; Ashley, E.; Zhou, B.; Hang, C.T.; Chang, C.-P. Chromatin regulation by Brg1 underlies heart muscle development and disease. *Nature* **2010**, *466*, 62–67. [CrossRef]

11. Pietrzak, J.; Płoszaj, T.; Pułaski, Ł.; Robaszkiewicz, A. EP300-HDAC1-SWI/SNF functional unit defines transcription of some DNA repair enzymes during differentiation of human macrophages. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **2019**, *1862*, 198–208. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Sobczak, M.; Pietrzak, J.; Płoszaj, T.; Robaszkiewicz, A. BRG1 emerges as the master activator of proliferation and DNA repair genes in breast cancer cells. *Cancers*. (under review).
13. Krishnakumar, R.; Kraus, W.L. PARP-1 regulates chromatin structure and transcription through a KDM5B-dependent pathway. *Mol. Cell* **2010**, *39*, 736–749. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Luo, X.; Ryu, K.W.; Kim, D.S.; Nandu, T.; Medina, C.J.; Gupte, R.; Gibson, B.A.; Soccio, R.E.; Yu, Y.; Gupta, R.K.; et al. PARP-1 Controls the Adipogenic Transcriptional Program by PARylating C/EBPbeta and Modulating Its Transcriptional Activity. *Mol. Cell* **2017**, *65*, 260–271. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Robaszkiewicz, A.; Wisnik, E.; Regdon, Z.; Chmielewska, K.; Virag, L. PARP1 facilitates EP300 recruitment to the promoters of the subset of RBL2-dependent genes. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* **2017**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Tokarz, P.; Płoszaj, T.; Regdon, Z.; Virág, L.; Robaszkiewicz, A. PARP1-LSD1 functional interplay controls transcription of SOD2 that protects human pro-inflammatory macrophages from death under an oxidative condition. *Free Radic. Boil. Med.* **2019**, *131*, 218–224. [\[CrossRef\]](#)
17. Broustas, C.G.; Lieberman, H.B. DNA Damage Response Genes and the Development of Cancer Metastasis. *Radiat. Res.* **2014**, *181*, 111–130. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Selfors, L.M.; Stover, D.G.; Harris, I.S.; Brugge, J.S.; Coloff, J.L. Identification of cancer genes that are independent of dominant proliferation and lineage programs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E11276–E11284. [\[CrossRef\]](#)
19. Poli, V.; Fagnocchi, L.; Zippo, A. Tumorigenic Cell Reprogramming and Cancer Plasticity: Interplay between Signaling, Microenvironment, and Epigenetics. *Stem Cells Int.* **2018**, *2018*, 4598195. [\[CrossRef\]](#)
20. Wiśnik, E.; Płoszaj, T.; Robaszkiewicz, A. 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.* **2017**, *7*, 9483. [\[CrossRef\]](#)
21. Tempka, D.; Tokarz, P.; Chmielewska, K.; Kluska, M.; Pietrzak, J.; Rygielska, Z.; Virag, L.; Robaszkiewicz, A. Downregulation of PARP1 transcription by CDK4/6 inhibitors sensitizes human lung cancer cells to anticancer drug-induced death by impairing OGG1-dependent base excision repair. *Redox Biol.* **2018**, *15*, 316–326. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Pietrzak, J.; Spickett, C.M.; Płoszaj, T.; Virag, L.; Robaszkiewicz, A. PARP1 promoter links cell cycle progression with adaptation to oxidative environment. *Redox Boil.* **2018**, *18*, 1–5. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Yang, L.; Huang, K.; Li, X.; Du, M.; Kang, X.; Luo, X.; Gao, L.; Wang, C.; Zhang, Y.; Zhang, C.; et al. Identification of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 as a Cell Cycle Regulator through Modulating Sp1 Mediated Transcription in Human Hepatoma Cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82872. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Wright, R.H.; Castellano, G.; Bonet, J.; Le Dily, F.; Font-Mateu, J.; Ballare, C.; Nacht, A.S.; Soronellas, D.; Oliva, B.; Beato, M. CDK2-dependent activation of PARP-1 is required for hormonal gene regulation in breast cancer cells. *Genes Dev.* **2012**, *26*, 1972–1983. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Li, N.; Feng, L.; Liu, H.; Wang, J.; Kasembeli, M.; Tran, M.K.; Tweardy, D.J.; Lin, S.H.; Chen, J. PARP Inhibition Suppresses Growth of EGFR-Mutant Cancers by Targeting Nuclear PKM2. *Cell Rep.* **2016**, *15*, 843–856. [\[CrossRef\]](#)
26. Blankenberg, D.; Gordon, A.; Von Kuster, G.; Coraor, N.; Taylor, J.; Nekrutenko, A.; Team, G. Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 1783–1785. [\[CrossRef\]](#)
27. Moreira, J.D.V.; Hamraz, M.; Abolhassani, M.; Bigan, E.; Pérès, S.; Paulevé, L.; Nogueira, M.L.; Steyaert, J.-M.; Schwartz, L. The Redox Status of Cancer Cells Supports Mechanisms behind the Warburg Effect. *Metabolites* **2016**, *6*, 33. [\[CrossRef\]](#)
28. Chaudhuri, A.R.; Nussenzweig, A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 610–621. [\[CrossRef\]](#)
29. Pascal, J.M. The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage. *DNA Repair* **2018**, *71*, 177–182. [\[CrossRef\]](#)
30. Christmann, M.; Kaina, B. Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: Trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 8403–8420. [\[CrossRef\]](#)

31. Chun, J.; Buechelmaier, E.S.; Powell, S.N. Rad51 paralogs BCDX2 and CX3 act at different stages in the BRCA1-BRCA2-dependent homologous recombination pathway. *Mol. Cell. Biol.* **2013**, *33*, 387–395. [CrossRef]
32. García-Carpizo, V.; Ruiz-Llorente, S.; Sarmentero, J.; Graña-Castro, O.; Pisano, D.G.; Barrero, M.J. CREBBP/EP300 bromodomains are critical to sustain the GATA1/MYC regulatory axis in proliferation. *Epigenet. Chromatin* **2018**, *11*, 30. [CrossRef] [PubMed]
33. Ebrahimi, A.; Sevinç, K.; Sevinç, G.G.; Cribbs, A.P.; Philpott, M.; Uyulur, F.; Morova, T.; Dunford, J.E.; Göklemmez, S.; Arı, Ş.; et al. Bromodomain inhibition of the coactivators CBP/EP300 facilitate cellular reprogramming. *Nat. Methods* **2019**, *15*, 519–528. [CrossRef] [PubMed]
34. US National Library of Medicine. Available online: <https://clinicaltrials.gov/> (accessed on 16 August 2019).
35. McCann, K.; Hurvitz, S. Advances in the use of PARP inhibitor therapy for breast cancer. *Drugs Context* **2018**, *7*, 212540. [CrossRef] [PubMed]
36. Mustacchi, G.; De Laurentiis, M. The role of taxanes in triple-negative breast cancer: Literature review. *Drug Des. Dev. Ther.* **2015**, *9*, 4303–4318. [CrossRef] [PubMed]
37. Jasra, S.; Anampa, J. Anthracycline Use for Early Stage Breast Cancer in the Modern Era: A Review. *Curr. Treat. Options Oncol.* **2018**, *19*, 30. [CrossRef] [PubMed]
38. Lorusso, V.; Manzione, L.; Silvestris, N. Role of liposomal anthracyclines in breast cancer. *Ann. Oncol.* **2007**, *18*, vi70–vi73. [CrossRef] [PubMed]
39. Martinez-Zamudio, R.; Ha, H.C. Histone ADP-Ribosylation Facilitates Gene Transcription by Directly Remodeling Nucleosomes. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 2490–2502. [CrossRef] [PubMed]
40. Gibson, B.A.; Zhang, Y.; Jiang, H.; Hussey, K.M.; Shrimp, J.H.; Lin, H.; Schwede, F.; Yu, Y.; Kraus, W.L. Chemical Genetic Discovery of PARP Targets Reveals a Role for PARP-1 in Transcription Elongation. *Sci.* **2016**, *353*, 45–50. [CrossRef] [PubMed]
41. Afgan, E.; Baker, D.; Batut, B.; Beek, M.V.D.; Bouvier, D.; Čech, M.; Chilton, J.; Clements, D.; Coraor, N.; A Grüning, B.; et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W537–W544. [CrossRef]
42. Ramírez, F.; Ryan, D.P.; Grüning, B.; Bhardwaj, V.; Kilpert, F.; Richter, A.S.; Heyne, S.; Dündar, F.; Manke, T. deepTools2: A next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W160–W165. [CrossRef] [PubMed]
43. Quinlan, A.R.; Hall, I.M. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 841–842. [CrossRef] [PubMed]
44. Balsa-Canto, E.; Henriques, D.; Gabor, A.; Banga, J.R. AMIGO2, a toolbox for dynamic modeling, optimization and control in systems biology. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 3357–3359. [CrossRef] [PubMed]
45. Trapnell, C.; Williams, B.A.; Pertea, G.; Mortazavi, A.; Kwan, G.; Van Baren, M.J.; Salzberg, S.L.; Wold, B.J.; Pachter, L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 511–515. [CrossRef] [PubMed]



Article

BRG1 Activates Proliferation and Transcription of Cell Cycle-Dependent Genes in Breast Cancer Cells

Maciej Sobczak ¹, Julita Pietrzak ¹, Tomasz Płoszaj ² and Agnieszka Robaszkiewicz ^{1,*} 

¹ Department of General Biophysics, Institute of Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland; maciej.sobczak@unilodz.eu (M.S.); julita.pietrzak@unilodz.eu (J.P.)

² Department of Clinical and Laboratory Genetics, Medical University of Lodz, Pomorska 251, 92-213 Lodz, Poland; tomasz.ploszaj@umed.lodz.pl

* Correspondence: agnieszka.robaszkiewicz@biol.uni.lodz.pl; Tel./Fax: +48-42-6354449

Received: 24 December 2019; Accepted: 23 January 2020; Published: 4 February 2020



Abstract: Cancer malignancy is usually characterized by unlimited self-renewal. In some types of advanced tumors that are rapidly dividing, gene expression profiles depict elevations in pro-proliferative genes accompanied by coordinately elevated transcription of factors responsible for removal of DNA lesions. In our studies, fast proliferating breast cancer cell lines (MDA-MB-231 and MCF7), BRG1, a component of the SWI/SNF complex, emerges as an activator of functionally-linked genes responsible for activities such as mitotic cell divisions and DNA repair. Products of at least some of them are considerably overrepresented in breast cancer cells and BRG1 facilitates growth of MCF7 and MDA-MB-231 cell lines. BRG1 occurs at the promoters of genes such as *CDK4*, *LIG1*, and *NEIL3*, which are transcriptionally controlled by cell cycle progression and highly acetylated by EP300 in proliferating cells. As previously documented, in dividing cells BRG1 directly activates gene transcription by evicting EP300 modified nucleosomes from the promoters and, thereby, relaxing chromatin. However, the deficiency of BRG1 or EP300 activity for 48 h leads to cell growth arrest and to chromatin compaction, but also to the assembly of RB1/HDAC1/EZH2 complexes at the studied cell cycle-dependent gene promoters. Epigenetic changes include histone deacetylation and accumulation of H3K27me trimethylation, both known to repress transcription. Cell cycle arrest in G1 by inhibition of CDK4/6 phenocopies the effect of the long-term BRG1 inhibition on the chromatin structure. These results suggest that BRG1 may control gene transcription also by promoting expression of genes responsible for cell cycle progression in the studied breast cancer cells. In the current study, we show that BRG1 binding occurs at the promoters of functionally linked genes in proliferating breast cancer cells, revealing a new mechanism by which BRG1 defines gene transcription.

Keywords: BRG1 (Brahma-Related Gene 1); EP300 (E1A Binding Protein P300); gene transcription; breast cancer epigenetics

1. Introduction

Genomic instability and deactivation of DNA repair genes are often associated with tumor-prone phenotypes and necessary for acquisition of tumor initiating mutations. However, from a certain moment of malignancy, the genetic stabilization and maintenance of genome integrity might be required in order to invade tissues and give rise to distant metastases, but the increased ability to repair DNA damage seems to depend on tumor type [1]. Transcription control and the epigenetic landscape that confers high expression of DNA repair genes in some types of malignant cells remain poorly explored. Relatively recent findings indicate that uncontrolled growth and cell division dominate tumor transcriptional programs, and that genes relevant to the removal of DNA damage correlate

with the proliferative status of the tumors [2]. Once again, direct molecular and mechanistical mutual interdependence has not been forthcoming.

Our recently published results provide evidence that transcription of some of DNA repair genes, such as *PARP1*, *BRCA1*, and *XRCC1*, is controlled by SWI/SNF in a cell cycle-dependent manner [3]. In our model of monocyte-to-macrophage differentiation promoters of DNA repair genes, characterized by the presence of CpG island and E2F motifs, were enriched in SWI/SNF-EP300-HDAC1 complexes. Macrophage differentiation that re-entered cell proliferation switched between BRM to BRG1 and HDAC1 to EP300 activity, thus it turned on gene transcription. In brief, in growth arrested monocytes EP300 remained inactive, while HDAC1 deacetylated gene promoters thereby preventing nucleosome eviction by BRM and leading to gene silencing. In proliferating macrophages, EP300 modified nucleosomes, while BRG1 served as acetylation reader and extruded acetylated histones. However, the interdependence of cell proliferation status, EP300 vs. HDAC1 and BRM vs. BRG1 activity remained unexplored.

With respect to other genes and cell types, the role of BRG1 remains ambiguous and a molecular mechanism that turns this enzyme into a gene activator or repressor has not been found. It might be linked with co-operating factors, nucleosome modifications or histone variants, which appear at a given place and time at chromatin [4–6]. Data collected for human monocytes and macrophages provided the first mechanistic insight into proliferation control of gene expression that was mediated by SWI/SNF-EP300-HDAC1 complexes assembled at E2F binding sites. E2F motifs emerged as genetic signatures of the occurrence of BRG1 in the genome. These findings prompted us to test if similar interdependence between BRG1 distribution in genome and gene overexpression occurs in cancer cells, since, in terms of cell cycle status, development of malignancies resembles differentiation of human proliferating macrophages from growth arrested monocytes.

E2F motifs mark proliferation-sensitive gene promoters, which respond to growth arrest by recruiting retinoblastoma-based repressive complexes comprising (depending on the biological circumstances) RB1, RBL1, and RBL2 as its basic components. These proteins co-occur with numerous chromatin writers and erasers, including HDACs, PRC2, DNMT1, SUV39H1, or HP1, all capable of suppressing gene transcription [7–9]. Since in the current study we observed that BRG1 promotes cell cycle progression in the breast cancer cells and that some of DNA repair genes are controlled by the cell proliferation status, we took into consideration a possible functional cross-talk between BRG1 activity, cell divisions and formation of RB1-based repressive complexes. A relatively older report noted BRG1 and RB1 co-operating physically and functionally in the human carcinoma cell line SW13 [10]; however, both proteins contributed to growth arrest. In the other study, BRG1-containing complexes were shown to control cellular proliferation by upregulation of p21 and, thereby, hypophosphorylation of pRB and repression of E2F target genes such as *CDK2*, *CCNE*, and *CCND* [11].

In the current study, we reveal additional complexity to how BRG1 can modulate E2F-dependent transcription. In our model, BRG1 occurs at E2F/CpG-positive, highly acetylated promoters of genes that are overexpressed in breast primary tumor, and two selected highly invasive breast cancer cell lines: MCF7 and MDA-MB-231. Among BRG1-enriched promoters we found genes encoding factors responsible for cancer cell proliferation and resistance to DNA damage. BRG1 dually activates their transcription: (a) directly by acting at the chromatin level and evicting acetylated nucleosomes from their promoters, and (b) indirectly by potentiating cell proliferation and preventing assembly of RB1-HDAC1-PRC2 repressive complexes at the gene promoters. The E2F binding motif at the promoters of some genes, which are functionally linked to cell proliferation and DNA repair in the studied breast cancer cells, allow BRG1-EP300 complexes to provide a common mechanism of gene transcription control.

2. Results

2.1. E2F/CpG Motifs at the Acetylated Gene Promoters Mark BRG1 Distribution in Genome of Breast Cancer Cells

To test if BRG1 may contribute to transcription regulation of genes in fast proliferating breast cancer cells, we investigated whether this enzyme co-occurs genome-wide with any particular histone mark that is known for its involvement in transcription control. For this analysis, we took publicly available data from ChIP-Seq experiments for BRG1 and selected histone modifications, and calculated Pearson correlation coefficient between their co-distribution in the genome of MDA-MB-231 cells. Genomic occurrence of BRG1 showed it was most strongly correlated with histone acetylation and H3K4me3, which are usually associated with gene promoters and active transcription (Figure 1A). Lack of reciprocity between enzyme and H3, as well as weak negative co-occurrence with H3K27me3, seem to further confirm a previously postulated mechanism, where BRG1 evicted histones from transcriptionally permissive promoters and enabled gene expression. In human macrophages, BRG1/H3K27ac-positive promoters are characterized by binding motif for E2F (indicative of likely gene dependence on cell cycle status) and/or the CpG island [3]. To test whether distribution of BRG1 is associated with similar chromatin and DNA features in proliferating breast cancer cells, MDA-MB-231, we looked for overlapping regions adjacent to TSS (± 2 kbp), which are characterized by the occurrence of BRG1, H3K27ac, E2F motifs, and CpG islands. As shown in Figure 1B and Table S1, the great majority of BRG1-rich promoters was simultaneously acetylated and featured by CpG island, while to a lower extent by E2F motif. This analysis also supported the previously postulated mutual interdependence between occurrence of BRG1 and H3K27ac at the gene promoters.

Promoters characterized by all four considered features—BRG1/H3K27ac/E2F/CpG—were associated with genes involved in key cellular processes, among them DNA repair and mitotic divisions (Figure 1C, Table S2). Analysis of differential expression of genes belonging to the two mentioned GO groups showed that substantial part of these genes was overexpressed in primary tumor and 2 cancer cell lines compared to normal cells (Figure 1D). Genes that were suppressed in cancer cells were not further repressed by SWI/SNF inhibition, suggesting that BRG1 association with acetylated promoters is insufficient under certain chromatin circumstances to ensure a high transcription rate. Among the top 50 transcription factors and chromatin remodelers that appear at the promoters of genes overexpressed in cancer cells ($\text{Log}_2\text{FC} > 0.4$), we identified enzymes EP300 and HDAC1, which we previously showed to create a functional unit with BRG1 at gene promoters in human macrophages (Figure 1E). The presence of TBP and POLR2A suggests that BRG1-based complexes may also contribute to polymerase release or pausing. POLR2A pre-initiation complexes are documented to often feature CpG-driven promoters. Since the overall majority of BRG1/H3K27ac promoters (>85%) carry CpG signature and only approximately half of them the motif for E2F, CpG islands might be considered a predictive hallmark of BRG1-dependent gene transcription. Nevertheless, chromatin-bound or signaling factors that suppress transcription from BRG1/H2K27ac promoters have yet to be identified.

To check if BRG1 creates a multi-enzyme complex with EP300 and HDAC1 in proliferating cancer cells, we searched for the latter two enzymes in BRG1 co-immunoprecipitates. As shown in Figure 1F, immunoprecipitation of BRG1 confirmed the physical interaction between the studied SWI/SNF component, acetylase and deacetylase. Furthermore, EP300 and BRG1 were also recently documented by us to create a functional and transcription regulating unit with PARP1 in MCF7 and MDA-MB-231 cells, where PARP1 poly-ADP-ribosylated and, thereby, activated EP300 [11].

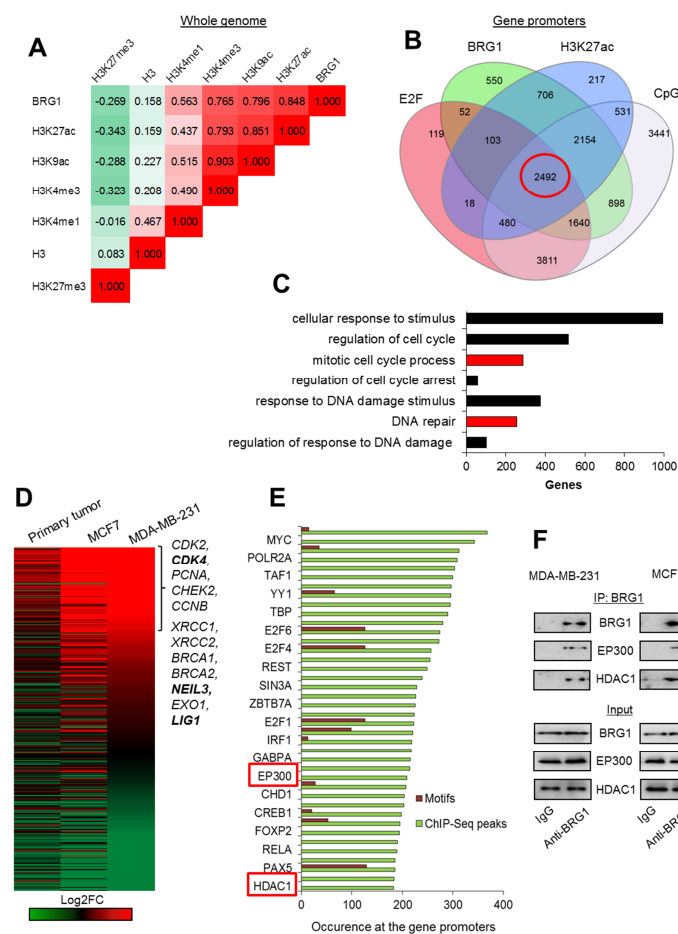


Figure 1. BRG1 occurs at the acetylated promoters of some highly transcribed genes, which control proliferation and DNA repair in breast cancer cells. (A) BRG1 co-distribution with histone H3 density and histone modifications in the genome of MDA-MB-231 is shown as Pearson's correlation coefficient. (B) Occurrence of BRG1 at the acetylated gene promoters characterized by E2F binding site and CpG island has been quantified on a Venn diagram and BRG1/H3K27ac/E2F/CpG promoters are marked in red circle. Green and blue circles represent gene promoters enriched in BRG1 and H3K27ac peaks according to MACS, while grey and red represent promoters featured by the presence of CpG islands according to cpgIslandExt and E2F binding motifs according to cpgIslandExt and wgEncodeRegTfbsClusteredV3, respectively. (C) Functional association of BRG1/H3K27ac/E2F/CpG gene promoters (marked in red circle in (B)) leads to enrichment of intracellular processes that can define cancer physiology. Red bars represent biological processes, which are taken for further analysis in (D,E). (D) Analysis of differential gene expression from data derived from RNA-Seq confirms overexpression of genes functionally assigned to the mitotic cell cycle and to responses to stimuli of DNA damage in cancer cell lines versus normal breast cells. Genes marked in bold were taken as examples for further analysis in Figure 2A–D. (E) BRG1/H3K27ac/E2F/CpG promoters of genes overexpressed in cancer cells (D): Log2FC > 0.5 for at least 2 of the cell types used are characterized by common transcription factors and chromatin remodelers. Green columns correspond to the number of ChIP-Seq peak occurrences at the gene promoters according to UCSC wgEncodeRegTfbsClusteredV3, whereas red columns represent the occurrence of transcription factor binding motifs according to tfbsConsSites. Only every other transcription factor is labeled. (F) Immunoprecipitation of BRG1 allows to detect EP300 and HDAC1 by western blot and indicates the physical interaction between SWI/SNF component and the latter two enzymes. Pictures show cropped areas of western blots. Whole images are included in Figure S3.

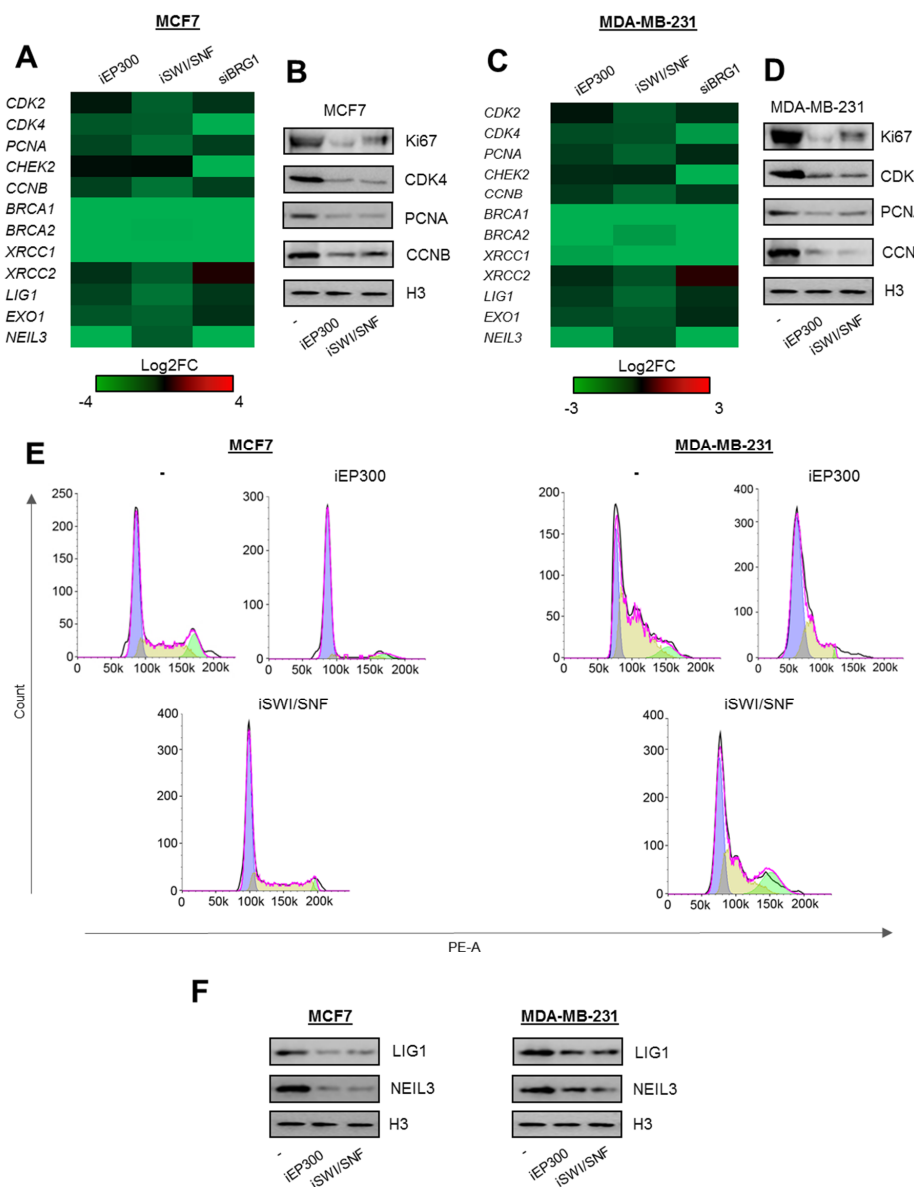


Figure 2. Proliferation and DNA repair-relevant gene promoters are controlled by BRG1 and EP300 activity in breast cancer cells. (A,C) Long-term (48 h) deficiency of BRG1 and EP300 activity limits transcription of genes encoding components of cell division and DNA repair mechanisms. The data present Log2FC of mRNA level measured by real-time PCR normalized to untreated control (iEP300 and iSWI/SNF) and non-template control (siBRG1). (B,D) Gene repression results in substantial loss of proliferation markers as seen from western blot, and by cell growth arrest in G1 phase (E). (F) Inhibition of BRG1 and EP300 similarly decreases the amount of proteins involved in removal of DNA damage. Heatmaps with long-term BRG1 and Ep300 deficiency (A,C) were prepared from four independent replicates for iEP300, and iSWI/SNF; from 3 for siBRG1. Detailed statistical analysis is presented in supplementary Table S3. Western blots in B, D, and F show representative images from three independent experiments. Pictures show cropped areas of western blots. Whole images are included in Figure S3. Analysis of the cell cycle was carried out twice in two technical replicates for each condition.

2.2. BRG1-EP300 Complexes Drive Transcription of Some Proliferation and DNA Repair Genes

To verify the possible contribution of BRG1-EP300 to transcription regulation of selected genes functionally linked to proliferation and removal of DNA damage, we treated MCF7 and MDA-MB-231

cells with inhibitors of EP300 (iEP300–C646—blocks acetyltransferase activity of EP300 and CBP), BRG1 (iSWI/SNF–PFI3 is a bromodomain inhibitor of BRG1 and BRM) and calculated Log2FC of mRNA level quantified by real-time PCR between inhibitor treated and control cells. A high transcription rate of at least some genes, which were found overexpressed in all cancer cell types according to Figure 1D, crucial for cell divisions (*CDK2*, *CDK4*, *PCNA*, *CHEK2*, *CCNB*) and removal of DNA damage (*BRCA1* and *BRCA2*, *XRCC1* and *XRCC2*, *LIG1*, *EXO1*, *NEIL3*—contribute to BER, NER, SSBR, MMR, and HR) [12,13], was simultaneously maintained by BRG1 and EP300 (Figure 2A,C). Inhibition of both enzymes led to substantial suppression of most genes studied in Figure 2A,C. Since the only commercially available inhibitor of SWI/SNF (PFI-3) also blocks the activity of BRM and BRG1, we targeted the latter enzyme with siRNA (Figure S1A–D). *XRCC2* was the only exception and was upregulated in BRG1 deficiency. Although iEP300 causes simultaneous inhibition of EP300 and CBP, the data for siEP300 (Silencer™ Select Pre-Designed siRNA ID:s534247) is missing due to the fact, that substantial EP300 silencing with siRNA induced dramatic cell death.

Repression of proliferation-relevant genes by the deficiency of BRG1 and EP300 activity led to a substantial reduction in protein proliferation markers (also others than BRG1 targets—Ki67) and to cell cycle arrest in G1 (Figure 2B,D,E). Similarly, DNA repair gene repression was followed by loss of LIG1 and NEIL3 protein upon EP300 and SWI/SNF inhibition (Figure 2F).

2.3. Cell Cycle-Dependent Chromatin Composition Controls Transcription of Proliferation and DNA Repair Genes

To study in detail the molecular mechanism of BRG1 contribution to regulation of transcription and possible functional interdependence with the cell cycle progression, we focused on three promoters of genes, which are crucial for cell proliferation—*CDK4* and effective removal of DNA lesions—*LIG1* and *NEIL3*. As shown in Figures 1B and 2A–F), all three genes are transcriptionally controlled by BRG1 and EP300. Their promoters are featured by the presence of BRG1, EP300, CpG island, and E2F motif. Especially, due to the last feature, they are likely to respond to alterations in cell proliferation status and to assemble RB1-based repressive complexes. Therefore, these promoters were chosen to study the considered cross-talk between BRG1 activity, chromatin remodeling, and cell cycle status. Furthermore, *CDK4* deficiency caused by BRG1-dependent gene repression, that in cell cultures results in cell growth arrest, can be easily phenocopied by the use of *CDK4/6* inhibitors, which equally arrest cells in G1. Thus, from this point the following hypotheses were tested: (a) BRG1/H3K27ac/CpG/E2F promoters of proliferation and DNA repair genes respond to G1 arrest with decreased gene transcription and formation of RB1-based repressive complexes; (b) long-term inhibition of BRG1-EP300 complexes that results in G1 arrest also leads to RB1-based chromatin remodeling at the studied, cell cycle-dependent promoters.

First, to test hypothesis quoted in (a) we checked whether the arrest of cell cycle progression triggered by the inhibition of cyclin-dependent kinases 4 and 6 (*CDK4* and *CDK6*) that blocks cells in G1 (Figure 3A; the same as iSWI/SNF and iEP300—Figure 2E) suppresses gene expression (Figure 3B), thereby also reducing the protein level (Figure 3C). This led to recruitment of RB1-based repressive complexes to promoters of representative genes: *CDK4*, *LIG1*, and *NEIL3* (the DNA fragment analyzed overlapped the E2F motif within the CpG island) (Figure 3D). All three regulatory regions shared two common features, an increase in H3 density and a decrease in histone acetylation that likely resulted from the switch between EP300 and HDAC1 activity. These phenocopy previously described mechanism that drives proliferation-dependent and BRG1-EP300-HDAC1-mediated chromatin transition from permissive to a compacted structure, where gain of HDAC1 activity in growth arrested cells prevents nucleosome extrusion by BRG1 due to loss of histone acetylation. Unexpectedly, G1 arrest enhances BRG1 association with 2 out of 3 studied gene promoters. However, also inhibition of THP-1 proliferation with mimosine resulted in the massive recruitment of both SWI/SNF ATPases to the promoter of *PARP1* as described in our previous study [14]. As currently we observed such an effect only for two genes, it seems to be promoter or transcription co-factor dependent, but may represent

still unknown mechanism of SWI/SNF contribution to repression of cell cycle responsive promoters under certain conditions as documented in Dunaief et al [10]. BRG1 seems to occur and act as activator of transcription by displacing acetylated histones in proliferating cells, but at some gene promoters gets further and strongly enriched upon the growth inhibition.

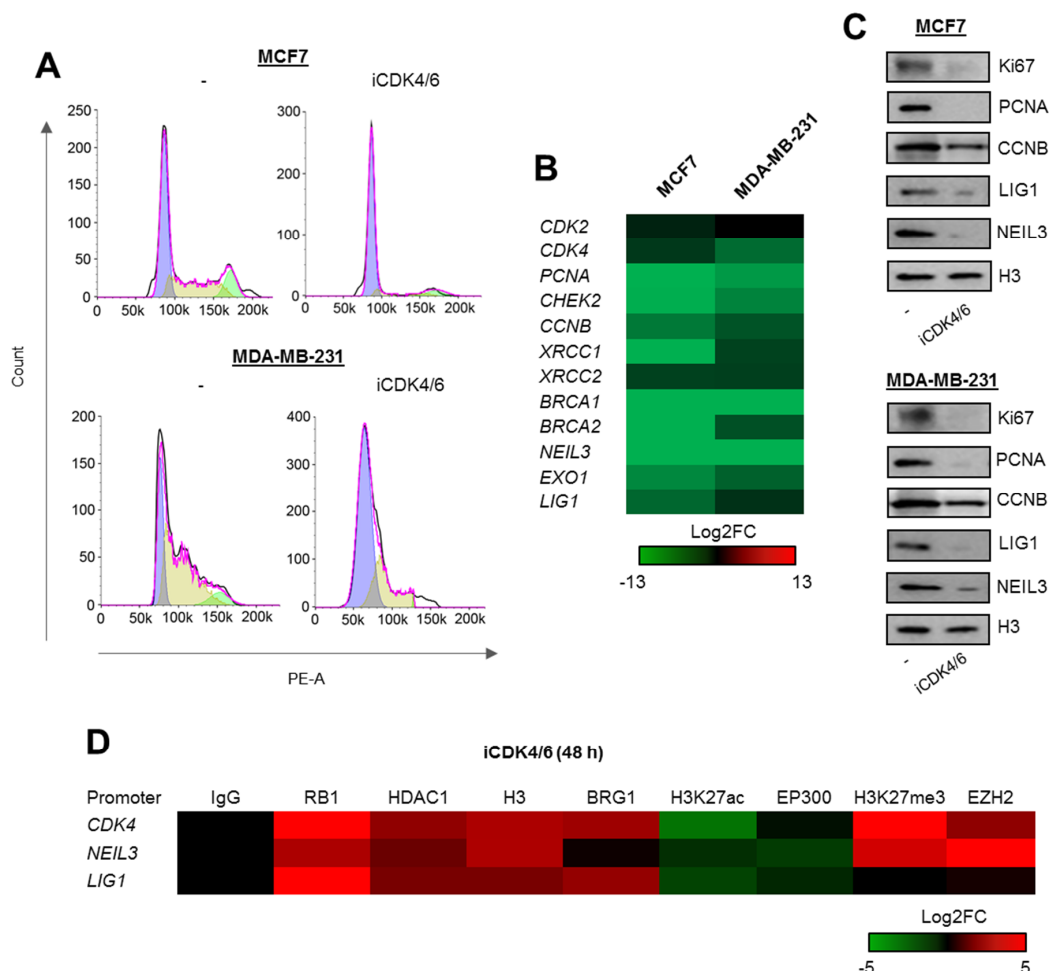


Figure 3. DNA repair genes are transcriptionally controlled by the cell cycle progression. **(A)** Deficiency of CDK4/6 activity results in complete cell cycle blockade in G1. **(B,C)** Inhibition of CDK4/6 for 48 h leads to repression of genes that drive cell cycle progression and genome resistance to damage. mRNA **(B)** shows Log2FC versus untreated) and protein **(C)** was monitored by real-time PCR and western blot in breast cancer cells exposed to iCDK4/6 for 48 h. Pictures in **(C)** show cropped areas of western blots. Whole images are included in Figure S3. **(D)** G1 arrest induces considerable chromatin remodeling and adjustment of protein composition to gene repressive conditions at the promoters of *CDK4*, *NEIL3*, and *LIG1* (ChIP/real-time PCR) 48 h after administration of iCDK4/6 in culture of MCF7 cells. Analysis of the cell cycle progression **(A)** was monitored twice in two technical replicates for each condition, quantification of gene expression in response to iCDK4/6 **(B)** and ChIP/real-time PCR analysis of *CDK4*, *NEIL3* and *LIG1* promoters **(D)** were carried out 4 times, while western blots were repeated 3 times and representative images are shown in **(C)**. Detailed statistical data can be found in Table S3.

Increase in BRG1 association with gene promoters induced by G1 arrest was followed by displacement of EP300, which may (in addition to recruitment and activation of HDAC1) further explain reduced nucleosome acetylation. The assembled repressive complex was supported by polycomb repressive complex 2 (PRC2) at the promoters of *CDK4* and *LIG1*. The enzymatically active subunit of PRC2–EZH2 catalyzed methylation of lysine 27 of histone H3, that is known to cause gene suppression. Of note, PRC2 was found only at two of these gene promoters, and did not correlate with

enrichment or extrusion of other possible components of the repressive complex. This may indicate that PRC2 targets chromatin in a promoter rather than in a RB1-dependent manner, and that the presence of RB1 is a prerequisite, but not essential, for PRC2 contribution to gene silencing.

2.4. BRG1 Couples Cell Divisions with Transcription of DNA Repair Genes

To search for a molecular mechanism that links BRG1/EP300 activity with cell cycle-dependent gene transcription, we analyzed the impact of BRG1 and EP300 on chromatin structure at the chosen gene promoters (Figure 4A). Long-term inhibition of both EP300 and SWI/SNF shown to arrest proliferating cells in G1 (Figure 2E) results in substantial chromatin remodeling, with recruitment of RB1, HDAC1, and an increase in nucleosome density. This phenomenon phenocopied the effect of iCDK4/6 inhibition on promoter composition (Figure 3D) and provides evidence that repression of genes, which potentiate cell division, leads to growth arrest-dependent modification of chromatin architecture. As expected, iEP300 reduced acetylation of histones, whereas iSWI/SNF prevented displacement of acetylated nucleosomes, thereby confirming a direct action of BRG1 associated to gene promoters. As for EP300 and BRG1, their occurrence seemed to be controlled by the type of enzyme inhibited (cell treatment with iBRG1 or iEP300) and in a promoter-dependent fashion, but the tendency for EP300 to be displaced from chromatin regardless of the inducer of cell growth arrest was also noted. Consistently to the effect of iCDK4/6, however, EZH2 was not enriched at the *LIG1* promoter, whereas it faintly methylated lysine residues at the promoters of *CDK4* and *NEIL3*.

To confirm that long-term effect of deficiency of BRG1 activity on gene transcription is mediated by BRG1 gene targets which drive cancer cell proliferation (e.g., *CDK4*, *PCNA*, *CCNB*), we checked their transcription rate and chromatin features which are representative of BRG1/EP300 proximate effects (H3 density and nucleosome acetylation), and also looked for cell cycle-related chromatin remodeling (RB1) after short-term MCF7 cell treatment with inhibitors (Figure 4B,C). Loss of BRG1 and EP300 activity immediately reduced gene transcription (Figure 4B) and induced chromatin compaction without a considerable recruitment of RB1 (Figure 4C). In a similar way to long-term deficiency in enzyme activity, decreased acetylation was only found with EP300 inhibition clearly indicates that BRG1 defines chromatin composition dually—by evicting acetylated histones (which ensures transcriptionally permissive and an open chromatin state), and by favoring cell proliferation (precludes assembly of RB1-based repressive complexes).

To check which of the two described BRG1-dependent modes of chromatin rearrangements is crucial in growth arrested cells, we restored promoter acetylation by treating growth inhibited cells with iHDAC (Figure S2). Reinstatement of nucleosome acetylation (represented by H3K27ac) was insufficient to open chromatin and re-initiate gene transcription in the presence of RB1 that remains associated with gene promoters (Figure 4D). This suggests that cell cycle status overrides the BRG1 activating effect on gene transcription during growth arrest. BRG1-driven expression of proliferation-relevant genes, which potentiates cell divisions, impacts chromatin structure in addition to direct, nucleosome eviction-relevant chromatin opening. Thus, the final chromatin composition at the studied BRG1-driven promoters is defined by cell cycle-dependent and independent aspects, where first corresponds to synthesis of drivers of mitotic divisions, while the latter to acting as a transcriptional co-factor (Figure 4E).

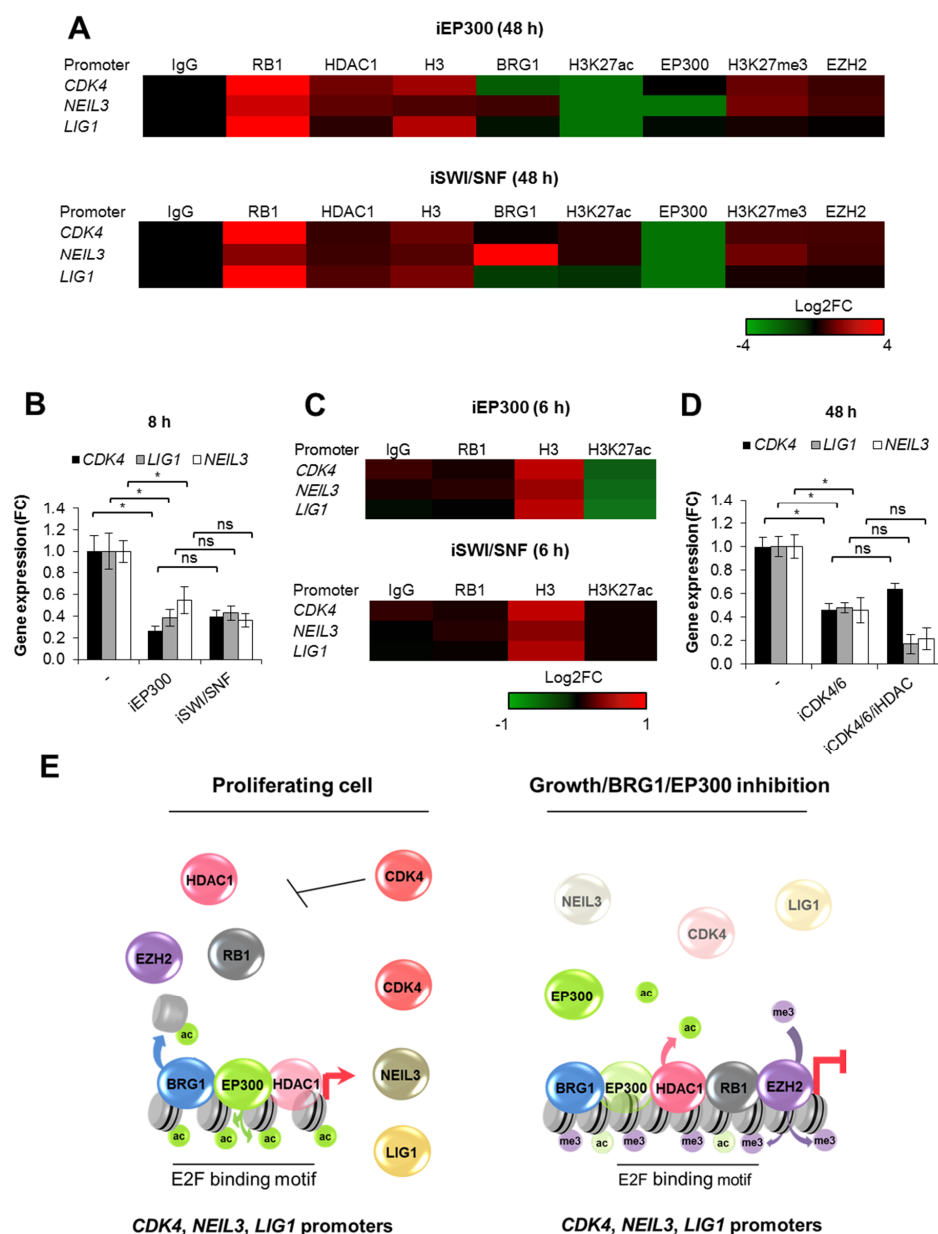


Figure 4. BRG1-dependent cell cycle progression defines chromatin composition at the promoters of DNA repair genes. (A) Long-term (48 h) deficiency of BRG1 and EP300 activity induces substantial changes in the chromatin structure, and recruitment of cell cycle-dependent repressors to the promoters of genes involved in cell proliferation and response to DNA damage (ChIP/real-time PCR). (B) Short-term (8 h) inhibition of BRG1, EP300, but not CDK4/6, results in transcription restraint (nascent RNA quantification by Click-iT chemistry), and (C) immediate chromatin closure without RB1 association with the studied gene promoters (ChIP/real-time PCR) of MCF7 cells. (D) Gene transcription (mRNA level; real-time PCR) was measured 48 h after MCF7 cell treatment with iCDK4/6. iHDAC was added 24 h prior to RNA isolation to restore chromatin acetylation. (E) Graphic representation of immediate and late chromatin response to cell growth arrest, BRG1 and EP300 inhibition. In the presented model, BRG1 and EP300 stimulate cell proliferation and, therefore, activate transcription of genes, which are transcriptionally driven by cell cycle progression. Data presented in figures (A–D) are presented as mean of four independent replicates ($n = 4$). Detailed statistical data can be found in Table S3.

3. Discussion

The SWI/SNF chromatin remodeling complex has attracted increasing attention, particularly in cancer biology due to mutations, deletions and insertions in BRG1, and in some of the SWI/SNF core subunits (e.g., SNF5, ARID1A) in ~20% of human tumors. Mutations associated with gain and loss of function, as well as fluctuation in the expression of SWI/SNF components, are linked to the occurrence of cancer and its progression in several ways [15,16]. BRG1 was initially considered as a tumor suppressor, based on, for example, premises from mouse model of primary cells, where inactivation of Brg1 and Snf5 leads to an overall decrease in nucleosome occupancy at a large number of promoters, products of which potentiate cell proliferation [17]. However, more recent data provides evidence that overexpression of some SWI/SNF subunits apparently lacking mutations can be seen as an alternative mechanism by which cellular transformation occurs [18]. As for breast cancer, analysis of the genomic data from TCGA database showed <2% mutation frequency in invasive breast carcinomas [19], whereas elevated expression of BRG1 occurred in 35% to nearly 100% of analyzed primary tumors and is responsible for the high proliferation rate; it also served as a predictive marker for patients at high risk of developing metastases [20,21]. A BRG1-dependent increase in cancer cell division was assigned to (a) upregulated expression of enzymes responsible for fatty acid and lipid biosynthesis by BRG1, which binds at the loci encoding these genes; (b) induction of ABC transporter expression, particularly in response to drug treatment; and (c) association with ER and ER-mediated transcriptional activation [18,22]. Our study also shows the genomic aspect that explains BRG1's role in breast cancer progression, where the activity of this enzyme maintains a high transcription rate of genes encoding direct drivers of cell proliferation that can act at different cellular levels—signaling cascades (*CDK2*, *CDK4*, *CCNB*—cell cycle phase progression), checkpoints (*CHEK2* responses to genome integrity assessment), DNA replication (*PCNA*—DNA clamp and scaffold for DNA polymerase) and many others listed in Table S2. BRG1 was enriched at >2500 acetylated promoters in MDA-MB-231 cells (Figure 1B); thus their functional association goes beyond proliferation and DNA repair, and comprises inter alia cellular metabolism, response to stress, and regulation of transcription from *POLR2A* (Figure 1C), i.e., all three mentioned aspects related to BRG1's role in defining the potential of cancer cells to proliferate. Another crucial feature in cancer biology that renders these cells resistant to anticancer treatment includes the abovementioned presence of ABC transporters in the membrane and DNA repair enzymes in the cytoplasm/nucleoplasm. The latter genes have been documented by us in the current paper to be transcriptionally controlled by BRG1/EP300 complexes in the breast tumors. Thus, a deficiency in BRG1 activity may make cancer cells vulnerable to drugs in two ways, by inhibiting drug efflux, and impairing the removal of DNA damage. An attempt based on BRG1 inhibition might be of particular importance in the treatment of double- or triple-negative breast cancer characterized by the absence of the estrogen receptor (ER), the progesterone receptor (PR) and low to normal levels of HER2, notably where therapeutic approaches targeting these proteins is impossible and patients can benefit only from less specifically targeted cytotoxic drugs. BRG1 functional co-operation with some nuclear receptors were already documented in relatively old reports. Human BRM/hSNF2 alpha and BRG-1/hSNF2 beta, counterparts of yeast SWI2/SNF2 and the *Drosophila* brahma, were identified as activators of estrogen and the retinoic acid receptors at the gene promoters which respond to nuclear receptors [23]. A later mechanistic study revealed that ER targets BRG-1 to the promoters of estrogen-responsive genes in a manner that occurs simultaneously to histone acetylation [24]. BRG1-mediated structural remodeling of chromatin that led to hormone-dependent transcriptional activation by nuclear receptors, was shown to operate in a collaborative manner with histone acetyltransferases such as CREB-binding protein (CBP), p300, and PCAF; this result agrees with our model of co-operation between BRG1 and EP300. These findings also pay attention to the possible use of BRG1 inhibitors or antagonists (once discovered) in the treatment of ER positive cancers in future. In another study, BRG1 suppressed prostate specific antigen (PSA) that is transcriptionally controlled by androgen receptor [25]. However, in that model, BRG1-dependent gene repression occurred under the androgen antagonists'-induced growth arrest, where prohibitin recruited BRG1 to

PSA promoter and caused eviction of EP300. Also, our study shows that enrichment of BRG1 at some gene promoters was associated with displacement of EP300 from chromatin in response to inhibition of cell proliferation with iCDK4/6, iEP300 and iBRG1. Thus, BRG1 impact on PSA expression should be also checked in dividing cells. BRG1 may act as gene activator or suppressor at the target gene promoter depending on the cell cycle status, which can possibly switch the BRG1 role from extrusion of acetylated nucleosome to insertion of their deacetylated form. Again, the molecular trigger (e.g., co-factor, mutual interdependence with BRM, posttranslational modification, element upstream of specific proximal promoter [26]) that can change the influence of the SWI/SNF complex on target gene activation remains unknown.

In the context of possible use of BRG1 inhibitors in anticancer therapies, of particular importance is our finding regarding BRG1's co-operation with EP300, since only one non-specific inhibitor of BRG1 is commercially available for scientific purposes. Due to a similar degree of repression of BRG1-dependent genes by EP300 inhibition (Figure 2A–D), such an option extends the possibility of gene targeting by a wider range of compounds. Notably, BRG1 (and perhaps EP300) inhibition might be considered as a therapeutic strategy in other cancer types because BRG1 is overexpressed in other tumor types, although limited insights into how different SWI/SNF subunits drive the development of tumors and complex nature of contribution to defining specific oncogenic pathways clearly requires further investigation [15].

Even at the genomic level, chromatin features or DNA sequence that guide BRG1 distribution and association with particular gene promoters or regulatory regions remain poorly defined. It is well acknowledged that this enzyme marks actively transcribed genes and correlates with nucleosome acetylation and trimethylation of H3K4me3, but spatiotemporal mutual interdependence between BRG1's occurrence and covalent modifications of nucleosomes are also unknown. Since in our study's SWI/SNF complexes turned out to be readers of nucleosome acetylation governed by EP300-HDAC1 balance in two distinct cell types (human macrophages and two breast cancer cell lines), one might think that BRG1 confers active gene transcription in other cancer types characterized by BRG1 overexpression.

Apart from the documented BRG1 role at gene promoters, cancer cell divisions that are transcriptionally controlled by this enzyme regulate expression of numerous functionally-related genes, which may set the phenotype of breast cancer cells. Their link with proliferation is primarily through the presence of the E2F motif, which responds to cell cycle status by recruiting or releasing retinoblastoma-based complexes. However, only ~60% of BRG1/H3K27ac/CpG/E2F-positive genes are overexpressed in fast dividing cells (Figure 1E), suggesting that promoter acetylation in proliferating cells is insufficient to activate transcription, and that unidentified co-factors of BRG1 must operate on or upstream of chromatin. In addition to promoting transcription of genes that potentiate mitotic division, BRG1 has been documented to regulate cell proliferation by co-operating with p53. This tumor suppressor, which displays growth and transformation inhibition functions, adds another link to controlling some of E2F promoters by BRG1. hSNF5 or BRG1 inhibit p53-mediated cell growth arrest and apoptosis by enhancing p53 binding to the promoter of p21—cyclin-dependent kinase inhibitor [27,28]. Such a mode of BRG1 contribution to p53-mediated cell cycle control was observed in MCF7 cells treated with doxorubicin. Recently, BRG1 was found as an activator of p53 transcription in mice embryo-derived P19 cells [29]. These findings make the entire picture of BRG1-proliferation-transcription of cell cycle-controlled genes even more complex, since it depicts BRG1 as a pathway-dependent player. In mitotic dividing cells it promotes proliferation and expression of proliferation-dependent genes, whereas upon cellular stress and p53 activation it contributes to cell growth arrest, where it was shown to repress i.a. nuclear receptor-induced gene transcription [25].

As long as the abundance of DNA repair enzymes might not be of particular importance or even antagonize cancer development, the described functional dependence of cancer cell growth on transcription of enzymes capable of removing DNA lesion might be of key importance, not only for cell protection from anticancer therapeutics, but for the maintenance of cancer cell viability and metastases since production of proliferation-associated reactive oxygen species challenges genome integrity and

might limit tumor progression. Therefore, BRG1 turns out to be considerable regulator of breast cancer cell physiology. Malignancy-relevant cell cycle re-entrance from a differentiated cell state may globally activate the desired gene expression in a unified mode due to the placement of BRG1-EP300-HDAC1 complexes at promoters that have CpG islands (>85% of BRG1/H3K27ac peaks are associated with CGIs; Figure 1B). However, such a hypothesis requires further experimental confirmation. CpG islands were thought to indicate SWI/SNF independence attributed to the assembly of CpG islands into unstable nucleosomes, but occurrence of BRG1 at the such promoters strongly suggests the possible function of this enzyme in transcription regulation of genes driven by CpG promoters. However, the molecular mechanisms that regulate transcription initiation and elongation from the paused POLR2A pre-initiation complex has not been disclosed [30].

Our study shows that BRG1 makes use of BRG1-activated proliferation promoting gene products and shifts chromatin composition towards a transcriptionally permissive state by allowing nucleosome acetylation. Modified nucleosomes can be further displaced by promoter-bound BRG1. Although BRG1 was found at repressed gene promoters together with RB1, HDAC1, and PRC2, its presence may allow immediate activation of gene transcription upon cell cycle re-entrance [7,31]. Such an idea has been postulated in the past, where BRG1's association with the promoter of osteocalcin was considered to be a mechanism that ensures re-activation of gene transcription after removal of the proliferation inhibiting factor(s) [32]. However, that paper and others lack information on any mechanistic link between particular chromatin-bound components. Our study explains at least some BRG1-relevant controversies regarding its occurrence, especially at proliferation-driven gene promoters. In dividing cells, BRG1 occurs at the E2F motifs of some cell cycle-dependent genes and, by potentiating expression of genes that promote mitotic cell divisions, BRG1 prevents silencing of their transcription.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

MCF7 and MDA-MB-231 cell lines were purchased from ATCC and Sigma Aldrich, respectively. DMEM High Glucose w/L-Glutamine w/Sodium Pyruvate, fetal bovine serum and antibiotics (penicillin and streptomycin) were from Biowest (CytoGen, Zgierz, Poland), L15 Medium, iEP300 (C646), iSWI/SNF (PFI-3), iCDK4/6 (PD0332991, palbociclib, Imbrance); anti-rabbit IgG (A0545) and anti-mouse IgG (A4416) (whole molecule)–peroxidase antibody produced in goat, BLUeye prestained protein ladder (#94964), oligonucleotides for real-time PCR were from Sigma Aldrich (Poznan, Poland). Anti-HDAC1 (PA1-860), anti-EP300 (PA1848), Lipofectamine RNAiMAX, OptiMem, Dynabeads™ Protein G, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Click-iT™ Nascent RNA Capture Kit for gene expression analysis, SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate, TRI Reagent™, Silencer™ Select Pre-Designed siRNA ID:s13141 (BRG1), RNase A were from Thermofisher Scientific (Thermofisher Scientific, Warsaw, Poland), while iCDK4/6 (PD0332991) was from Cayman Chemical (Biokom, Janki/Warsaw, Poland).

KAPA HiFi™ HotStart ReadyMix (2X) from KapaBiosystems and Takyon™ No ROX SYBR Core Kit blue dTTP from Eurogentec were purchased from Polgen (Łódź, Poland). EvaGreen® Dye, 20X in water was purchased from Biotium (Corporate Place, Hayward, CA, USA). WB antibodies: anti-BRG1 (sc-17796), anti-DNA Ligase I (sc-271678), anti-CDK4 (sc-23896), anti-NEIL3 (sc-393703), anti-PCNA (sc-56), anti-Ki-67 (sc-23900), and anti-cyclin B (CCNB; sc-166210) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (AMX, Lodz, Poland). ChIP grade antibodies: normal rabbit IgG (#2729), BRG1 (#49360), H3K27ac (#4353), anti-histone H3 (#4620), anti-RB1 (#9313), anti-H3K27me3 (#9733), anti-EZH2 (#5246) were purchased from Cell Signaling Technology (LabJOT, Warsaw, Poland).

4.2. Cell Culture and Treatment with Inhibitors

MCF7 were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, penicillin/streptomycin (50 U/mL and 50 µg/mL, respectively) in 5% CO₂, whereas MDA-MB-231 in F15 medium supplemented with

15% FBS, penicillin/streptomycin (50 U/mL and 50 µg/mL, respectively) without CO₂ equilibration. Both cell lines were maintained in a logarithmic growth phase in a culture and prior to the treatment with any compound. iEP300 (10 µM; C646), iSWI/SNF (10 µM; PFI-3) and iCDK4/6 (1 µM; PD0332991) were added to cells 48 h prior to analysis. Concentration of the studied inhibitors and the time required to induce enzyme inhibition were chosen based on our and other reports. iEP300 and iCDK4/6 at the doses higher than tested induced dramatic cell death in response to longer incubation periods.

4.3. Quantification of Gene Expression

For mRNA quantification the total RNA was extracted with TRI Reagent™, reverse transcribed with High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit and selected cDNA fragments were amplified in real-time PCR (Taqyon, Eurogentec; CFX96 C1000 Touch, BioRad Warsaw, Poland) using the following primer pairs: *CDK2*, 5'-CAGGATGTGACCAAGCCAGT-3' (forward) and 5'-TGAGTCCAAATAGCCCAAGG-3' (reverse); *CDK4*, 5'-CTGGTGTGTTGAGCATGTAGACC-3' (forward) and 5'-AAACTGGCGCATCAGATCCTT-3' (reverse); *XRCC2*, 5'-TCGCCTGGTTCTTTTTCG A-3' (forward) and 5'-TCTGATGAGCTCGAGGCTTTC-3' (reverse); *BRCA2*, 5'-CTTGCCCCCTTTCG TCTATTTG-3' (forward) and 5'-TACGGCCCTGAAGTACAGTCT-3' (reverse); *LIG1*, 5'-CAGAGGG CGAGTTTGTCTTC-3' (forward) and 5'-AGCCAGTTGTGCGATCTCTT-3' (reverse); *EXO1*, 5'-AAAC CTGAATGTGGCCGTGT-3' (forward) and 5'-CCTCA TTCCCAAACAGGGACT-3' (reverse); *NEIL3*, 5'-GGTCTCCACCCAGCTGTAAAG-3' (forward) and 5'-CACGTATCATTTTCATGAGGTGATG-3' (reverse); *PCNA*, 5'-TCTGAGGGCTTCGACACCTA-3' (forward) and 5'-TTCTCCTGGTTTGCTGCTT CA-3' (reverse); *CHEK2*, 5'-CAGGTTCTAGCCCAGCCTTC-3' (forward) and 5'-ACGGAGTTC ACAACACAGCA-3' (reverse); *CCNB1*, 5'-TGGAGAGGTTGATGTCGAGC-3' (forward) and 5'-AAGC AAAAAGCTCCTGCTGC-3' (reverse); *BRG1*, 5'-AAGAAGACTGAGCCCCGACATTC-3' (forward) and 5'-CCGTTACTGCTAAGGCCTATGC-3' (reverse); *BRCA1*, 5'-TGCCCACAGATCAACTGGAA-3' (forward) and 5'-CACAGGTGCCTCACACATCT-3' (reverse); *XRCC1*, 5'-CGGCGGAAACTCATCC GATA-3' (forward) and 5'-CCATCAGGGCCTCCTCAAAG-3' (reverse); *ACTB*, 5'-TGGCACCCAGCA CAATGAA-3' (forward) and 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3' (reverse). GAPDH and B2M were from Human Toll-like Receptor Signaling Primer Library (HTLR-I). *ACTB*, GAPDH, and B2M (*HSKG*) were used for normalization. Data in figures are shown as Log₂FC with respect to untreated control.

Nascent *CDK4*, *NEIL3*, and *LIG1* mRNA were measured 8 h after cell treatment with iEP300 and iSWI/SNF using Click-iT® Nascent RNA Capture Kit as described previously and was normalized to *ACTB* [33].

For protein detection cell lysates were separated with SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and stained overnight with primary antibodies (1.5:10,000) at 4 °C. After staining with HRP-conjugated secondary antibodies (1:10,000; room temperature; 2 h), the signal was developed using SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate and acquired with ChemiDoc-IT2 (UVP, Meranco, Poznan, Poland).

4.4. Evaluation of Cell Proliferation

Cell cycle progression in MCF7 and MDA-MB-231 cells treated with iCDK4/6, iEP300 and iSWI/SNF for 48 h was analyzed by flow cytometry as described previously [3]. Additionally, protein level of Ki67, PCNA and CCNB was monitored in cell lysates by western blot.

4.5. Chromatin Immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitation was carried out according to the protocol previously described [12,19]. Fragments spanning *BRG1*/H3K27ac/E2F/CpG sites in selected gene promoters were amplified using KAPA HiFi™ HotStart ReadyMix supplemented with EvaGreen® Dye and 4% DMSO and the following primers: *CDK4* prom, 5'-ATAACCAGCTCGCGAAACGA-3' and 5'-AGAGCAATGTCAAGCGGTCA-3', *LIG1* prom, 5'-AACACACTCAGATCCGCCAG-3'

and 5'-GCTTCCACCGATTCCTCCTC-3', *NEIL3* prom, 5'-GTAGGGAGCGACCTCAACAG-3' and 5'-AGTACAGCCTGGTCTTCCA-3'.

4.6. Transient Gene Silencing

For BRG1 silencing MCF7 and MCD-MB-23 were seeded at the density of 100,000 cells per well and transfected on the following day with RNAiMAX-siRNA complexes prepared in OptiMem according to the following ratio: 20 nmol siRNA and 3 μ L of transfection reagent. BRG1 silencing versus non-template control siRNA was confirmed by real-time PCR and western blot 48 h after cell transfection.

4.7. ChIP-Seq Analysis in Galaxy Version 19.05.dev

Publically available, generated by other groups and deposited in the PubMed Central Database data from MDA-MB-231 cells were taken for ChIP-Seq analysis in Galaxy Version 19.05.dev [34]: BRG1—GSM1856026 (SRR2171350), GSM1856027 (SRR2171351) and GSM1856028 (SRR2171352), H3K27ac—GSM1855991 (SRR2171311) and GSM1855992 (SRR2171312); H3K4me3—GSM1700392 (SRR2044734), H3K4me1—GSM2036932 (SRR3096750 and SRR3096751), H3K27me3—GSM949581 (SRR513994), H3K9ac—GSM1619765 (SRR1820123 and SRR1820124), H3—GSM2531568 (SRR5332805), Input—GSM1964894 (SRR2976843). FASTQ quality formats were unified to sanger formatted with FASTQ Groomer [35]. Reads were aligned to Human Genome version 19 using Map with Bowtie for Illumina and unmapped reads were filtered out [36]. ChIP-seq peaks were called in MACS with P value cutoff for peak detection set at 10^{-3} [14].

Co-distribution of BRG1 and selected histone modifications in the whole genome was studied by MultiBamSummary/plotCorrelation [37]. In brief, bam files with mapped reads for BRG1 and all studied histone modifications were taken as samples and the genome coverage was computed for equally sized bins (bin size in bp = 1000). For the heatmap in Figure 1A matrix file was generated from the MultiBamSummary tool and Pearson correlation was calculated.

Gene promoters enriched in BRG1, H3K27ac, CpG islands, and E2F were identified by returning intersects of recalled peaks and genomic regions ± 2000 bp centered on TSS (overlapping intervals of both datasets) [38]. Genomic intervals for E2F1, E2F4, and CpG Islands were taken from UCSC Main tables wgEncodeRegTfbsClusteredV3 and cpGIslandExt, respectively. Venn diagrams were created in <http://www.interactivenn.net/> from gene lists. Annotation of differentially expressed genes to gene ontology terms was carried out in GOrilla (using two unranked lists of genes and complete list of genes expressed in MDA-MB-231 as a background).

The following data from normal breast, primary tumor, MCF7 and MDA-MB-231 cells were taken for RNA-Seq analysis: normal breast—GSM1695870 (SRR2040339), GSM1695872 (SRR2040341), GSM1695873 (SRR2040342), GSM1695874 (SRR2040343), GSM1695877 (SRR2040346), GSM1695878 (SRR2040347); primary tumor—GSM1695891 (SRR2040360), GSM1695898 (SRR2040367), GSM1695899 (SRR2040368), GSM1695882 (SRR2040351), GSM1695890 (SRR2040359), GSM1695894 (SRR2040363); MCF7—GSM2422725 (SRR5094305), GSM2422726 (SRR5094306), GSM2422727 (SRR5094307), GSM2422728 (SRR5094308), GSM2422729 (SRR5094309), GSM2422730 (SRR5094310); MDA-MB-231 - GSM2422731 (SRR5094311), GSM2422732 (SRR5094312), GSM2422733 (SRR5094313), GSM2422734 (SRR5094314), GSM2422735 (SRR5094315), GSM2422736 (SRR5094316).

Having FASTQ quality formats unified to sanger formatted with FASTQ Groomer reads were mapped to Human Genome version 19 using TopHat [39]. Transcripts were assembled with Cufflinks (using UCSC Known Gene as a reference annotation) and merged with Cuffmerge [40]. Differential gene expression in cancer versus normal breast cells was calculated with Cuffdiff and shown as heatmap for two selected GOs (mitotic cell cycle process and DNA repair). Frequencies of transcription factors and chromatin remodelers occurrence at the promoters of genes that were overexpressed in all three cancer cell types ($\text{Log}_2\text{FC} > 0.5$) were scored based on results of bedtools Intersect intervals

(gene promoters spanning 2 kbp from TSS and UCSC Main tables wgEncodeRegTfbsClusteredV3 and tfbsConsSites) [38].

4.8. Statistical Analysis

Data in Table S3 are shown as mean $\pm$ standard deviation of the mean (SEM). Student's *t*-test was used to determine statistically significant differences between two means (marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$), while one-way analysis of variance (ANOVA) was carried out in GraphPad Prism 5 to compare means in several groups (marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, *** when $p < 0.001$).

5. Conclusions

Summarizing, activity of one chromatin-associated enzyme defines the expression profile of numerous genes in breast cancer cells by acting directly on chromatin, and by promoting cell cycle progression. BRG1 removes acetylated nucleosomes, thereby facilitating transcription and preventing recruitment of retinoblastoma-based repressive complexes to E2F-driven promoters. Thus, BRG1 defines key breast cancer features in the cell lines we have investigated. Inhibitors of BRG1 and EP300 can be considered as future anticancer drugs that can arrest cell growth and/or render them sensitive to DNA damaging agents.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/2/349/s1>, Figure S1: Efficiency of BRG1 silencing; Figure S2: Effect of HDAC inhibitor on gene promoters in G1 arrested cells; Figure S3: Whole western blot images; Table S1: BRG1 and H3K27ac distribution at the E2F/CpG positive gene promoters; Table S2: Gene ontology; Table S3: Statistical analysis.

Author Contributions: Conceptualization: A.R.; Project administration: A.R.; Supervision: A.R.; Resources: A.R.; Investigation: M.S., J.P., T.P. and A.R.; Data curation: M.S., J.P., T.P. and A.R.; Methodology: A.R.; Validation: T.P.; Writing—original draft: A.R.; Writing—review and editing: M.S., J.P. and T.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was financed by Polish National Science Centre [grant number DEC-2013/11/D/NZ2/00033]. AR is supported by Polish Ministry of Science and Higher Education (776/STYP/11/2016).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Broustas, C.G.; Lieberman, H.B. DNA damage response genes and the development of cancer metastasis. *Radiat. Res.* **2014**, *181*, 111–130. [CrossRef] [PubMed]
2. Selfors, L.M.; Stover, D.G.; Harris, I.S.; Brugge, J.S.; Coloff, J.L. Identification of cancer genes that are independent of dominant proliferation and lineage programs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E11276–E11284. [CrossRef] [PubMed]
3. Pietrzak, J.; Ploszaj, T.; Pulaski, L.; Robaszkiewicz, A. EP300-HDAC1-SWI/SNF functional unit defines transcription of some DNA repair enzymes during differentiation of human macrophages. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* **2019**, *1862*, 198–208. [CrossRef] [PubMed]
4. Aras, S.; Saladi, S.V.; Basuroy, T.; Marathe, H.G.; Lores, P.; de la Serna, I.L. BAF60A mediates interactions between the microphthalmia-associated transcription factor and the BRG1-containing SWI/SNF complex during melanocyte differentiation. *J. Cell Physiol.* **2019**, *234*, 11780–11791. [CrossRef] [PubMed]
5. Raab, J.R.; Runge, J.S.; Spear, C.C.; Magnuson, T. Co-regulation of transcription by BRG1 and BRM, two mutually exclusive SWI/SNF ATPase subunits. *Epigenet. Chromatin* **2017**, *10*, 62. [CrossRef]
6. Weng, X.; Yu, L.; Liang, P.; Li, L.; Dai, X.; Zhou, B.; Wu, X.; Xu, H.; Fang, M.; Chen, Q.; et al. A crosstalk between chromatin remodeling and histone H3K4 methyltransferase complexes in endothelial cells regulates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2015**, *82*, 48–58. [CrossRef]
7. Tempka, D.; Tokarz, P.; Chmielewska, K.; Kluska, M.; Pietrzak, J.; Rygielska, Z.; Virag, L.; Robaszkiewicz, A. Downregulation of PARP1 transcription by CDK4/6 inhibitors sensitizes human lung cancer cells to anticancer drug-induced death by impairing OGG1-dependent base excision repair. *Redox Biol.* **2018**, *15*, 316–326. [CrossRef]

8. McCabe, M.T.; Davis, J.N.; Day, M.L. Regulation of DNA methyltransferase 1 by the pRb/E2F1 pathway. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 3624–3632. [\[CrossRef\]](#)
9. Sdek, P.; Zhao, P.; Wang, Y.; Huang, C.J.; Ko, C.Y.; Butler, P.C.; Weiss, J.N.; Maclellan, W.R. Rb and p130 control cell cycle gene silencing to maintain the postmitotic phenotype in cardiac myocytes. *J. Cell Biol.* **2011**, *194*, 407–423. [\[CrossRef\]](#)
10. Dunaief, J.L.; Strober, B.E.; Guha, S.; Khavari, P.A.; Alin, K.; Luban, J.; Begemann, M.; Crabtree, G.R.; Goff, S.P. The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell* **1994**, *79*, 119–130. [\[CrossRef\]](#)
11. Sobczak, M.; Pitt, A.R.; Spickett, C.M.; Robaszkiewicz, A. PARP1 Co-Regulates EP300-BRG1-Dependent Transcription of Genes Involved in Breast Cancer Cell Proliferation and DNA Repair. *Cancers* **2019**, *11*, 1539. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Chun, J.; Buechelmaier, E.S.; Powell, S.N. Rad51 paralog complexes BCDX2 and CX3 act at different stages in the BRCA1-BRCA2-dependent homologous recombination pathway. *Mol. Cell Biol.* **2013**, *33*, 387–395. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Christmann, M.; Kaina, B. Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: Trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 8403–8420. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Zhang, Y.; Liu, T.; Meyer, C.A.; Eeckhoutte, J.; Johnson, D.S.; Bernstein, B.E.; Nusbaum, C.; Myers, R.M.; Brown, M.; Li, W.; et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* **2008**, *9*, R137. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Orlando, K.A.; Nguyen, V.; Raab, J.R.; Walhart, T.; Weissman, B.E. Remodeling the cancer epigenome: Mutations in the SWI/SNF complex offer new therapeutic opportunities. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2019**, *19*, 375–391. [\[CrossRef\]](#)
16. Takao, C.; Morikawa, A.; Ohkubo, H.; Kito, Y.; Saigo, C.; Sakuratani, T.; Futamura, M.; Takeuchi, T.; Yoshida, K. Downregulation of ARID1A, a component of the SWI/SNF chromatin remodeling complex, in breast cancer. *J. Cancer* **2017**, *8*, 1–8. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Tolstorukov, M.Y.; Sansam, C.G.; Lu, P.; Koellhoffer, E.C.; Helming, K.C.; Alver, B.H.; Tillman, E.J.; Evans, J.A.; Wilson, B.G.; Park, P.J.; et al. Swi/Snf chromatin remodeling/tumor suppressor complex establishes nucleosome occupancy at target promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 10165–10170. [\[CrossRef\]](#)
18. Wu, Q.; Lian, J.B.; Stein, J.L.; Stein, G.S.; Nickerson, J.A.; Imbalzano, A.N. The BRG1 ATPase of human SWI/SNF chromatin remodeling enzymes as a driver of cancer. *Epigenomics* **2017**, *9*, 919–931. [\[CrossRef\]](#)
19. Marquez, S.B.; Thompson, K.W.; Lu, L.; Reisman, D. Beyond Mutations: Additional Mechanisms and Implications of SWI/SNF Complex Inactivation. *Front. Oncol.* **2014**, *4*, 372. [\[CrossRef\]](#)
20. Wu, Q.; Madany, P.; Akech, J.; Dobson, J.R.; Douthwright, S.; Browne, G.; Colby, J.L.; Winter, G.E.; Bradner, J.E.; Pratap, J.; et al. The SWI/SNF ATPases Are Required for Triple Negative Breast Cancer Cell Proliferation. *J. Cell Physiol.* **2015**, *230*, 2683–2694. [\[CrossRef\]](#)
21. Do, S.I.; Yoon, G.; Kim, H.S.; Kim, K.; Lee, H.; Do, I.G.; Kim, D.H.; Chae, S.W.; Sohn, J.H. Increased Brahma-related Gene 1 Expression Predicts Distant Metastasis and Shorter Survival in Patients with Invasive Ductal Carcinoma of the Breast. *Anticancer Res.* **2016**, *36*, 4873–4882. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Wu, Q.; Sharma, S.; Cui, H.; LeBlanc, S.E.; Zhang, H.; Muthuswami, R.; Nickerson, J.A.; Imbalzano, A.N. Targeting the chromatin remodeling enzyme BRG1 increases the efficacy of chemotherapy drugs in breast cancer cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 27158–27175. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Chiba, H.; Muramatsu, M.; Nomoto, A.; Kato, H. Two human homologues of *Saccharomyces cerevisiae* SWI2/SNF2 and *Drosophila* brahma are transcriptional coactivators cooperating with the estrogen receptor and the retinoic acid receptor. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 1815–1820. [\[CrossRef\]](#)
24. DiRenzo, J.; Shang, Y.; Phelan, M.; Sif, S.; Myers, M.; Kingston, R.; Brown, M. BRG-1 is recruited to estrogen-responsive promoters and cooperates with factors involved in histone acetylation. *Mol. Cell Biol.* **2000**, *20*, 7541–7549. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Dai, Y.; Ngo, D.; Jacob, J.; Forman, L.W.; Faller, D.V. Prohibitin and the SWI/SNF ATPase subunit BRG1 are required for effective androgen antagonist-mediated transcriptional repression of androgen receptor-regulated genes. *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 1725–1733. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Marshall, T.W.; Link, K.A.; Petre-Draviam, C.E.; Knudsen, K.E. Differential requirement of SWI/SNF for androgen receptor activity. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 30605–30613. [\[CrossRef\]](#)

27. Xu, Y.; Zhang, J.; Chen, X. The activity of p53 is differentially regulated by Brm- and Brg1-containing SWI/SNF chromatin remodeling complexes. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 37429–37435. [\[CrossRef\]](#)
28. Lee, D.; Kim, J.W.; Seo, T.; Hwang, S.G.; Choi, E.J.; Choe, J. SWI/SNF complex interacts with tumor suppressor p53 and is necessary for the activation of p53-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 22330–22337. [\[CrossRef\]](#)
29. Singh, A.P.; Foley, J.F.; Rubino, M.; Boyle, M.C.; Tandon, A.; Shah, R.; Archer, T.K. Brg1 Enables Rapid Growth of the Early Embryo by Suppressing Genes That Regulate Apoptosis and Cell Growth Arrest. *Mol. Cell Biol.* **2016**, *36*, 1990–2010. [\[CrossRef\]](#)
30. Ramirez-Carrozzi, V.R.; Braas, D.; Bhatt, D.M.; Cheng, C.S.; Hong, C.; Doty, K.R.; Black, J.C.; Hoffmann, A.; Carey, M.; Smale, S.T. A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling. *Cell* **2009**, *138*, 114–128. [\[CrossRef\]](#)
31. Wisnik, E.; Ploszaj, T.; Robaszkiewicz, A. 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.* **2017**, *7*, 9483. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Flowers, S.; Nagl, N.G., Jr.; Beck, G.R., Jr.; Moran, E. Antagonistic roles for BRM and BRG1 SWI/SNF complexes in differentiation. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 10067–10075. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Tokarz, P.; Ploszaj, T.; Regdon, Z.; Virag, L.; Robaszkiewicz, A. PARP1-LSD1 functional interplay controls transcription of SOD2 that protects human pro-inflammatory macrophages from death under an oxidative condition. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *131*, 218–224. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Afgan, E.; Baker, D.; Batut, B.; van den Beek, M.; Bouvier, D.; Cech, M.; Chilton, J.; Clements, D.; Coraor, N.; Gruning, B.A.; et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W537–W544. [\[CrossRef\]](#)
35. Blankenberg, D.; Gordon, A.; Von Kuster, G.; Coraor, N.; Taylor, J.; Nekrutenko, A.; Galaxy, T. Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 1783–1785. [\[CrossRef\]](#)
36. Langmead, B.; Trapnell, C.; Pop, M.; Salzberg, S.L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* **2009**, *10*, R25. [\[CrossRef\]](#)
37. Ramirez, F.; Ryan, D.P.; Gruning, B.; Bhardwaj, V.; Kilpert, F.; Richter, A.S.; Heyne, S.; Dundar, F.; Manke, T. deepTools2: A next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W160–W165. [\[CrossRef\]](#)
38. Quinlan, A.R.; Hall, I.M. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 841–842. [\[CrossRef\]](#)
39. Kim, D.; Pertea, G.; Trapnell, C.; Pimentel, H.; Kelley, R.; Salzberg, S.L. TopHat2: Accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* **2013**, *14*, R36. [\[CrossRef\]](#)
40. Trapnell, C.; Williams, B.A.; Pertea, G.; Mortazavi, A.; Kwan, G.; van Baren, M.J.; Salzberg, S.L.; Wold, B.J.; Pachter, L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 511–515. [\[CrossRef\]](#)



Udział kompleksów SWI/SNF opartych na aktywności BRG1 w determinowaniu fenotypu komórek nowotworowych

Maciej Sobczak,

Magdalena Strachowska,

Agnieszka Robaszkiewicz✉

Katedra Biofizyki Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

https://doi.org/10.18388/pb.2020_312

✉ autor korespondujący: agnieszka.robaszkiewicz@biol.uni.lodz.pl

Słowa kluczowe: związany z Brahma gen 1 (BRG1), regulowanie transkrypcji genów, epigenetyka, nowotwory

Wykaz stosowanych skrótów: BRK – domena BRM i KIS (ang. *BRM and KIS*), COMPASS – kompleks białek związanych z metylotransferazą Set1 (ang. *Complex Proteins Associated with Set1*), CpG – regiony chromatyny bogate w cytozynę (C) i guaninę (G), DEXHc – domena helikazy zawierająca motyw DEXH (ang. *DEXH-box Helicase*), HELICc – domena charakterystyczna dla superrodziny helikaz (ang. *Helicase Superfamily C-Terminal Domain*), QLQ – domena zawierająca motyw Glutamina (Q) – Leucyna (L) – Glutamina (Q), TCGA – baza danych zawierająca dane kliniczne pacjentów chorych na nowotwory (ang. *The Cancer Genome Atlas*)

STRESZCZENIE

ATP-zależne kompleksy remodelujące chromatynę stanowią ważny element epigenetycznego mechanizmu regulującego transkrypcję. Posiadają one zdolność do wstawiania, usuwania i przesuwania nukleosomów w obrębie elementów regulatorowych genów kontrolując w ten sposób dostępność DNA dla maszyneryi transkrypcyjnej. Jednym z czterech zidentyfikowanych i opisanych dotychczas kompleksów jest SWI/SNF, w którym enzymatycznymi „motorami” są białka BRM i BRG1. Rosnąca liczba opublikowanych prac wskazuje na udział BRG1 w patofizjologii niektórych typów nowotworów, ponieważ aktywność tego enzymu odpowiada za ekspresję genów, których produkty kontrolują proliferację, naprawę DNA, transport przez błony czy metabolizm. Inhibitory BRG1 i enzymów, które determinują aktywność BRG1 lub znakują histony mające ulec przemieszczeniu mogą stać się w przyszłości alternatywą dla obecnie stosowanych w terapiach związków hamujących wzrost guzów lub suplementem zwiększającym wrażliwość nowotworów na działanie leków przeciwnowotworowych.

WPROWADZENIE

Kompleksy remodelujące chromatynę odgrywają istotną rolę w determinowaniu fenotypu i funkcji komórek, ponieważ decydują o profilu ekspresji genów a w konsekwencji i o składzie proteomu. Obok enzymów wprowadzających i usuwających potranslacyjne modyfikacje histonów uczestniczą one w definowaniu kodu epigenetycznego i intensywności transkrypcji, gdyż warunkują gęstość nukleosomów w obrębie regionów regulatorowych genów. Wykorzystując aktywność ATPazową głównej enzymatycznej podjednostki kompleksy te wstawiają, usuwają lub przesuwają nukleosomy tym samym zacieśniając lub rozluźniając chromatynę, której struktura decyduje o przyłączaniu kolejnych podjednostek maszyneryi transkrypcyjnej do regionów regulatorowych genów. Dotychczas zidentyfikowano i opisano 4 główne, zależne od ATPazy rodziny kompleksów remodelujących chromatynę [1]: naśladujący SWI (ISWI; ang. *Imitation Switch*), helikaza wiążąca DNA o charakterze chromodomeny (CHD; ang. *Chromodomain Helicase DNA-binding*), INO80 oraz SWI/SNF (SWI, ang. *Switch*, SNF, ang. *Sucrose Non-Fermenting*). W skład wielopodjednostkowych kompleksów SWI/SNF wchodzi produkty rodziny genów SMARCA, ale kluczową rolę dla zmian struktury chromatyny odgrywają dwa enzymy o wysokim stopniu homologii: Brahma – BRM (SMARCA2) i związany z Brahma gen 1 – BRG1 (SMARCA4; ang. *Brahma-Related Gene 1*). Skład białkowy kompleksów SWI/SNF nie jest stały. Rdzeń kompleksu oprócz jednej lub obydwu ATPaz tworzą: białko typu SNF5 (SMARCB1) oraz dwa białka typu SWI3 (SMARCC1) występujące w formie dimeru. Różnorodność kompozycji pozostałych podjednostek umożliwia wysoce swoistą interakcję kompleksów z aktywatorami i represorami transkrypcji oraz rozpoznawanie poszczególnych modyfikacji histonów, co z kolei determinuje miejsce występowania kompleksów w obrębie genomu oraz kierunek lokalnej przebudowy chromatyny – jej zacieśnianie lub rozluźnianie. Kompleksom SWI/SNF przypisuje się rolę zarówno w wyciszaniu jak i aktywowaniu transkrypcji, jednak uniwersalny, decydujący o tym mechanizm pozostaje nieznan. Wynik ich działania uzależniony jest od rodzaju ATPazy, wzajemnych funkcjonalnych zależności pomiędzy nimi, składu podjednostek regulatorowych, rodzaju sekwencji promotorowej, typu komórek, ich aktualnego stanu: stopnia zróżnicowania, statusu proliferacji i aktywacji poszczególnych ścieżek sygnałowych.

Doniesienia literaturowe z ostatniej dekady jednoznacznie sugerują związek pomiędzy aktywnością BRG1 a transformacją i progresją przynajmniej niektórych typów nowotworów. Choć początkowo enzym ten uznawany był za supresora wzrostu guzów, wyniki najnowszych prac wykazały, że nasila on transkrypcję genów, których produkty odpowiedzialne są kilka ważnych cech fizjologicznych nowotworów decydujących o ich fenotypie i patofizjologii.



Rycina 1. Struktura BRG1. Fragment N-końcowy odpowiada za interakcje z innymi białkami (domeny QLQ, HSA, BRK), w tym z helikazami (HSA i BRK) i czynnikami transkrypcyjnymi (BRK). Fragment środkowy białka pełni funkcję enzymatyczną. Obecne w nim motywy DEXHc i HELICc są elementami charakterystycznymi dla helikaz, które wykorzystują hydrolizę ATP do rozplatania DNA. Ostatni fragment – C-końcowy odpowiada za oddziaływanie enzymu z DNA (motyw AT-hook – rozpoznaje rowek mniejszy w helisie DNA) oraz z nukleosomami (Bromo – bromodomena – oddziałuje z acetylowanymi i metylowanymi nukleosomami).

BRG1 – BUDOWA I FUNKCJE

Ludzkie, jądrowe białko BRG1 (Ryc. 1) składa się z trzech regionów: N-końcowego pełniącego rolę regulatorową, regionu środkowego o aktywności ATPazy oraz regionu C-końcowego, odpowiadającego za oddziaływanie z chromatyną i DNA [2]. W rejonie N-końcowym wyróżnić można domeny QLQ, HSA i BRK. Bogata w reszty proliny domena QLQ prawdopodobnie umożliwia fizyczny kontakt pomiędzy BRG1 i innymi białkami, podobnie jak domena HSA, która odpowiada za interakcję ATP-azy z innym członkiem kompleksu SWI/SNF – ARID1A. Doniesienia literaturowe sugerują, że domena BRK uczestniczy w oddziaływaniu z m.in. helikazami chromodomenowymi oraz w regulowaniu transkrypcji [3]. Ponieważ BRG1 wykorzystuje hydrolizę ATP do zmiany konformacji chromatyny – przesunięcia DNA względem nukleosomów, w literaturze enzym ten występuje również pod nazwą ATPaza-translokaza [1,4]. W obrębie regionu środkowego tego enzymu można wyróżnić dwie domeny: DEXHc i HELICc. Pierwsza z nich zawiera region wiążący ATP i ATP-zależną domenę o aktywności helikazy zdolnej do rozluźniania DNA. Druga – domena HELICc, podobnie jak DEXHc, jest obecna w wielu białkach o aktywności helikazy i służy rozluźnianiu struktury kwasów nukleinowych [2]. Dla interakcji kompleksu SWI/SNF z genomem najistotniejszy jest region znajdujący się na C-końcu, zawierający motyw wiążący DNA o strukturze haczyka (ang. *AT-hook*) i wykazujący wysoką swoistość względem regionów bogatych w adeninę oraz tyminę. Obecna w C-końcowym fragmencie bromodomena umożliwia oddziaływanie enzymu z acetylowanymi i metylowanymi (H3K4me3) resztami lizyny białek histonowych, ale również z DNA. Literatura wskazuje jednak, że domena ta nie odpowiada jedynie za wiązanie kompleksu SWI/SNF z chromatyną, lecz pełni także funkcję regulatorową [5–7]. Aktywność enzymatyczna białka BRG1 zmienia się w toku cyklu komórkowego. Wykazano, że białko Brahma u muszki owocowej, mające 74% podobieństwa do BRG1, ulega fosforylacji przez kompleksy Cyklina A/Cdk2 oraz Cyklina E/Cdk2. Identyczny mechanizm zaobserwowano w ludzkich komórkach, gdzie BRG1 fosforylowane jest przez Cyklinę E/Cdk2 [8]. Istnieją doniesienia o N-końcowej acetylacji ATPazy oraz jej oddziaływaniu z białkami SUMO (ang. *Small Ubiquitin-like Modifier*) [9], jednak rola acetylacji i sumoilacji w detereminowaniu aktywności enzymatycznej omawianego białka nie została dotychczas potwierdzona. O aktywności transkrypcyjnej BRG1 decydują pośrednio inne enzymy związane z chromatyną, które modyfikują histony

znakując w ten sposób nukleosomy, mające ulec usunięciu z danego fragmentu chromatyny.

Przez wzgląd na pełnioną funkcję istotny jest mechanizm, który umiejscawia kompleks SWI/SNF w obrębie genomu i chromatyny. Według najnowszych doniesień literaturowych BRG1 występuje w przeważającej większości sekwencji promotorowych charakteryzujących się obecnością wysp CpG. W połowie tych regionów zidentyfikowano ponadto motyw dla wiązania czynników transkrypcyjnych z rodziny E2F, które łączą aktywność transkrypcyjną genu ze statusem proliferacji komórek. W ludzkich makrofagach oraz komórkach nowotworu piersi dla CpG/E2F-dodatnich promotorów funkcjonalnie powiązanych genów opisano nową jednostkę regulatorową, w skład której wchodzi kompleks SWI/SNF oparty na aktywności BRG1 oraz enzymy – acetylotransferaza EP300 i deacetylaza HDAC1 kontrolujące stopień acetylacji histonów [10,11]. Pierwszy z nich acetyluje reszty histonowe, które w formie zmienionej zostają rozpoznane przez BRG1. Prowadzi to do usunięcia nukleosomu, rozluźnienia chromatyny i w rezultacie do zainicjowania transkrypcji. HDAC1 usuwa reszty acetylowe z reszt lizyny uniemożliwiając usunięcie nukleosomów i tym samym faworyzuje zamkniętą – nieaktywną transkrypcyjnie chromatynę [10]. W części CpG/E2F-dodatnich promotorów kontrolowanych przez układ EP300-HDAC1-BRG1 obecne jest również białko PARP1 – powszechnie znane m.in. dzięki roli jaką odgrywa w procesie naprawy uszkodzeń DNA. Przeprowadzana przez PARP1 ADP-rybozylacja EP300 warunkuje aktywność acetylazy przez co wpływa na stopień acetylacji histonów i w konsekwencji na transkrypcję genu. BRG1 również ulega ADP-rybozylacji, jednak brak tej modyfikacji nie wpływa na ekspresję genów, których aktywność jest niezależna od EP300 [12]. Kolejnym typem promotorów są te, w których BRG1 wchodzi w funkcjonalną i fizyczną interakcję z ASH2 i WDR6 – podjednostkami kompleksu białek związanych z metylotransferazą Set1 (COMPASS; ang. *Complex Proteins Associated with Set1*), który jest odpowiedzialny m.in. za wprowadzanie modyfikacji H3K4me3 [13,14]. Chociaż BRG1 jest powszechnie uważana za „czytnik” acetylowanych histonów, badania przeprowadzone dla genu *GATA4* w kardiomiocytach linii H9c2 dowodzą, że enzym ten rozpoznaje także wspomnianą wyżej trójmetylację histonu H3, która podobnie jak acetylacja związana jest z aktywnymi transkrypcyjnie promotorami [7]. Komplex SWI/SNF można znaleźć również w obrębie genów, ponieważ jest elementem niezbędnym dla

umożliwienia przemieszczania się kompleksu polimerazy 2 DNA w trakcie elongacji [15].

Pomimo licznych doniesień literaturowych w dalszym ciągu nie udało się ustalić jednego mechanizmu, który definiowałby rozmieszczenie kompleksów SWI/SNF w genomie oraz kierunek ich działania w kontekście aktywowania i wyciszania ekspresji genów. W opisanych wyżej przykładach BRG1 wykazuje działanie pro-transkrypcyjne. W pewnych warunkach działanie tego enzymu jest jednak odwrotne, a zwiększenie jego ilości w promotorach związane jest z wyciszeniem genów. Jako przykład posłużyć mogą geny takie jak *PARP1*, *CDK4* czy *LIG1*, których promotory również posiadają wyspę CpG oraz motyw dla E2F, a w odpowiedzi na zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 są miejscem tworzenia kompleksów represorów, w skład których wchodzi czynniki transkrypcyjne E2F1, białko RB1, deacetylaza HDAC1, kompleks polikomb 2 (PCR2; ang. *Polycomb Repressive Complex 2*) z metylotransferazą EZH2 i dodatkowe podjednostki kompleksu SWI/SNF, w tym także BRG1 [11,16]. Wydaje się, że przynajmniej w przypadku omawianych genów kontrolowanych przez promotory CpG/E2F-zależne aktywność transkrypcyjna BRG1 determinowana jest przez status proliferacji komórek i stopień fosorylacji białek z rodziny retinoblastoma. Stąd w szybko dzielących się komórkach BRG1 może przyczyniać się do nasilenia transkrypcji genów istotnych dla patofizjologii nowotworów, a w komórkach prawidłowych/zróżnicowanych/niedzielących się wyciszać je.

MUTACJE I ZMIANY POZIOMU BRG1 W TRANSFORMACJI NOWOTWOROWEJ

Z uwagi na opisane wyżej funkcje BRG1 jako regulatora transkrypcji, enzym ten jest stosunkowo dokładnie przebadany pod kątem potencjalnego związku jego mutacji z rozwojem nowotworów. Mutacje punktowe, insercje i delecje w obrębie genów kodujących BRG1 oraz kluczowe podjednostki kompleksu SWI/SNF – ARID1A czy SNF5 występują średnio w 20% nowotworów ludzkich. Zidentyfikowano je w nowotworach: płuc, jajników, układu pokarmowego, prostaty, a także w chłoniakach, glejakach oraz czerniakach [17]. Mogą one powodować nabywanie lub utratę funkcji białek, wpływać na poziom ich ekspresji czy aktywność enzymatyczną ATPazy [15].

Mutacje wywołujące inaktywację BRG1 obecne są w 25% linii niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC), a gen kodujący BRG1 zajmuje czwarte miejsce wśród genów najczęściej ulegających mutacjom w tym typie nowotworu [18]. Brak ekspresji BRG1/BRM u pacjentów z NSCLC skutkuje krótszym przeżyciem w porównaniu do guzów, w których ekspresja BRG1/BRM jest zachowana [19]. W wielu typach nowotworów zaobserwowano, że mutacje skutkujące utratą ekspresji BRG1 oraz BRM mogą znacząco wpływać na proliferację komórek poprzez inaktywację ścieżki sygnałowej związanej z białkami retinoblastoma – RB: RB1, RBL1 oraz RBL2, będącymi kluczowymi czynnikami kontrolującymi przebieg cyklu komórkowego. Co istotne przywrócenie ekspresji BRG1 jak i BRM skutkowało zatrzymaniem wzrostu komórek przez białka z rodziny RB [20]. Mutacje zwiększające aktywność czy prowadzące do nadekspresji BRG1

mogą również sprzyjać wzrostowi guzów, ponieważ enzym ten kontroluje transkrypcję genów odpowiedzialnych za proliferację i naprawę uszkodzeń DNA [11]. Analiza danych zdeponowanych w bazie amerykańskiego instytutu do badań nad nowotworami (TCGA; ang. *The Cancer Genome Atlas*) wykazała, że mutacje ATPazy w inwazyjnych rakach piersi dotyczyły tylko mniej niż 2% wszystkich badanych przypadków, ale nadekspresję enzymu stwierdzono już w nowotworach pierwotnych i dotyczyły one od 35% do aż 100% przypadków w zależności od badanego typu nowotworu. Wyższy poziom BRG1 zidentyfikowano w raku jajnika, piersi, płuc i bardzo często wiązał się on z gorszym rokowaniem dla chorego [21]. Fakt, że nadekspresja BRG1 prowadzi do pogorszenia prognozy potwierdzają badania przeprowadzone na pacjentach z przewodowym rakiem piersi, u których zaobserwowano mniejszą przeżywalność i krótszy czas wolny od nawrotów. Dodatkowo, nadekspresja BRG1 predysponowała do przerzutowania [22].

Również druga z ATPaz kompleksu SWI/SNF – BRM ulega mutacjom choć w odróżnieniu od BRG1 pojawiają się one znacznie rzadziej. Zmiana polega przeważnie na obniżeniu poziomu BRM. Występuje ona zwykle w nowotworach łagodnych i charakteryzujących się dobrym rokowaniem [21,23].

Kolejną podjednostką SWI/SNF, której aberracje predysponują do rozwoju nowotworów, jest ARID1A. Podobnie jak w przypadku *BRG1*, mutacje tego genu obserwowane są w wielu typach nowotworów, ale najczęściej (bo aż w 50% przypadków) dotyczą jasnokomórkowego raka jajnika, a utrata ARID1A może być jednym z pierwszych etapów jego rozwoju [23,24]. Wykazano także, że spadek poziomu ARID1A pogarsza rokowanie pacjentów z nowotworami piersi [25].

Mutacje w obrębie SNF5 są obecne w 95% guzów rhabdoidalnych – typowych dla wieku dziecięcego, które pojawiają się najczęściej w obrębie nerek i ośrodkowego układu nerwowego. W tych nowotworach mutacje genu kodującego SNF5 powodują najczęściej jego zanik w komórce [23]. Mutacje genu *PBRM1* obniżają lub całkowicie wyciszają jego ekspresję. Najczęściej spotykane są w jasnokomórkowym raku nerek, gdzie predysponują komórki do proliferacji i przerzutowania, a także wpływają na poziom cytokin: zwiększając produkcję IL-6ST i hamując wydzielanie IL-8, IL-6 i CXCL2 [26]. W niektórych guzach *PBRM* ulega nadekspresji i nasila transkrypcję genów takich jak *EpCAM*, *TGF-β*, *CDH2* warunkujących agresywność nowotworu [27].

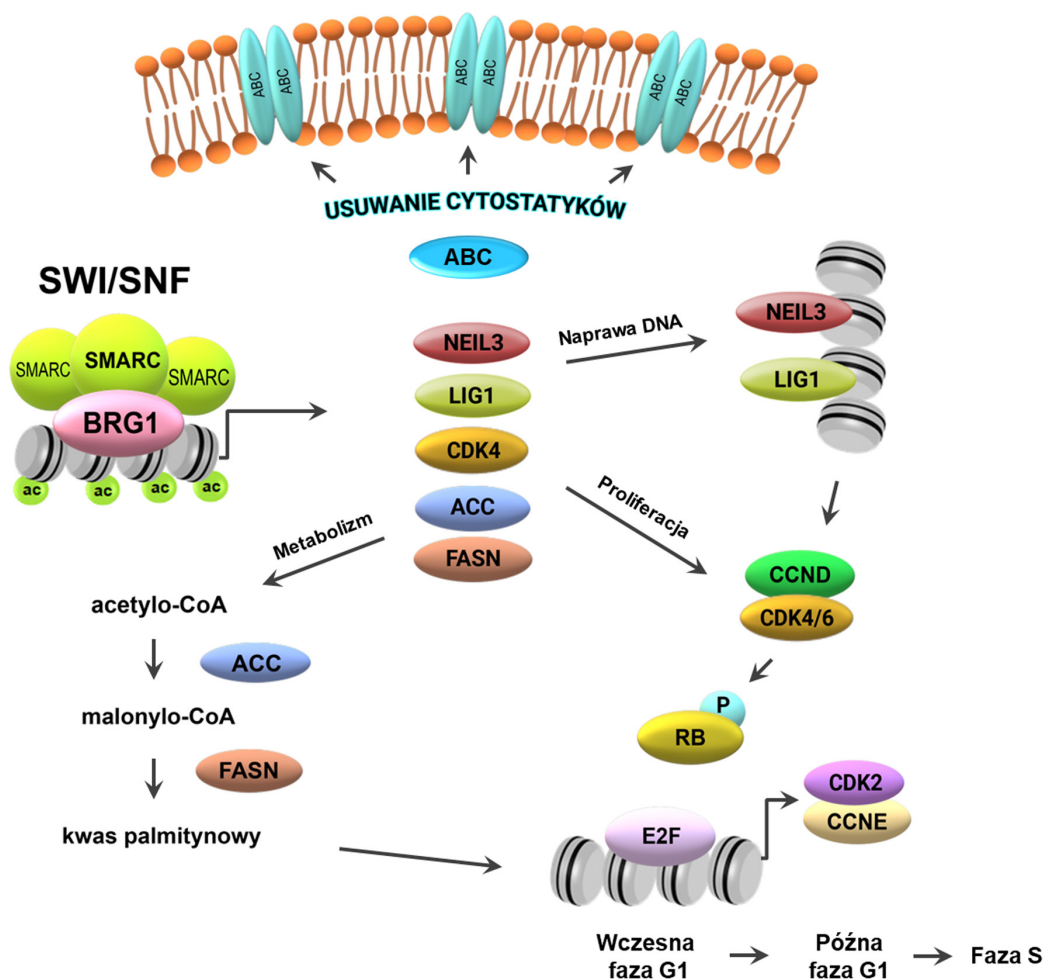
ARID2, ulega mutacjom inaktywującym w nowotworach wątroby (spowodowanych przez HPV) oraz w czerniakach [28]. W pierwszym typie utrata ARID2 powoduje zmniejszoną ekspresję interferonów kontrolowanych przez ARID2, co może prowadzić do niekontrolowanej proliferacji zarażonych wirusem komórek wątroby predysponując z kolei do rozwoju nowotworu [29].

Opisane mutacje w genach *SNF5*, *ARID1A*, *PBRM* oraz *BRM* mogą okazać się istotne dla biologicznej roli BRG1, ponieważ białka z nich powstające występują w bezpośrednim sąsiedztwie opisywanej ATPazy jako elementy komplek-

sów SWI/SNF i regulują ich aktywność transkrypcyjną. W szczególności istotne dla funkcjonowania SWI/SNF wydają się być mutacje SNF5, białka które stanowi obok ATPaz rdzeń kompleksu. W odniesieniu do interakcji z BRM, ale także obecności ważnych jednostek regulatorowych m.in. ARID1A/B i PBRM kompleksy SWI/SNF podzielić można na 2 grupy: BAF i PBAF. W pierwszej z nich BRG1 działa samodzielnie, w drugiej towarzyszy mu BRM i w kontekście transkrypcji ATPazy te zarówno współdziałają jak i wykazują działanie antagonistyczne [30]. Molekularne podstawy ich wzajemnego oddziaływania nie zostały dotychczas wyjaśnione. Towarzyszą im białka ARID1A lub ARID1B pełniące w komórkach nowotworowych rolę supresora transkrypcji zależnej od BRG1/BRM [31]. Dla przykładu, pozbawienie komórek jasnokomórkowego raka jajnika aktywności ARID1A uwalniało spauzowaną w obrębie proksymalnych promotorów polimerazę 2 RNA indukując masową ekspresję genów. Działanie kompleksów PBAF opiera się wyłącznie na aktywności BRG1, któremu zawsze towarzyszy białko PBRM uznawane za supresora transkrypcji i ARID2 łączący aktywność SWI/SNF z receptorami jądrowymi.

ROLA BRG1 W REGULOWANIU TRANSKRYPCJI W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Białko BRG1 uczestniczy w regulowaniu transkrypcji genów kluczowych dla przetrwania i wzrostu nowotworu (Ryc. 2). Zjawiska aberracji w systemach kontroli cyklu komórkowego, skutkujące omijaniem punktów kontrolnych i prowadzące do niekontrolowanych podziałów, leżą u podstaw kancerogenezy. Kluczowymi dla regulacji przebiegu cyklu komórkowego są wspomniane wcześniej białka z rodziny retinoblastoma, które oddziałują z BRG1 i mogą odpowiadać za zatrzymanie cyklu komórkowego w komórkach, nowotworu jelita grubego [32]. Ostatnio opublikowana praca opisuje udział BRG1 w pozytywnej regulacji progresji nowotworu piersi, gdzie enzym ten stymuluje ekspresję genów, których produkty odpowiedzialne są za proliferację komórek. Wśród nich wymienić można między innymi kinazy zależne od cyklin i cykliny umożliwiające przechodzenie komórek przez kolejne fazy cyklu (CDK2, CDK4, CCNB), białka punktów kontrolnych reagujące na zaburzenia integralności genomu (CHEK2) oraz białka uczestniczące w replikacji DNA, tworzące rusztowanie dla



Rycina 2. Udział BRG1 w determinowaniu wewnątrzkomórkowych procesów. Białkowe produkty genów aktywowanych przez BRG1 uczestniczą w usuwaniu cytostatyków (transportery ABC), wielu systemach naprawy DNA (NEIL3, LIG1), proliferacji (CDK4) i syntezie kwasów tłuszczowych (ACC, FASN). Fosforylacja białek retinoblastomy przez kompleksy CDK4/Cyklina D w fazie G1 uniemożliwia tworzenie RB-zależnych kompleksów represorowych w promotorach m.in. cykliny E, która niezbędna jest do przejścia z późnej fazy G1 do S. Skuteczne działanie systemów zapewniających integralność genomu gwarantuje przejście komórki przez punkty kontrolne na granicy kolejnych faz. Synteza kwasu palmitynowego zapewnia szybko dzielącej się komórce źródło energii i podtrzymuje status proliferacji. Obecność transporterów ABC w błonie chroni komórkę przed niekorzystnym działaniem toksycznych związków.

polimerazy DNA (PCNA). Na opublikowanej liście genów związanych z proliferacją, które ulegają nadekspresji w komórkach nowotworu piersi i charakteryzują się obecnością BRG1 w ich acetylowanych promotorach znajdują się również białka tworzące kinetochor, polimerazy DNA i czynniki replikacji takie jak GINS1-4 i RFC3-4. W opisanym modelu BRG1 działa dwójako: (a) bezpośrednio reguluje ekspresję genów związanych z proliferacją usuwając z ich sekwencji promotorowych acetylowane nukleosomy; (b) stymulując podziały mitotyczne zapobiega tworzeniu się represyjnych kompleksów RB1-HDAC1-EZH2 w obrębie motywów E2F na ich promotorach, uniemożliwiając tym samym zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 [11].

Geny, których produkty są elementem systemów naprawy DNA ulegają często mutacjom w nowotworach. Abberacje powodujące zaburzenia w mechanizmach odpowiedzialnych za usuwanie uszkodzeń materiału genetycznego w połączeniu z utratą kontroli na granicy kolejnych faz cyklu komórkowego są ściśle związane ze złośliwą transformacją. Chociaż niestabilność genomu jest konieczna dla zmiany komórek prawidłowych w nowotworowe to od pewnego momentu również komórki nowotworowe mogą potrzebować skutecznych systemów naprawy DNA, które zapewnią im przetrwanie w warunkach zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu i umożliwią inwazję odległych tkanek. Rola systemów naprawy DNA w progresji nowotworów pozostaje kwestią sporną i wydaje się być uzależniona od rodzaju nowotworu [33]. W nowotworze piersi, zarówno w komórkach pierwotnych jak i liniach pozyskanych z przerzutów, wyraźna jest tendencja do wzrostu poziomu ekspresji genów związanych z wieloma systemami naprawy DNA wraz ze wzrostem stopnia agresywności i tempem proliferacji komórek [11]. Transkrypcyjna kontrola i zmiany epigenetyczne zachodzące w obrębie regionów regulatorowych genów związanych z usuwaniem uszkodzeń DNA były do niedawna stosunkowo słabo opisane w literaturze. W najnowszych doniesieniach wykazano, że niekontrolowany wzrost oraz podziały mitotyczne są czynnikami determinującymi programy transkrypcyjne w nowotworach [34]. Dalsze badania przeprowadzone na komórkach nowotworu piersi powiązały transkrypcję przynajmniej części genów odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń DNA, których promotory charakteryzowały się obecnością wysp CpG i motywów dla czynników E2F, z tempem proliferacji komórek oraz z aktywnością BRG1. Wśród genów regulowanych przez opisane wcześniej funkcjonalne kompleksy składające się z EP300, HDAC1 i BRG1 wymienić można m.in. *BRCA1*, *BRCA2*, *XRCC1*, *XRCC2*, *LIG1*, *EXO1*, *NEIL3*, których produkty są ważnymi elementami szlaków naprawy przez wycinanie zasady (BER, ang. *Base Excision Repair*), naprawy poprzez wycinanie nukleotydu (NER, ang. *Nucleotide Excision Repair*), naprawy pęknięć jednoniciowych (ssBR, ang. *Single-Strand Break Repair*) i rekombinacji homologicznej (HR, ang. *Homologous Recombination* [11,35]. I podobnie jak w przypadku genów odpowiedzialnych za proliferację, nasilenie ekspresji genów związanych z usuwaniem uszkodzeń DNA jest wypadkową działania BRG1 jako inhibitora zatrzymania cyklu komórkowego oraz jego zdolności do usuwania acetylowanych przez EP300 histonów [10–12]. Na długiej liście genów ulegających nadekspresji w nowotworach piersi i związanych z ochroną materiału gene-

tycznego, których promotory wykazywały wysoki stopień acetylacji i obecność BRG1, znaleźć można również enzymy modyfikujące chromatynę i DNA, których aktywność ma na celu ułatwienie maszynierii naprawczej dostępu do uszkodzonych fragmentów genomu.

Zjawisko oporności wielolekowej (MDR, ang. *Multi-drug Resistance*) stanowi problem w leczeniu pacjentów zakwalifikowanych do chemioterapii i zmusza lekarzy do podnoszenia dawek stosowanych cytostatyków. Zwiększa to ryzyko uszkodzenia zdrowych tkanek i narządów oraz wystąpienia skutków ubocznych. Oporność wielolekowa dotyczy około 45% nowotworów pierwotnych i rośnie wraz z liczbą przeprowadzonych cykli chemioterapii [36]. Za oporność wielolekową odpowiedzialne są transportery ABC (ang. *ATP-Binding Cassette*), które w komórkach prawidłowych pełnią funkcję fizjologiczną transportując przez błony substancje odżywcze, produkty metabolizmu i leki [37]. Rodzina transporterów ABC obejmuje aż 48 białek [38]. Komórki nowotworowe m.in. jelita grubego, trzustki, jajnika, piersi, glejaki czy białaczki wykorzystują niektóre z nich m.in. ABCB1 (glikoproteina P), ABCC1 (MRP1; ang. *Multi-drug Resistance-associated Protein 1*) i ABCG2 (BCRP; ang. *Breast Cancer Resistance Protein*) do usuwania wielu grup cytostatyków [39]. Wśród leków przeciwnowotworowych będących substratami białek ABC wymienia się cisplatynę, 5-fluorouracyl i większość antracyklin, w tym najczęściej stosowaną dokсорubicynę [37,39]. Według danych literaturowych wysoka ekspresja receptorów z rodziny ABC koreluje dodatnio ze stopniem złośliwości i oporności na chemioterapeutyki a tym samym ze znacznie gorszą prognozą w grupie pacjentów ze zdiagnozowaną ostrą białaczką limfoblastyczną, nowotworem prostaty, nerek, czy płuc [40]. Stosunkowo nowe badania wykazały, że w mechanizmie powstawania oporności wielolekowej może być zaangażowane białko BRG1. W komórkach nowotworu piersi BRG1 występuje w pobliżu miejsca inicjacji transkrypcji genów kodujących transportery takie jak: ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCC11, ABCG1, determinuje poziom transkrypcji genów, a wyciszenie ATPazy powoduje akumulację leków wewnątrz komórek. Sugeruje to, że przynajmniej część BRG1-zależnych genów kodujących transportery ABC odpowiada za ochronę komórek nowotworowych przed działaniem leków.

Omawiając rolę BRG1 w determinowaniu (pato)fizjologii komórek nowotworowych należy wspomnieć o udziale tego enzymu w regulowaniu transkrypcji genów aktywowanych przez jądrowe receptory hormonozależne. Pierwsze doniesienia dotyczące tego zagadnienia pochodzą z połowy lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku, kiedy to wykazano, że ludzkie homologi drożdżowych białek SWI2 i Brahma – BRG1 i BRM, stymulowały ekspresję genów podczas koekspresji z receptorem estrogenowym czy retinoidowym w komórkach linii HepG2 [41]. Późniejsze doniesienia wykazały, że w estrogenozależnych komórkach raka piersi geny kodujące katepsynę D czy TFF1 (pS2) ulegały aktywacji w następstwie związania receptora estrogenowego wyłącznie w obecności BRG1. ATP-aza wiązała się z promotorami genów posiadających w sekwencjach promotorowych motyw wrażliwy na estrogeny (ERE; ang. *Estrogen Responsive Element*) za pośrednictwem receptora estrogenowego, gdzie

usuwała nukleosomy umożliwiając transkrypcję. Za wysoki stopień acetylacji sekwencji promotorowych badanych genów odpowiadały acetylotransferazy SRC1 oraz CBP, które podobnie jak BRG1 trafiały w miejsce docelowe w formie związanej z receptorem estrogenowym tworząc wielopodjednostkową funkcjonalną jednostkę regulatorową. Należy zwrócić uwagę na rolę BRG1-SRC1/CBP-ER-zależnych genów w progresji opisywanego typu nowotworu [42]. Wspomniana wcześniej kathepsyna D jest proteazą lizosomalną, której zadaniem jest aktywowanie prekursorów białek przez odcinanie ich fragmentów. Jej pro-nowotworowa rola polega na stymulowaniu proliferacji oraz angiogenezy. Warto nadmienić, że jej nadekspresję zaobserwowano w wielu przypadkach raka piersi i była ona związana z gorszym rokowaniem – skłonnością do przerzutowania oraz krótszym przeżyciem pacjenta [43]. Drugie z wymienionych białek – TFF1 ulega ekspresji we wszystkich tkankach zdolnych do wydzielania śluzu obecnych m.in. w układzie pokarmowym. W jelicie stymuluje naprawę uszkodzeń błony śluzowej i angiogenezę, a zwiększony poziom tego czynnika we krwi pacjentów cierpiących na raka piersi koreluje ze skłonnością do przerzutowania [44].

Kompleksy SWI/SNF umożliwiają również działanie receptora androgenowego (AR, z ang. Androgen Receptor). Wykazano, że kompleks ten jest niezbędny do aktywowania transkrypcji genu PSA (ang. *Prostate-Specific Antigen*). Badania pokazują, że większy wpływ na działanie receptora androgenowego wykazuje BRM niż BRG1, podczas gdy transkrypcja genów kontrolowanych przez receptor estrogenowy jest z podobną wydajnością aktywowana przez obydwie ATPazy [45].

W wielu nowotworach dochodzi do zwiększonej syntezy *de novo* kwasów tłuszczowych, a aktywność i ekspresja lipogennych enzymów charakteryzuje bardziej zaawansowane i złośliwe guzy. Zakłada się, że stymulacja syntezy lipidów ma pomóc nowotworom przetrwać i zachować zdolność do proliferacji w często słabo unaczynionych guzach, w których ekspansyjnej komórce nowotworowej brakuje składników odżywczych. Głównym regulatorem ekspresji większości enzymów związanych z lipogenezą jest czynnik transkrypcyjny SREBP (ang. *Sterol Regulatory Element Binding Protein*) [46]. W prawidłowych hepatocytach BRG1 odgrywa rolę epigenetycznego kofaktora czynnika SREBP1c i umożliwia transkrypcję genów, których produkty są zaangażowane w estyfikację kwasów tłuszczowych. ATPaza wchodzi w fizyczną interakcję z czynnikiem transkrypcyjnym, który transportuje ją do docelowych sekwencji promotorowych, gdzie enzym ten zmienia konformację chromatyny ułatwiając interakcję SREBP z właściwym motywem w genomie [47]. Przypomina to mechanizm opisany wyżej dla receptora estrogenowego. BRG1 reguluje ekspresję genów kodujących karboksylazę acetylo-CoA (ACC), syntazę kwasów tłuszczowych (FASN), liazę ATP-cytrynianową (ACLY), ligazę długołańcuchowych kwasów tłuszczowych-CoA 1 (ACSL1) i lipinę 1 (LPIN1). Kluczowymi dla utrzymania prawidłowej gospodarki lipidowej w nowotworach są głównie ACC i FASN. ACC odpowiada za syntezę malonylo-CoA z acetylo-CoA, natomiast FASN katalizuje syntezę kwasu palmitynowego z uzyskanego malonylo-CoA. Badania przeprowadzone na komórkach raka piersi po-

twierdziły udział BRG1 w regulowaniu ekspresji wymienionych wyżej genów, a obecność BRG1 zaobserwowano w ich sekwencjach promotorowych [48]. Ponadto, to poziom kwasu palmitynowego okazał się kluczowy dla proliferacji komórek nowotworowych. Dane te jednoznacznie potwierdzają zaangażowanie BRG1 w regulowanie metabolizmu komórek raka piersi poprzez wpływ na lipogenezę.

BRG1 JAKO POTENCJALNY CEL TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWYCH – PERSPEKTYWY I OGRANICZENIA

Jak opisano wyżej, kompleksy SWI/SNF działające w oparciu o aktywność BRG1 warunkują pewne cechy komórek nowotworowych, które są istotne dla ich szybkiego wzrostu i zapewniają oporność na działanie przynajmniej części leków stosowanych obecnie w terapiach przeciwnowotworowych. Niedawno opublikowane prace wykazały, że komórki dwóch linii nowotworu piersi pozbawione aktywności BRG1 traciły zdolność do podziałów i wzrostu, ponieważ w proliferujących komórkach enzym ten aktywował transkrypcję genów kodujących czynniki odpowiedzialne na podziały mitotyczne. Biorąc pod uwagę specyfikę promotorów tych genów, która w znacznym stopniu uzależnia ekspresję od statusu proliferacji, a w mniejszym od specyfiki tkankowej, prawdopodobne wydaje się, że BRG1 może przyczyniać się do wzrostu także innych typów nowotworów. Enzym ten może zatem posłużyć jako cel interwencji terapeutycznej pod warunkiem, że ulega on ekspresji i występuje w formie niezmienionej przez ewentualne mutacje, które mogłyby wpływać na jego aktywność lub oddziaływanie z chromatyną. Swoiste inhibitory BRG1 mogą w przyszłości posłużyć jako narzędzia do hamowania wzrostu guzów nowotworowych, co wydaje się szczególnie istotne w perspektywie ograniczania rozwoju nowotworów hormononiezależnych, gdzie zasób możliwych do zastosowania związków o niskiej toksyczności w stosunku do komórek prawidłowych jest dość mocno ograniczony. Umożliwianie ekspresji genów znajdujących się pod kontrolą receptora estrogenowego przez BRG1 sugeruje, że ograniczenie jego aktywności może stanowić alternatywę dla selektywnych modulatorów receptora estrogenowego (SERMs), które obecnie są stosowane w leczeniu nowotworów hormonozależnych. Stanowią one aż 74% wszystkich zdiagnozowanych przypadków rocznie. Wydaje się to ważne w kontekście nabywania przez komórki oporności na SERMs, co dotyczy aż jednej trzeciej przypadków nowotworów estrogenozależnych [49]. Ponadto, zahamowanie aktywności BRG1 może zwiększać wrażliwość komórek proliferujących na działanie pewnych grup leków przeciwnowotworowych, ponieważ wywołuje ono represję genów kodujących transportery błonowe usuwające substancje toksyczne oraz geny kodujące czynniki biorące udział w naprawie DNA. Stąd wyłania się możliwość wykorzystania inhibitorów BRG1 w terapiach skojarzonych, a najbardziej obiecującą w tym kontekście grupą chemioterapeutyków wydają się być antracykliny. Terapie skojarzone oparte na antracyklinach mogą wykorzystywać obydwie wymienione „słabości” komórek pozbawionych aktywności BRG1, ponieważ są jednocześnie substratami białek ABC oraz powodują uszkodzenia DNA. Leki te są obecnie szeroko stosowane w terapiach nowotworów piersi (32%), chłoniaków

(57–70%) oraz nowotworów u dzieci (50–60%). W grupie leków przeciwnowotworowych doksorubicyna uplasowała się na miejscu piątym zarówno pod względem częstości stosowania jak również kosztów leczenia ponoszonych przez Narodowy Fundusz Zdrowia. Pomimo faktu, że antracykliny są udokumentowanymi substratami białek ABC i są aktywnie usuwane z komórek nowotworowych, w dalszym ciągu ich zastosowanie w chemioterapii nie maleje. Wyciszenie BRG1 wywołuje również wzrost cytotoxyczności antymetabolitów (gemcytabiny, 5-fluorouracylu), inhibitorów mitozy (paklitakselu) i leków alkilujących (cisplatyny i cyklofosfamid).

Pomimo wymienionych przesłanek w podjęciu prób klinicznego zastosowania ograniczenia aktywności BRG1 czynnikiem limitującym jest obecność tylko jednego, komercyjnie dostępnego inhibitora tego enzymu – PFI3. Według bazy ClinicalTrials.gov nie jest on przedmiotem żadnego prowadzonego obecnie badania, brakuje zatem informacji o zarówno pozytywnych jak i ubocznych efektach jego działania. Sytuację dodatkowo komplikuje fakt, że hamuje on aktywność obydwu ATPaz występujących w kompleksach SWI/SNF – BRG1 i BRM, co wynika z wysokiej homologii obydwu enzymów. Biorąc pod uwagę złożone wzajemne relacje funkcjonalne pomiędzy dwiema ATPazami, których podłoże dotychczas nie zostało poznane, trudno przewidzieć jaki wpływ na żywotność i proliferację różnych typów nowotworów będzie mieć jednoczesna inhibicja BRG1 i BRM. Nawet swoiste hamowanie aktywności BRG1 może potencjalnie przynieść odwrotne do zamierzonych efekty, ponieważ enzym ten pełni w komórkach zarówno funkcję aktywatora transkrypcji jak i represora. Trudno zatem przewidzieć skutki przywrócenia ekspresji pewnej puli genów, która wyciszona jest przez BRG1. Należy zwrócić także uwagę na fakt, że kompleksy SWI/SNF kontrolują transkrypcję w komórkach prawidłowych, stąd ich inhibicja może nie pozostać bez wpływu na funkcjonowanie tkanek czy nawet całych narządów.

Pewnym ułatwieniem w próbach swoistej inhibicji BRG1 może okazać się fakt współpracy BRG1 z innymi enzymami remodelującymi chromatynę. Enzym ten pełni funkcję „dekodera” informacji zapisanej w kodzie epigenetycznym, więc o usunięciu nukleosomów z danej sekwencji promotorowej, a tym samym aktywowaniu lub hamowaniu ekspresji genu zależnego od aktywności BRG1, decydują inne enzymy modyfikujące histony takie jak acetylotransferazy i deacetylazy, metylotransferazy czy demetylazy oraz wiele innych. Sugeruje to, że inhibitory enzymów modyfikujących histony, charakteryzujące się zwykle stosunkowo dużą swoistością, mogą pośrednio hamować aktywność BRG1 i pełnić w pewnych przypadkach rolę swoistych inhibitorów transkrypcji genów BRG1-zależnych. W omawianym kontekście zastosowanie mogą znaleźć także inhibitory bromodomen [6,50]. Motywy te obecne są w obydwu ATP-azach SWI/SNF, ale także w wielu enzymach występujących na chromatynie, również w tych, które współpracują z BRG1. Chociaż jednoczesne zahamowanie aktywności dwóch białek odpowiedzialnych za ekspresję genu wywoła prawdopodobnie silniejszy efekt, to stosunkowo liczna grupa enzymów posiadających w swojej strukturze bromodomenę zmniejszyć może swoistość działania inhibitora.

Co istotne szczególnie w kontekście klinicznym, aktywność transkrypcyjna kompleksów EP300-BRG1 jest regulowana przez PARP1. Dotyczy to przynajmniej części genów E2F-zależnych, zawiązanych z proliferacją i naprawą DNA. Inhibitor PARP1 – olaparib w badanych liniach nowotworu piersi okazał się represorem obydwu grup genów. Można zatem przypuszczać, że zakres stosowania inhibitorów tego enzymu, które zostały dopuszczone przez amerykańską Administrację Żywności i Leków (FDA; ang. *Food and Drug Administration*) do leczenia wybranych typów nowotworów, ulegnie rozszerzeniu gdyż nadrzędną rolę w regulowaniu ekspresji przynajmniej części genów związanych z proliferacją i naprawą DNA odgrywa status proliferacji komórek. Jest zatem prawdopodobne, że PARP1, którego poziom jest wysoki w większości komórek nowotworowych, okaże się aktywatorem ekspresji genów kontrolowanych przez kompleksy EP300-BRG1 występujące na promotorach CpG/E2F-dodatnich w szerokim spektrum nowotworów. Oprócz opisanych wyżej i funkcjonalnie powiązanych genów, na długiej liście promotorów cechujących się obecnością kompleksów PARP1-EP300-BRG1 w liniach nowotworu piersi, znajdują się również te, które regulują metabolizm, sygnalizację wewnątrzkomórkową, organizację wewnątrzkomórkowych organelli, organizację DNA czy potranslacyjne modyfikacje histonów. Inhibitory PARP1 mogą znaleźć zastosowanie w wyciszaniu wielu wewnątrzkomórkowych procesów zależnych od interakcji EP300 z BRG1, które są podstawą patofizjologii nowotworów lub odpowiadają za brak wrażliwości tych komórek na działanie leków.

PODSUMOWANIE

Odkrycie molekularnego mechanizmu leżącego u podstaw udziału kompleksów SWI/SNF opartych na aktywności BRG1 w determinowaniu patofizjologii nowotworów umożliwia podjęcie prób wykorzystania w przyszłości inhibitorów BRG1 i/lub współpracujących z nim enzymów w monoterapiach lub terapiach skojarzonych do hamowania wzrostu guzów i zwiększania ich wrażliwości na działanie niektórych leków. Niskie prawdopodobieństwo uzyskania swoistego inhibitora BRG1, wynikające z jego dużego podobieństwa do BRM, pociąga za sobą uzasadnioną konieczność prowadzenia dalszych badań nad funkcjonalnymi zależnościami pomiędzy BRG1 i enzymami zaangażowanymi w definiowanie kodu epigenetycznego w celu wyłonienia związków posiadających potencjał do intencjonalnego regulowania ekspresji wybranej puli genów BRG1-zależnych.

PIŚMIENNICTWO:

1. Clapier CR, Iwasa J, Cairns BR, Peterson CL (2017) Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18: 407–422
2. Trotter KW, Archer TK (2008) The BRG1 transcriptional coregulator. *Nucl Recept Signal* 6: e004
3. Trotter KW, Fan H-Y, Ivey ML, Kingston RE, Archer TK (2008) The HSA domain of BRG1 mediates critical interactions required for glucocorticoid receptor-dependent transcriptional activation *in vivo*. *Mol Cell Biol* 28: 1413–1426
4. Vignali M, Hassan AH, Neely KE, Workman JL (2000) ATP-Dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* 20: 1899–1910

5. Tails AH, Shen W, Xu C, Huang W, Zhang J, Carlson JE, *et al.* (2007) Solution structure of human Brg1 bromodomain and its specific binding to. *Biochemistry* 46: 2100–2110
6. Morrison EA, Sanchez JC, Ronan JL, Farrell DP, Varzavand K, Johnson JK, *et al.* (2017) DNA binding drives the association of BRG1/hBRM bromodomains with nucleosomes. *Nat Commun* 8: 1–14
7. Mehta G, Kumarasamy S, Wu J, Walsh A, Liu L, Williams K, *et al.* (2017) MITF interacts with the SWI/SNF subunit, BRG1, to promote GATA4 expression in cardiac hypertrophy. *Physiol Behav* 176: 139–148
8. Shanahan F, Seghezzi W, Parry D, Mahony D, Lees E (1999) Cyclin E Associates with BAF155 and BRG1, components of the mammalian SWI-SNF complex, and alters the ability of BRG1 to induce growth arrest. *Mol Cell Biol* 19: 1460–1469
9. Consortium TU (2018) UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* 47: D506–D515
10. Pietrzak J, Płoszaj T, Pułaski Ł, Robaszkiewicz A (2019) 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: 198–208
11. Sobczak M, Pietrzak J, Płoszaj T, Robaszkiewicz A (2020) BRG1 Activates proliferation and transcription of cell cycle-dependent genes in breast cancer cells. *Cancers* 12: 1–18
12. Sobczak M, Pitt AR, Spickett CM, Robaszkiewicz A (2019) PARP1 Co-regulates EP300-BRG1-dependent transcription of genes involved in breast cancer cell proliferation and DNA repair. *Cancers* 11: 1–18
13. Brockmann D, Lehmkuhler O, Schmücker U, Esche H (2001) The histone acetyltransferase activity of PCAF cooperates with the brahma/SWI2-related protein BRG-1 in the activation of the enhancer A of the MHC class I promoter. *Gene* 277: 111–120
14. Weng X, Yu L, Liang P, Li L, Dai X, Zhou B, *et al.* (2015) A crosstalk between chromatin remodeling and histone H3K4 methyltransferase complexes in endothelial cells regulates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 82: 48–58
15. Schwabish MA, Struhl K (2007) The Swi/Snf Complex is important for histone eviction during transcriptional activation and RNA polymerase II elongation *in vivo*. *Mol Cell Biol* 27: 6987–6995
16. Wiśnik E, Płoszaj T, 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
17. Wu Q, Lian JB, Stein JL, Stein GS, Nickerson JA, Imbalzano AN (2017) The BRG1 ATPase of human SWI/SNF chromatin remodeling enzymes as a driver of cancer. *Epigenomics* 9: 919–931
18. Romero OA, Sanchez-Céspedes M (2014) The SWI/SNF genetic blockade: Effects in cell differentiation, cancer and developmental diseases. *Oncogene* 33: 2681–2689
19. Reisman DN, Sciarrotta J, Wang W, Funkhouser WK, Weissman BE (2003) Loss of BRG1/BRM in human lung cancer cell lines and primary lung cancers: Correlation with poor prognosis. *Cancer Res* 63: 560–566
20. Marquez SB, Thompson KW, Lu L, Reisman D (2014) Beyond mutations: Additional mechanisms and implications of SWI/SNF complex inactivation. *Front Oncol* 4: 1–20
21. Guerrero-Martínez JA, Reyes JC (2018) High expression of SMARCA4 or SMARCA2 is frequently associated with an opposite prognosis in cancer. *Sci Rep* 8: 1–17
22. Do SI, Yoon G, Kim HS, Kim K, Lee H, Do IG, *et al.* (2016) Increased brahma-related gene 1 expression predicts distant metastasis and shorter survival in patients with invasive ductal carcinoma of the breast. *Anticancer Res* 36: 4873–4882
23. Orlando KA, Nguyen V, Raab JR, Walhart T, Weissman BE (2019) Remodeling the cancer epigenome: mutations in the SWI/SNF complex offer new therapeutic opportunities. *Expert Rev Anticancer Ther* 19: 375–391
24. Caumanns JJ, Wisman GBA, Berns K, van der Zee AGJ, de Jong S (2018) ARID1A mutant ovarian clear cell carcinoma: A clear target for synthetic lethal strategies. *Biochim Biophys Acta – Rev Cancer* 1870: 176–184
25. Takao C, Morikawa A, Ohkubo H, Kito Y, Saigo C, Sakuratani T, *et al.* (2016) Downregulation of ARID1A, a component of the SWI/SNF chromatin remodeling complex, in breast cancer. *J Cancer* 8: 1–8
26. Wang HK, Qu YY, Dai B, Zhu Y, Shi GH, Zhu YP, *et al.* (2017) PBRM1 regulates proliferation and the cell cycle in renal cell carcinoma through a chemokine/chemokine receptor interaction pathway. *PLoS One* 12: 1–13
27. Mota STS, Vecchi L, Zóia MAP, Oliveira FM, Alves DA, Dornelas BC, *et al.* (2019) New insights into the role of polybromo-1 in prostate cancer. *Int J Mol Sci* 20: 1–16
28. Hodis E, Watson IR, Kryukov G V., Arold ST, Imielinski M, Theurillat J-P, *et al.* (2012) A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. *Cell* 150: 251–263
29. Zhao H, Wang J, Han Y, Huang Z, Ying J, Bi X, *et al.* (2011) ARID2: A new tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2: 886–891
30. Raab JR, Runge JS, Spear CC, Magnuson T (2017) Co-regulation of transcription by BRG1 and BRM, two mutually exclusive SWI/SNF ATPase subunits. *Epigenetics and Chromatin* 10: 1–15
31. Trizzino M, Barbieri E, Petravicci A, Wu S, Welsh SA, Owens TA, *et al.* (2018) The tumor suppressor ARID1A controls global transcription via pausing of RNA polymerase II. *Cell Rep* 23: 3933–3945
32. Dunaief JL, Strober BE, Guha S, Khavari PA, Alin K, Luban J, *et al.* (1994) The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell* 79: 119–130
33. Broustas CG, Lieberman HB (2014) DNA Damage response genes and the development of cancer metastasis. *Radiat Res* 181: 111–130
34. Selfors LM, Stover DG, Harris IS, Brugge JS, Coloff JL (2017) Identification of cancer genes that are independent of dominant proliferation and lineage programs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E11276–E11284
35. Christmann M, Kaina B (2013) Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: Trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucleic Acids Res* 41: 8403–8420
36. Chelamalla R (2017) Drug resistance: important criteria for cancer drug development. *Pharm Biol Eval* 4: 127–129
37. Ween MP, Armstrong MA, Oehler MK, Ricciardelli C (2015) The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance. *Crit Rev Oncol Hematol* 96: 220–256
38. Wilkens S (2015) Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep* 7: 14
39. Begicevic RR, Falasca M (2017) ABC transporters in cancer stem cells: Beyond chemoresistance. *Int J Mol Sci* 18: 2362
40. Pasello M, Giudice AM, Scotlandi K (2019) The ABC subfamily A transporters: Multifaceted players with incipient potentialities in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 60: 57–71
41. Chiba H, Muramatsu M, Nomoto A, Kato H (1994) Two human homologues of *saccharomyces cerevisiae* SWI2/SNF2 and *Drosophila brahma* are transcriptional coactivators cooperating with the estrogen receptor and the retinoic acid receptor. *Nucleic Acids Res* 22: 1815–1820
42. DiRenzo J, Shang Y, Phelan M, Sif S, Myers M, Kingston R, *et al.* (2000) BRG-1 Is recruited to estrogen-responsive promoters and cooperates with factors involved in histone acetylation. *Mol Cell Biol* 20: 7541–7549
43. Liaudet-Coopman E, Beaujouin M, Derocq D, Garcia M, Glondou-Lassis M, Laurent-Matha V, *et al.* (2006) Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Lett* 237: 167–179
44. Elnagdy MH, Farouk O, Seleem AK, Nada HA (2018) TFF1 and TFF3 mRNAs are higher in blood from breast cancer patients with metastatic disease than those without. *J Oncol* 2018: 4793498
45. Marshall TW, Link KA, Petre-Draviam CE, Knudsen KE (2003) Differential requirement of SWI/SNF for androgen receptor activity. *Journal of Biological Chemistry* 278: 30605–30613

46. Nickerson JA, Wu Q, Imbalzano AN (2017) Mammalian SWI/SNF enzymes and the epigenetics of tumor cell metabolic reprogramming. *Front Oncol* 7: 1–9
47. Li N, Li M, Hong W, Shao J, Xu H, Shimano H, *et al.* (2018) Brg1 regulates pro-lipogenic transcription by modulating SREBP activity in hepatocytes. *Biochim Biophys Acta – Mol Basis Dis* 1864: 2881–2889
48. Wu Q, Madany P, Dobson JR, Schnabl JM, Sharma S, Smith TC, *et al.* (2016) The BRG1 chromatin remodeling enzyme links cancer cell metabolism and proliferation. *Oncotarget* 7: 38270–38281
49. Carroll JS (2016) Eje prize 2016: Mechanisms of oestrogen receptor (ER) gene regulation in breast cancer. *Eur J Endocrinol* 175: R41–R49
50. Sanchez R, Meslamani J, Zhou M-M (2014) The bromodomain: From epigenome reader to druggable target. *Biochim Biophys Acta – Gene Regul Mech* 1839: 676–685

Contribution of BRG1-dependent SWI/SNF complexes to determining the phenotype of cancer cell

Maciej Sobczak, Magdalena Strachowska, Agnieszka Robaszkiewicz✉

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

✉corresponding author: agnieszka.robaszkiewicz@biol.uni.lodz.pl

Key words: Brahma-related gene 1 (BRG1), regulation of gene transcription, epigenetics, cancer

SUMMARY

ATP-dependent chromatin remodeling complexes are documented as indispensable element of epigenetic mechanisms, which control transcription. These multiprotein functional units are capable of insertion, deletion and sliding of nucleosomes at the gene regulatory elements thereby defining DNA accessibility to transcription machinery. SWI/SNF is one out of four identified and described complexes. The enzymatic role in SWI/SNF molecular “motors” is assigned to two ATP-ases: BRM and BRG1. Accumulating evidence suggests the link between BRG1 and pathophysiology of some types of cancer. BRG1 has been documented as an activator of genes encoding factors responsible for i.a. proliferation, DNA repair, transmembrane transport and metabolism. Therefore, inhibitors of BRG1 and co-operating enzymes, which modulate activity of this ATP-ase or mark histones for shuttling to/from the chromatin, may turn out as an alternative to the compounds that are currently used to suppress the growth of tumors or as supplements that increase cell vulnerability to anticancer drugs.

Article

Activation of *ABCC* Genes by Cisplatin Depends on the CoREST Occurrence at Their Promoters in A549 and MDA-MB-231 Cell Lines

Maciej Sobczak ¹, Magdalena Strachowska ^{1,2} , Karolina Gronkowska ^{1,2} and Agnieszka Robaszkiewicz ^{1,*} 

¹ Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland; maciej.sobczak@edu.uni.lodz.pl (M.S.); magdalena.strachowska@edu.uni.lodz.pl (M.S.); karolina.gronkowska@edu.uni.lodz.pl (K.G.)

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

* Correspondence: agnieszka.robaszkiewicz@biol.uni.lodz.pl; Tel.: +48-42-6354144

Simple Summary: Cisplatin resistance is a common issue that affects patients with a variety of cancers who are treated with this drug. In this research, we present a novel epigenetic mechanism that controls the expression of ABC-family transporters, which are involved in multidrug resistance. We report that the CoREST complex may be a key factor that determines the transcription of ABC transporters in non-small cell lung and triple-negative breast cancer cells (A549 and MDA-MB-231, respectively) treated with cisplatin. By occupying gene promoters, this multi-subunit repressor prevents both an EP300-dependent increase in *ABCC* transcription induced by the alkylating drug and gene overexpression in cisplatin-resistant phenotypes. Moreover, the CoREST-free promoter of *ABCC10* responds to cisplatin with EP300-mediated gene activation, which is only possible in p53-proficient cells.



Citation: Sobczak, M.; Strachowska, M.; Gronkowska, K.; Robaszkiewicz, A. Activation of *ABCC* Genes by Cisplatin Depends on the CoREST Occurrence at Their Promoters in A549 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Cancers* **2022**, *14*, 894. <https://doi.org/10.3390/cancers14040894>

Academic Editor: Aamir Ahmad

Received: 11 January 2022

Accepted: 9 February 2022

Published: 11 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Although cisplatin-based therapies are common among anticancer approaches, they are often associated with the development of cancer drug resistance. This phenomenon is, among others, caused by the overexpression of ATP-binding cassette, membrane-anchored transporters (ABC proteins), which utilize ATP to remove, e.g., chemotherapeutics from intracellular compartments. To test the possible molecular basis of increased expression of *ABCC* subfamily members in a cisplatin therapy mimicking model, we generated two cisplatin-resistant cell lines derived from non-small cell lung cancer cells (A549) and triple-negative breast cancer cells (MDA-MB-231). Analysis of data for A549 cells deposited in UCSC Genome Browser provided evidence on the negative interdependence between the occurrence of the CoREST complex at the gene promoters and the overexpression of *ABCC* genes in cisplatin-resistant lung cancer cells. Pharmacological inhibition of CoREST enzymatic subunits—LSD1 and HDACs—restored gene responsiveness to cisplatin. Overexpression of CoREST-free *ABCC10* in cisplatin-resistant phenotypes was caused by the activity of EP300 that was enriched at the *ABCC10* promoter in drug-treated cells. Cisplatin-induced and EP300-dependent transcriptional activation of *ABCC10* was only possible in the presence of p53. In summary, the CoREST complex prevents the overexpression of some multidrug resistance proteins from the *ABCC* subfamily in cancer cells exposed to cisplatin. p53-mediated activation of some *ABCC* genes by EP300 occurs once their promoters are devoid of the CoREST complex.

Keywords: CoREST; ABC-family transporters; multidrug-resistance; EP300; p53

1. Introduction

Cisplatin was approved as an anti-cancer drug in 1987; however, cisplatin-based therapies are still commonly used against a variety of malignancies such as lymphoma, lung, bladder, ovarian, cervical as well as head and neck cancers [1]. For non-small cell lung

cancer (NSCLC), cisplatin-based treatment is often the only effective approach, as 85–90% of NSCLC patients lack mutations that allow for specific attack cancer cells in targeted therapy [2]. Similarly, the lack of a molecule-specific cure for triple-negative breast cancer (TNBC) patients imposes the need to apply conventional chemotherapy. Although cisplatin is not considered a first-line treatment against TNBC, growing attention has been paid to cisplatin combinations with other agents. This drug prevents DNA replication and gene transcription by forming cross-links between alkylated DNA bases [3]. In response to DNA adducts, ATM (ataxia telangiectasia mutated) and ATR (ATM and Rad3-related) kinases undergo activation, phosphorylate CHK1/CHK2 and p53, thereby triggering death and growth inhibition of cancer cells [4]. Although this alkylating agent emerged to be effective against solid tumors, its use is often associated with the occurrence of severe side effects, including nausea, vomiting, and nephro- and ototoxicity. Moreover, the phenomenon of cisplatin resistance is a serious issue. While some cancers may be naturally resistant to this drug, others might decline their responsiveness over the course of anti-cancer treatment [5]. Loss of cell vulnerability to drugs is quite complex and involves changes in cancer cell biology at many levels. The mechanism of cisplatin resistance is frequently associated with alterations in drug transport through the cellular membrane, drug detoxication, enhanced or lowered effectiveness of DNA damage repair, inhibition of apoptosis, and overexpression of anti-apoptotic proteins [6]. In particular, efflux of cisplatin was reported to be mediated by increased glutathione concentration (GSH), overexpressed glutathione-S-transferase (GST), and ABC-family (ATP-binding cassette) transporters in cisplatin-resistant NSCLC. GST catalyzes conjugation of cytotoxic drug and GSH, and then the less toxic complex is transported outside the cancer cell by ABC family members [7].

ABC transporters utilize energy from ATP hydrolysis to shuttle a variety of small biological compounds such as ions, nutrients, and drugs through the cellular membrane [8]. Some of these proteins are overexpressed in a variety of drug-resistant cancers. These include ABCB1 (glycoprotein P, MDR1), ABCC1 (MRP1—multidrug resistance protein 1), ABCC2 (MRP2), ABCC4 (MRP4), ABCC5 (MRP5), and ABCG2 (BCRP—breast cancer resistance protein) in cisplatin-resistant cells [9–15]. Only three of these—ABCC2, ABCC5, and ABCC6—were reported to actively transport cisplatin out of the cell [16]. This suggests that cisplatin-induced overexpression of ABC genes may provide cancer cell resistance to other drugs. Moreover, ABC transporters reveal low substrate specificity.

Transcription efficiency of ABC genes is elevated in response to stressors such as oxidative stress or drug-related toxicity, transcription factors, e.g., NF- κ B, Nrf2, p53, chromatin remodeling enzymes as well as tyrosine kinase effectors (Akt or ERKs), which transduce signals to chromatin [17,18]. Increased activity of p53, caused by gain-of-function mutations, was documented to enhance the activity of the *ABCB1* promoter in a variety of cancer cell types [19]. In response to UV radiation or different compounds, including chemotherapeutics, the MDR1 enhancosome, which comprises two histone acetylases—P/CAF and EP300 (E1A binding protein P300)—as well as transcription factors Sp1, Sp3, NF-Y—was found at the promoter of the *ABCB1* gene. Recruitment of the above-mentioned enhancosome to chromatin results in increased chromatin accessibility to transcriptional apparatus due to the histone acetylation by the above-mentioned acetylases [20]. Enzymatic activity of EP300 controls cellular processes such as cell proliferation and DNA repair; hence, it plays an important role in tumorigenesis [21,22]. Some reports indicate that EP300 acetylates, stabilizes, and activates p53 overexpression of which inhibits caspase 9 in the human lung cancer cell line H1299, thereby allowing these cells to avoid cisplatin-induced apoptosis [23,24]. More recent papers also indicate another functional link between these two proteins, where p53 overexpression in H1299 promotes self-acetylation and, hence, increased activity of EP300 and elevated acetylation of H3K18 [25]. Moreover, identification of chromatin regions enriched in EP300 indicated the recruitment of acetylase to p53-driven promoters in a p53-dependent manner in human lung cancer cells [26]. These findings suggest the possible implication of p53-EP300 mutual interdependence in the development

of multi-drug resistance. Particularly, EP300 bromodomain inhibitor, I-CBP112, recently emerged as an ABC gene repressor in p53 wild-type cell lines [27].

In contrast to EP300, histone deacetylases (HDACs) that oppose acetylase activity may inhibit some ABC genes, as treatment with HDAC inhibitors increased *ABCB1* expression [28]. Similar to HDACs, LSD1 (lysine-specific demethylase—also known as KDM1A) is capable of suppressing ABC-family gene expression upon deficiency of EP300 activity. Inhibition of LSD1 counteracts suppression of *ABCC1* and *ABCC10* expression caused by EP300 bromodomain inhibitor [27].

Although LSD1 removes transcription-promoting chromatin signatures by erasing methyl groups from di- and monomethylated lysine 4 of histone 3, it requires the CoREST (REST corepressor 1 or RCOR) to function on a nucleosome and not only histones [29]. The latter protein links LSD1 with HDAC1/2 activity since the two histone deacetylases associated with REST (RE1-silencing transcription factor) and Sin3 form a core of a chromatin remodeling complex, which is responsible for the repression of numerous genes [30,31]. Considering the above-mentioned examples of HDAC and LSD1 contribution to down-regulation of some ABC gene promoter activity, the involvement of the CoREST complex in the regulation of multi-drug resistance seems possible. Moreover, the referred papers highlight the role of EP300 and p53 in controlling the cellular level of protein transporters functionally associated with an active drug efflux, thus their potential involvement in the development of cisplatin resistance in cancer cells.

These premises prompted us to test the possible molecular link between CoREST complex occurrence at the promoters of the ABCC gene subfamily of ABC transporters and their overexpression in cisplatin-resistant cancer cells. For this purpose, we generated two cisplatin-resistant cell lines derived from non-small cell lung cancer cells (A549) and triple-negative breast cancer cells (MDA-MB-231), where cisplatin is considered in mono- or combined neo- or adjuvant chemotherapy. Furthermore, we compared the interaction of EP300 and p53 with CoREST-bound and -free ABCC gene promoters with their responsiveness to cisplatin.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The A549 cell line was purchased from ATCC. The MDA-MB-231 cell line was purchased from Sigma-Aldrich. DMEM High Glucose w/L-Glutamine w/Sodium Pyruvate, fetal bovine serum, and antibiotics (penicillin and streptomycin) were purchased from Biowest (CytoGen, Zgierz, Poland). Lipofectamine RNAiMAX, OptiMem, Dynabeads™ Protein G, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 to 180 kDa), SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate, TRI Reagent™, Pierce™ Protease Inhibitor Tablets (EDTA-free; PIC), Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (#32430), SlowFade™ Glass Soft-set Antifade Mountant (with DAPI), anti-MRP10 (ABCC10) Polyclonal Antibody (#PA5101678), UltraPure™ Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1, v/v) (#15593031), TaqMan™ universal master mix II), TaqMan™ gene expression assays: ABCC3 (Hs00978452_m1), ABCC4 (Hs00988721_m1), ABCC10 (Hs01056200_m1), ACTB (Hs01064292_g1), GAPDH (Hs02786624_g1), and TBP (Hs99999910_m1) were purchased from Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, Warsaw, Poland). ChIP-grade antibodies: anti-ABCC3 (#D8V8J), anti-ABCC4 (#D2Q20), anti-LSD1 (#2139) normal rabbit IgG (#2729), p53 (#7F5) anti-histone H3 (#1B1B2), anti-H3K27ac (#D5E4), and anti-EP300 (#D2X6N) were purchased from Cell Signaling Technology (LabJOT, Warsaw, Poland). iEP300 (C646, #10549) and cisplatin (#13119) were purchased from Cayman Chemical (Biokom, Janki/Warsaw, Poland). Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide was ordered from Biokom, Janki/Warsaw, Poland. L15 Medium, oligonucleotides for real-time PCR, Sodium butyrate (303410-5G), KAPA SYBR® FAST Universal 2×, Anti-CoREST Antibody (#07-455), resazurin sodium salt were ordered from Sigma-Aldrich (Poznan, Poland). For transient gene silencing, siRNA Control (sc-37007) and siRNA P53 (sc-29435) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (AMX, Lodz, Poland).

2.2. Cell Culture and Treatment with Inhibitors

A549 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, penicillin–streptomycin (50 U/mL and 50 µg/mL, respectively) in 5% CO₂. MDA-MB-231 cells were initially cultured in L15 medium supplemented with 15% FBS, penicillin–streptomycin (50 U/mL and 50 µg/mL, respectively) without CO₂ equilibration. After five passages, cells were adapted to grow in DMEM supplemented with 10% FBS, penicillin–streptomycin (50 U/mL and 50 µg/mL, respectively) in 5% CO₂. For both cell lines, culture medium was replaced twice a week.

Before treatment cells were seeded on culture plates and maintained at the logarithmic growth phase, the compounds: C646 (5 µM; iEP300), cisplatin (10 µM), and sodium butyrate (0.1 mM, iHDAC) were added to cells in a single dose for 24 h prior to analysis. All the concentrations, as well as incubation times, were assessed based on our own results.

2.3. Cisplatin Resistance Induction

A549 and MDA-MB-231 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, penicillin–streptomycin (50 U/mL and 50 µg/mL, respectively) in 5% CO₂. Both cell lines were seeded into 25 cm³ culture bottles. In the period of 5 months, depending on the cell proliferation status (approximately every 3 weeks), the cells were treated with 10 µM cisplatin, since it is within the cisplatin therapeutic range of 1000–5000 µg/L [32]. Cells were incubated with the compound for 48 h. After incubation, the medium containing cisplatin was removed, and cells were washed with PBS and replaced with fresh cisplatin-free medium twice a week.

2.4. Resazurin Toxicity Assay

Non-resistant and cisplatin-resistant cells were seeded in 96-well plates and treated with varying concentrations of cisplatin (0; 0.01; 0.1; 0.5; 1; 5; 10; 25; 50; 100 (µM)), doxorubicin (0; 0.01; 0.025; 0.05; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 1 (µM)) and paclitaxel 0; 0.0005; 0.001; 0.005; 0.01; 0.1; 0.5; 1; 5; 10 (µM)). After 48 h incubation with the drugs, resazurin solution (5 µM) was added to the plates and incubated for 4 h in 37 °C. Next, fluorescence indicating the number of living cells was measured with a fluorescence microplate reader (BioTek Synergy HTX, Biokom, Poland) at 530ex/590em nm. The fluorescence value of untreated cells was assumed as 100%.

2.5. Quantification of Gene Expression

For the sake of gene expression evaluation, mRNA was extracted from cells using TRI Reagent™. Afterward, mRNA was reverse transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. cDNA fragments were amplified in real-time PCR (KAPA SYBR® FAST Universal 2× or TaqMan™ universal master mix II); CFX96 C1000 Touch, BioRad Warsaw, Poland) using the following primer pairs: ABCC10 Forward: 5' CGGGT-TAAGCTTGTGACAGAGC 3', Reverse: 5' AACACCTTGGTGGCAGTGAGCT 3'; ABCC2 Forward: 5' AATCAGAGTCAAAGCCAAGATGCC 3', Reverse: 5' TAGCTTCAGTAG-GAATGATTTTCAGGAGCAC 3'; ABCC3 Forward: TCCTTTGCCAACCTTTCTCTGCAAC-TAT, Reverse: 5' CTGGATCATGTCTGTCAGATCCGT 3'; ABCC4 Forward: 5' TGATGAGC-CGTATGTTTTGC 3', Reverse: 5' CTTCCGGAACGGACTTGACAT 3'; ABCC5 Forward: 5' AGAGGTGACCTTTGAGAACGCA 3', Reverse: 5' CTCCAGATAACTCCACCAGACGG 3'; ABCG2 Forward: 5' CCGCGACAGCTTCCAATGACCT 3', Reverse: 5' GCCGAAGAGCT-GCTGAGAACTGTA 3'. The following housekeeping genes were used for normalization: GAPDH Forward: 5' TTCTTTTGCGTCGCCAGCCGA 3', Reverse 5' GTGACCAGGCGC-CCAATACGA 3'; HPRT1 Forward: 5' TGACACTGGCAAAACAATGCA 3'. Reverse: 5' GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT 3'; TBP Forward: 5' CACGAACCACGGCACTGATT 3', Reverse: 5' TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC 3' or TaqMan™ gene expression assays. mRNA level of particular genes was first normalized to three housekeeping genes. Next, the fold-change of values of each of the housekeeping genes over untreated control was

calculated. Finally, the mean of all three-fold change values was calculated and used for statistical analysis.

For evaluating protein expression, cells were lysed in cell lysis buffer (15 mM NaCl/50 mM Tris-HCl/0.5% sodium deoxycholate/0.5% SDS) and sonicated (Bandelin Sonopuls HD2070). Afterward, cell lysates were separated with SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and stained overnight with primary antibodies (1:5000) at 4 °C. After staining, using HRP-conjugated secondary antibodies (1:5000; room temperature; 1 h), the signal was developed using SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate and acquired with ChemiDoc-IT2 (UVP, Meranco, Poznan, Poland).

2.6. Transient Gene Silencing

The day prior to transfection, cells were seeded at a density of 100,000 cells per well. The next day, siRNA-RNAiMAX complexes (prepared in a ratio of 20 nmol siRNA and 3 µL of transfection reagent), suspended in OptiMem medium, were added. After 4 h of incubation with the complexes, DMEM supplemented with 10% FBS, penicillin–streptomycin (50 U/mL and 50 µg/mL, respectively) was added to a total volume of 1 mL.

2.7. Chromatin Immunoprecipitation

Cells were fixed by adding formaldehyde to the culture medium. Cells were lysed, and then chromatin was sheared using a sonicator (Bandelin Sonopuls HD2070). Antibodies and Dynabeads™ Protein G, which were pre-blocked with 0.5% BSA/PBS, were added to the obtained supernatant. Samples were incubated overnight on a rotator at 4 °C. The next day, chromatin–antibody–magnetic bead complexes were washed, and chromatin was decrosslinked in 2% SDS/TE buffer at 65 °C overnight. DNA was extracted using phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1). Fragments spanning sites of interest at the selected gene promoters were amplified using KAPA SYBR® FAST Universal 2× and 0.1% DMSO. The following primer pairs surrounding potential p53 binding sites were used: ABCC2 Forward: 5' AGGTCAAGGCTGCAATGAAT3', Reverse: 5'CTGTCATCGACCCAACCTTT 3'; ABCC10 Forward: 5' CTTGTCCAAGGTCATGCAGC 3', Reverse: 5'GCCCCACGGACAAATAATGC 3'; ABCC3 Forward: 5' ACTCAATGACTCATCGGCCC 3', Reverse: 5' GGCTAACAGTCCAGGAGTCG 3'; ABCC4 Forward 5' GACCTCAAGCAGGGATGTG 3', Reverse: 5' GGCTCCCTTTGGCGTCG 3'.

2.8. Confocal Microscopy

For confocal imaging, cells were seeded on a Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide. In order to stain chromatin-bound fraction of EP300, cells were washed with 1% BSA/PBS and then pre-permeabilized for 5 min in 1% BSA/PBS/0.1% Triton X-100. Afterward, cells were fixed in 4% formaldehyde in PBS for 15 min. After blocking in 5% FBS/1x PBS/0.5% Triton X-100 for 1 h, cells were incubated overnight with primary anti-EP300 antibody (1:400) 1% BSA/PBS/0.5% Triton X-100. After washing with 1% BSA in PBS, cells were incubated with secondary antibody (1:400) 1% BSA/PBS/0.5% Triton X-100 for 2 h in the dark. After washing with PBS, slides were mounted with SlowFade™ Glass Soft-set Antifade Mountant (with DAPI). TCS SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) with objective 63×/1.40 (HC PL APO CS2, Leica Microsystems, Germany) was used for slide imaging. The following wavelength values of excitation and emission were used for specimen visualization: 485 and 500–550 nm for Alexa Fluor® 488 and 405 and 430–480 nm for DAPI. The average fluorescence was calculated using at least 100 single cells for each sample. Fluorescence intensity was determined as the arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems, Germany).

2.9. Transcription Factor Binding Sites Assessment

For the analysis of chromatin interacting proteins, specifically at the promoters (TSS -2kbp) of ABCC2, ABCC3, ABCC5, ABCC10, ABCG2 in A549 cells, track ENCODE 3 TFBS

in the UCSC table browser was used. The search was conducted for every transcription factor listed in the aforementioned track for A549 cells. Queries were then submitted to usegalaxy.org.

2.10. Statistical Analysis

Data are presented as the mean $\pm$ SEM (standard error of the mean), Student's *t* test or the Mann–Whitney test was used to calculate statistically significant differences between two samples (marked with * when $p < 0.05$), 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 (marked with * when $p < 0.05$). Statistics were calculated using GraphPad Prism 8.01 software. The decision on using the parametric versus non-parametric test was conducted after testing Gaussian distributions of data with the Shapiro–Wilk test.

3. Results

3.1. Non-Small Cell Lung Cancer Cells Exposed to Multiple Doses of Cisplatin Gain Resistance to Drugs of Various Chemical Structures and Activity

In order to assess whether A549 cells developed multidrug resistance, the resazurin assay was conducted. We evaluated varying concentrations of cisplatin, doxorubicin, and paclitaxel to assess if cisplatin-treated cells tolerate higher concentrations of chemotherapeutics than their wild-type counterparts. Cisplatin-resistant A549 cells exhibited better survival rates than the original cell line in the entire concentration range of three tested compounds (Figure 1A). This indicates that multiple treatments of A549 cells with cisplatin allow these cells to gain resistance to chemotherapeutics, which vary in chemical structure and biological activity. Furthermore, to test which ABC-family transporters undergo overexpression in response to cancer cell treatment with an alkylating agent, we compared their mRNA level in cisplatin-resistant versus basal cell lines. As shown in Figure 1B, loss of cell vulnerability to anticancer drugs was associated with strong overexpression of ABCC1 and ABCC10 and a slight but statistically significant increase in ABCC2 and ABCG2 transcription, whereas mRNA levels of ABCC3 and ABCC5 remained unchanged. Importantly, an immense fold increase in ABCC1 may result from a low basal mRNA level of this gene in A549 cells. Visualization of three proteins—ABCC1, ABCC3 and ABCC10—by Western blot confirmed the results obtained by real-time PCR (Figure 1C) and protein abundance of ABCC10 was considerably higher in cisplatin-resistant cells, whereas ABCC3 was comparable between two cell phenotypes.

3.2. CoREST Complex Subunits Occupy Promoter of ABCC3 That Remains Transcriptionally Irresponsive to Cisplatin in A549

In search of the rationale behind some of the transporters being overexpressed in cisplatin-resistant A549 cells, we investigated regions of TSS $\pm$ 2 kbp for the presence of transcription-regulating factors that may interact with regulatory elements of ABC genes and affect their expression. For this purpose, we used ChIP-seq data of transcription factors deposited in the Genome Browser in an ENCODE 3 TFBS track. As shown in Figure 1D, promoters of ABCC1, ABCC2, and ABCC5 were enriched in individual components of the CoREST complex; however, REST, Sin3, and two enzymatic subunits—HDAC1 and LSD1—were detected only at the promoter of ABCC3 that remained unchanged upon gaining resistance to cisplatin. In contrast, the promoter of ABCC10, which underwent considerable activation by repeated administration of an alkylating drug, was only enriched in POLR2A. This observation led us to hypothesize that the Co-REST repressive complex may interfere with the intensification of some ABCC gene transcription in response to cisplatin. Using ChIP-qPCR, we confirmed that REST complex members—Co-REST as well as LSD1 and HDAC1—are enriched at the ABCC3 promoter region, but not at the ABCC10 promoter (Figure 1E,F). Furthermore, to assess the functional impact of CoREST members on ABC gene expression in cisplatin-resistant A549 cells, we treated them with iLSD1 (0.1 μ M SP2509) and pan-HDAC inhibitor (250 μ M sodium butyrate) for 24 h and measured mRNA levels of ABCC3 and ABCC10 (Figure 1G). Inhibition of CoREST enzymatically

active units did not affect the expression of ABCC10. This supports data in Figure 1E and 1F and confirms the lack of CoREST's direct impact on transcription activation of ABCC10 by cisplatin. As expected, transcription of ABCC3 was substantially enhanced by both inhibitors in cisplatin-resistant A549 cells. This led to the conclusion that CoREST prevents ABCC3 induction by cisplatin.

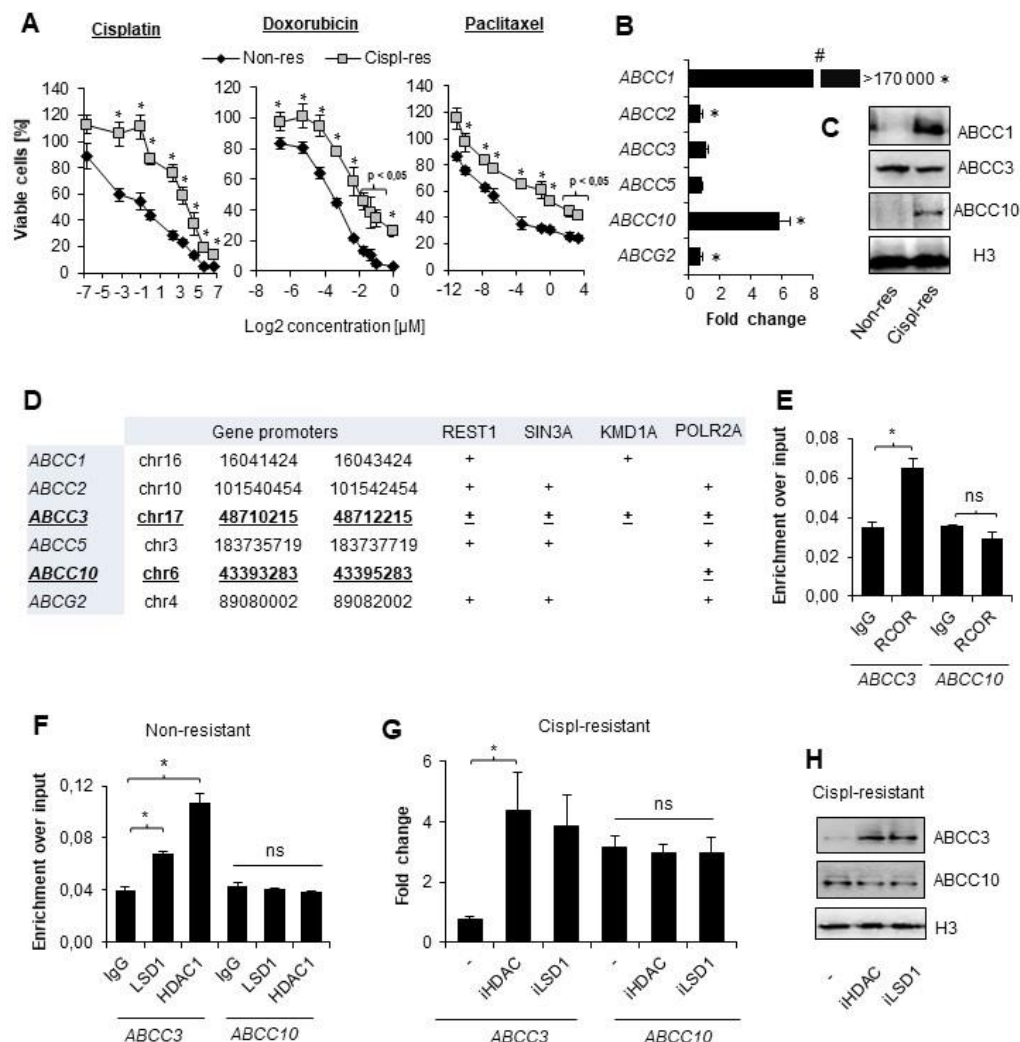


Figure 1. CoREST complex represses genes that are not overexpressed in cisplatin-resistant lung cancer cells. (A) Vulnerability to wide concentration range of cisplatin, doxorubicin, and paclitaxel was compared between non-resistant (non-res) and cisplatin-resistant (cispl-res) A549 cells. Viability was evaluated with resazurin-based assay. Metabolic activity of untreated cells was assumed as 100%. (B) Fold-change in mRNA level of some ABCC and ABCG2 genes was measured by real-time PCR using TaqMan assays. Transcription of transporter genes was normalized first to housekeeping genes (ACTB, GAPDH, and TBP), and then, mRNA levels of ABCC and ABCG2 were assumed as 1. (C) Protein level of ABCC1, ABCC3 and ABCC10 was compared in lysates of non-resistant and cispl-resistant A549 cells by Western blot. Histone H3 was used as a loading control. Original WB can be found at Figure S1. (D) The indicated promoter regions (TSS $\pm$ 2 kbp) were searched for transcription factors, chromatin remodeling enzymes, and POLR2A in Genome Browser database (assembly: GRCh37/hg19, group: Regulation, track: ENCODE 3 TFBS, table: A549 ATF3—ZBTB33). (E,D) Occurrence of REST (E) as well as LSD1 and HDAC1 (F) at the promoters of ABCC3 and ABCC10 was tested by ChIP-qPCR. Amplified promoter regions spanned p53 binding site. Ten percent input was used as an internal control. (G) Functional impact of LSD1 and HDAC1 occurrence at the ABCC3 gene promoter was evaluated by treating cispl-resistant A549 cells with LSD1 and pan-

-HDAC inhibitors (0.1 μ M SP2509 and 250 μ M sodium butyrate, respectively) for 24 h and measuring gene mRNA level by real-time PCR. Results were normalized to housekeeping genes, and then, mRNA level of non-resistant untreated cells was assumed as 1. (H) Effect of HDAC and LSD1 inhibition on ABCC3 and ABCC10 protein level was monitored by Western blot in cisplatin-resistant A549 cells. Histone H3 was used as a loading control. Protein bands were measured by densitometry using ImageJ, and numerical data are available in Table S2. (A,B,E–G) All of the bars represent the mean of replicates $\pm$ SEM. (A,B) Difference between survivability of cisplatin-resistant and non-resistant cells and in expression of particular ABC transporters were analyzed with the *t* test or Mann–Whitney test, depending on their Gaussian distribution. (E) Differences in RCOR enrichment at the promoters of interest were analyzed with the *t* test. (F) The effect of iHDAC and iLSD1 on ABCC3 and ABCC10 expression in non-resistant A549 was analyzed with ANOVA and the Dunnett's post hoc test. (G) The impact of HDAC and LSD1 inhibition on cisplatin-resistant A549 cells was analyzed with ANOVA and Tukey's test. (A,B,E–G) Statistically significant differences between analyzed groups are marked with * when $p < 0.05$. Detailed statistical analysis can be found in Table S1.

3.3. EP300 Drives ABCC10 Overexpression in Cisplatin-Resistant A549 Cells

Knowing that EP300 forms transcription modulating complexes with HDAC1 at the E2F-driven promoters, which include the ABCC gene subfamily, and bearing in mind previous reports, which indicated the role of PCAF and EP300 in transcription activation of ABCB1, we took into consideration a potential involvement of the latter acetyltransferase in the regulation of ABCC10 gene expression in cisplatin-resistant A549 cells [20,22,33]. To test this hypothesis, we treated both A549 phenotypes with EP300 inhibitor C646 (5 μ M) for 24 h (Figure 2A,B). The deficiency of EP300 activity led to a substantial decrease in ABCC10 expression in cisplatin-resistant A549 cells; however, a statistically significant decline in ABCC10 mRNA was also found in the wild type. As expected, ABCC3 was unaffected by EP300 inhibition, as the CoREST complex seemingly blocked its promoter region (Figure 2A,B). Analysis of the two gene promoters by ChIP-qPCR confirmed weak but statistically significant enrichment of EP300 at the ABCC10 promoter, but not ABCC3, in cisplatin-resistant cells (Figure 2C). Of note, ABCC10 responded to EP300 inhibition also in basal A549 cells, thereby suggesting that acetyltransferase may be abundant at the gene promoter also in non-resistant cells. To further validate EP300 occurrence on the chromatin of cisplatin-resistant A549, the chromatin-bound fraction of the enzyme was stained and further imaged under a confocal microscope (Figure 2D). EP300 interaction with chromatin was enhanced in cisplatin-resistant A549 cells.

Since we found that EP300 is more abundant on chromatin in NSCLC cells after long-term exposure to cisplatin, and, particularly, at the ABCC10 promoter that allows for relatively strong overexpression of this gene in cisplatin-resistant phenotype, we decided to test the direct ABCC10 response to a single dose of cisplatin (10 μ M). As shown in Figure 2E,F, the expression of ABCC10 was significantly elevated at the mRNA and protein level in cisplatin-treated cells, whereas the expression of ABCC3 remained unchanged. To test whether histone deacetylases, which contribute to CoREST-mediated ABCC3 repression in cisplatin-resistant cells, prevent ABCC3 activation by a single dose of cisplatin, we added a pan-HDAC inhibitor—sodium butyrate—for 1 h prior to cisplatin (Figure 2G,H). Deficiency of HDAC activity led to the cisplatin-induced elevation of ABCC3 transcription. Similar profiles of change were observed for two other ABCC genes: ABCC2 and ABCC5, where HDAC inhibition was necessary to observe cisplatin-induced increase in the gene transcription (Figure S2). Inhibition of EP300 countered the effect of iHDAC and maintained a low level of mRNA. Similarly, EP300 emerged responsible for increased ABCC10 transcription in response to a single dose of cisplatin, since C646 considerably reduced the drug-induced activation of this gene. Accordingly, EP300 was recruited to the ABCC10 promoter in response to the treatment of non-resistant cells with the alkylating drug (Figure 2K).

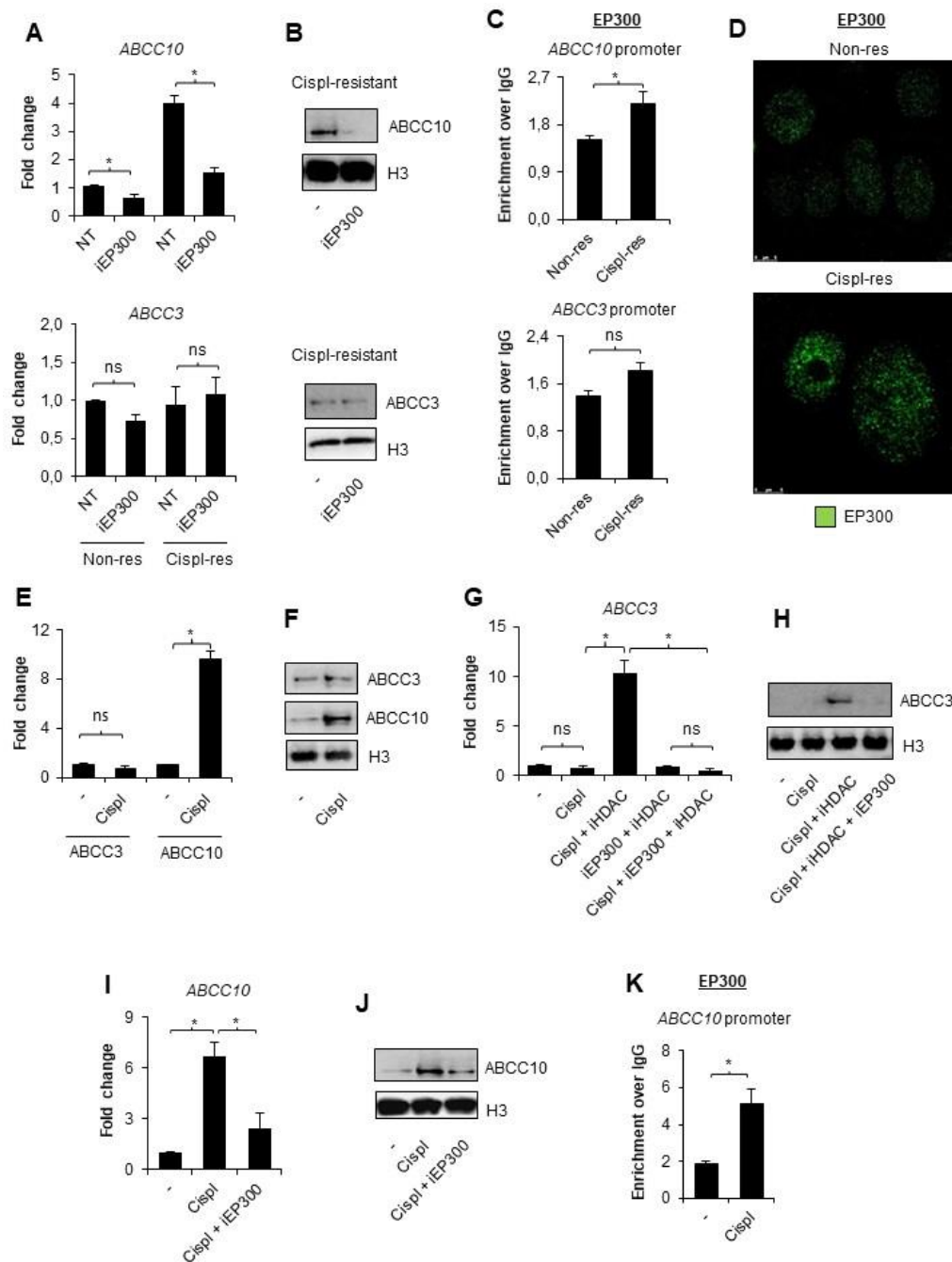


Figure 2. EP300 is responsible for *ABCC10* overexpression in cisplatin-resistant A549 cells. (A,B) Contribution of EP300 in transcription of *ABCC3* and *ABCC10* was evaluated by treating non- and cispl-resistant A549 cells with EP300 inhibitor—C646 (5 μM, 24 h)—and quantifying gene mRNA level by real-time PCR (A) and protein by Western blot (B). (C) Recruitment of EP300 to the promoter of *ABCC10* in two A549 phenotypes was monitored by ChIP-qPCR. (D) Chromatin-bound EP300 was visualized in non- and cispl-resistant cells by immunocytochemistry, followed by confocal microscopy. Green fluorescence derived from Alexafluor488-conjugated secondary antibody corresponds to EP300 appearance in cells. (E,F) *ABCC3* and *ABCC10* response to a single dose of cisplatin was measured by non-resistant A549 cell treatment with 10 μM drug for 24 h. (E) The treatment was followed by mRNA quantification with TaqMan-based real-time PCR. After initial mRNA normalization to housekeeping genes, expression of *ABCC3* and *ABCC10* was assumed as 1 in untreated cells. (F) Changes in *ABCC3* protein levels were measured by Western blot. (G,H) HDAC-repressive role on the *ABCC3* promoter during non-resistant cell single induction with cisplatin was tested by adding

pan-HDAC inhibitor (250 μ M sodium butyrate) for 1 h prior to anticancer drug. The same approach was utilized to confirm the contribution of EP300 to the observed release of *ABCC3* from silencing upon combination of iHDAC with cisplatin. iEP300—5 μ M C646—was added for 1 h prior to cisplatin (together with iHDAC). (G) mRNA was extracted from cells 24 h after cell stimulation with the drug, and gene transcription was quantified by TaqMan-based real-time PCR. After normalization to mRNA level of *ACTB*, *GAPDH*, and *TBP*, transcription of *ABCC3* was compared to untreated cells, where the gene transcription was set as 1. (H) Impact of HDAC inhibition with subsequent cisplatin administration on *ABCC3* protein expression was visualized by Western blot. (I) Similarly, the impact of EP300 on *ABCC10* transcription activated by single dose of cisplatin was analyzed by adding non-resistant cells with iEP300 for 1 h prior to chemotherapeutic. The following steps were the same as in (E). (J) Inhibition of *ABCC10* activation by iEP300 was also visualized at the protein level by Western blot. (K) Cisplatin-induced interaction of EP300 with *ABCC10* promoter was monitored by ChIP-qPCR in non-resistant A549 cells exposed to 10 μ M cisplatin for 24 h. (A,C,E,G,I,K) All bars represent the mean of replicates $\pm$ SEM. (A) The effect of iEP300 on expression of *ABCC3* and *ABCC10* in non-resistant and cisplatin-resistant A549 were analyzed with *t* test. (C) The change in enrichment of EP300 at promoters of *ABCC3* and *ABCC10* between non-resistant and cisplatin-resistant A549 was analyzed with the Mann–Whitney test. (E) The effect of cisplatin on *ABCC3* and *ABCC10* expression was analyzed with *t* test and Mann–Whitney test, respectively. (G) The influence of cisplatin, iHDAC, and iEP300 on expression of *ABCC3* gene was analyzed with the Kruskal–Wallis test and Dunn’s multiple comparison test. (I) The effect of cisplatin and C646 on *ABCC10* expression was evaluated with ANOVA and Tukey’s post hoc test. (K) The enrichment of EP300 at *ABCC10* gene promoter after exposure to cisplatin was analyzed with the Mann–Whitney test. (A,C,E,G,I,K) Statistically significant differences between analyzed groups were marked with * when $p < 0.05$. Detailed statistical analysis can be found in Table S1. Densitometry results of Western blot images are included in Table S2. Original WB can be found at Figure S1.

3.4. P53 Allows for EP300-Mediated Increase in *ABCC10* Transcription after Single Dose of Cisplatin in Non-Resistant A549 Cells

Bearing in mind that cisplatin triggers the ATM/ATR signaling pathway, which activates inter alia p53, and that p53 is involved in EP300 recruitment to chromatin under certain conditions, we tested the possible involvement of the tumor suppressor in *ABCC10* overexpression during the development of A549 cell resistance to cisplatin. Neither basal nor drug-resistant cells were characterized by p53 enrichment at the *ABCC10* promoter (Figure 3A). Moreover, transient silencing of the genome guardian did not considerably affect the gene and protein expression (Figure 3B,C). This led to the conclusion that p53 does not control *ABCC10* overexpression under resting conditions in the cisplatin-resistant phenotype.

This prompted us to test the possible contribution of p53 to direct cell response to cisplatin. Cell treatment with an alkylating drug for 24 h caused p53 recruitment to *ABCC10* promoter in non-resistant cells (Figure 3D). To test the functional impact of p53 to EP300 occurrence on the chromatin, we visualized chromatin-bound EP300 by immunostaining in p53-deficient and proficient A549 cells exposed to a single dose of cisplatin for 24 h (Figure 3E). Similar to Figure 2D, confocal images confirmed the higher abundance of acetyltransferase in cisplatin-resistant cells under resting conditions regardless of p53 status. A single dose of cisplatin induced a significant increase in EP300 occurrence on the chromatin only in non-resistant, p53 proficient cells; however, the silencing of p53 entirely precluded acetyltransferase enrichment in the nuclei of basal A549 cells. Notably, cisplatin-resistant cells did not respond to another cisplatin dose with a further increase in enzyme abundance in the nuclei.

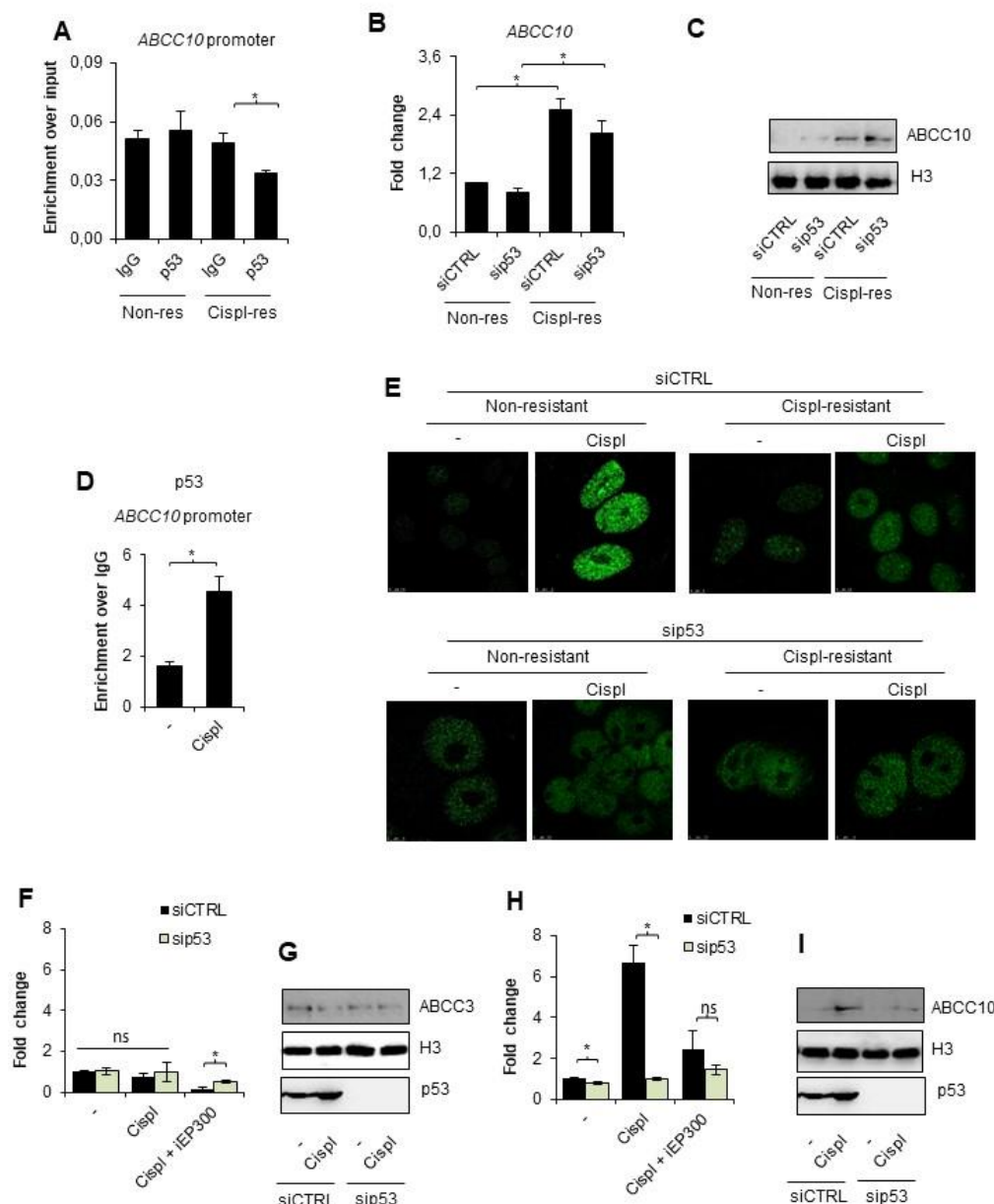


Figure 3. p53 recruits EP300 to chromatin upon exposure of non-resistant A549 cell to cisplatin and controls *ABCC10* direct response to the alkylating agent. (A) Enrichment of p53 at the promoter of *ABCC10* in unstimulated non- and cisplatin-resistant lung cancer cells was analyzed with ChIP-qPCR. (B,C) Transient silencing of p53 was utilized to assess the possible impact of this protein on *ABCC10* expression in two phenotypes of unstimulated A549 cells. (B) mRNA was quantified 48 h after cell transfection with siRNA by TaqMan-based real-time PCR, normalized to *ACTB*, *GAPDH*, and *TBP* and is shown as fold-change versus siCTRL transfected cells. (C) Protein level was compared between siCTRL and sip53 by Western blot 72 h after cell transfection. Histone H3 was used as an internal control. (D) Recruitment of p53 to the promoter of *ABCC10* in cells treated with cisplatin (10 μ M) for 24 h was analyzed by ChIP-qPCR. (E) The role of p53 in EP300 enrichment at chromatin was visualized by immunocytostaining followed by confocal microscopy. Cells were exposed to cisplatin (10 μ M) 48 h after cell transfection with siRNA, and EP300 was stained with rabbit antibody 24 h after cell treatment with anticancer drugs. Green fluorescence of Alexaflor488-conjugated secondary antibody marks chromatin-bound acetyltransferase. (F–I) Impact of p53 on expression of *ABCC3* (F,G) and *ABCC10* (H,I) was evaluated by comparing gene expression in cisplatin-induced non-resistant A549 cells transfected with siCTRL and sip53. mRNA (F,H) was isolated and quantified by TaqMan-based real-time PCR and protein (G,I) by Western blot 24 h after administration of the

chemotherapeutic (10 μ M). After normalization to housekeeping controls, mRNA level in siC-TRL untreated cells was assumed as 1. In Western blot, histone H3 was used as loading control. (A,B,D,F,H) All bars represent the mean of replicates $\pm$ SEM. (A,F,H) The enrichment of p53 at the ABCC10 promoter and the effect of cisplatin and iEP300 on ABCC3 and ABCC10 gene expression in cells that differ in p53 level were analyzed with *t* test. (B) The effect of sip53 silencing on ABCC10 expression in non-resistant and cisplatin resistant A549 was evaluated with Kruskal–Wallis test and Dunn’s multiple comparison test. (D) The enrichment of p53 at ABCC10 promoter upon cisplatin treatment was analyzed with the Mann–Whitney test. Statistically significant differences between analyzed groups were marked with * when $p < 0.05$. Detailed statistical analysis can be found in Table S1. Densitometry result of Western blot images is available in Table S2. Original WB can be found at Figure S1.

To test the functional impact of p53 on the cisplatin-induced expression of ABCC3 and ABCC10 in non-resistant A549 cells, we compared their mRNA and protein level in cisplatin-treated cells deficient and proficient in tumor suppressors. We made use of iEP300 to simultaneously monitor the possible cross-talk between p53 and acetyltransferase (Figure 3F–I). As expected, p53 silencing and inhibition of EP300 did not affect the mRNA and protein level of ABCC3 in cisplatin-treated cells (Figure 3F,G, respectively). While checking the response of ABCC2 and ABCC5 to cisplatin in the presence of pan-HDAC inhibitor, we observed p53 dependence (Supplement S2). The silencing of p53 abrogated cisplatin-induced activation of ABCC2 and ABCC5 upon deficiency of HDAC activity. Similarly, p53 silencing prevented the cisplatin-induced increase in ABCC10 transcription, which was only possible in the presence of the active EP300 (Figure 3H,I). These results suggest that p53 is required for EP300-dependent ABCC10 gene response to the alkylating agent.

3.5. CoREST-Free Promoter of ABCC10 Responds to Cisplatin in EP300 and p53-Dependent Fashion in TNBC Cell Line—MDA-MB-231

To confirm that the above-described mechanism controls ABCC gene expression in other cancer types, which are also eligible for cisplatin-based chemotherapy, we tested the triple-negative (progesterone, estrogen, and HER2 deficient; TNBC) breast cancer cell line MDA-MB-231 in a similar experimental model. We generated a corresponding cisplatin-resistant phenotype and measured ABCC gene responsiveness to alkylating drug treatment. Following another paper on this cell line by Strachowska et al., we chose ABCC4 for further experiments, which was comparably transcribed in cisplatin-resistant and non-resistant phenotypes and in ABCC10, which was substantially overexpressed in cells characterized by decreased vulnerability to anticancer drugs.

Similar to our observations carried out for ABCC3 in wild-type A549 cells, the promoter of ABCC4, but not ABCC10, was also enriched in the Co-REST protein (Figure 4A). To verify if Co-REST enzymatic subunits functionally affect the expression of the two considered genes, cisplatin-resistant MDA-MB-231 cells were treated with inhibitors of HDACs and LSD1 (Figure 4B,C). Similar to A549 cells, the expression of ABCC10 was not altered by any of the two inhibitors in the resistant MDA-MB-231 cell line, whereas ABCC4 mRNA and protein levels increased after LSD1 inhibition (Figure 4B,C, respectively). This supports the hypothesis on the crucial role of CoREST in ABCC gene response to cisplatin in the studied TNBC cells (Figure 4B,C).

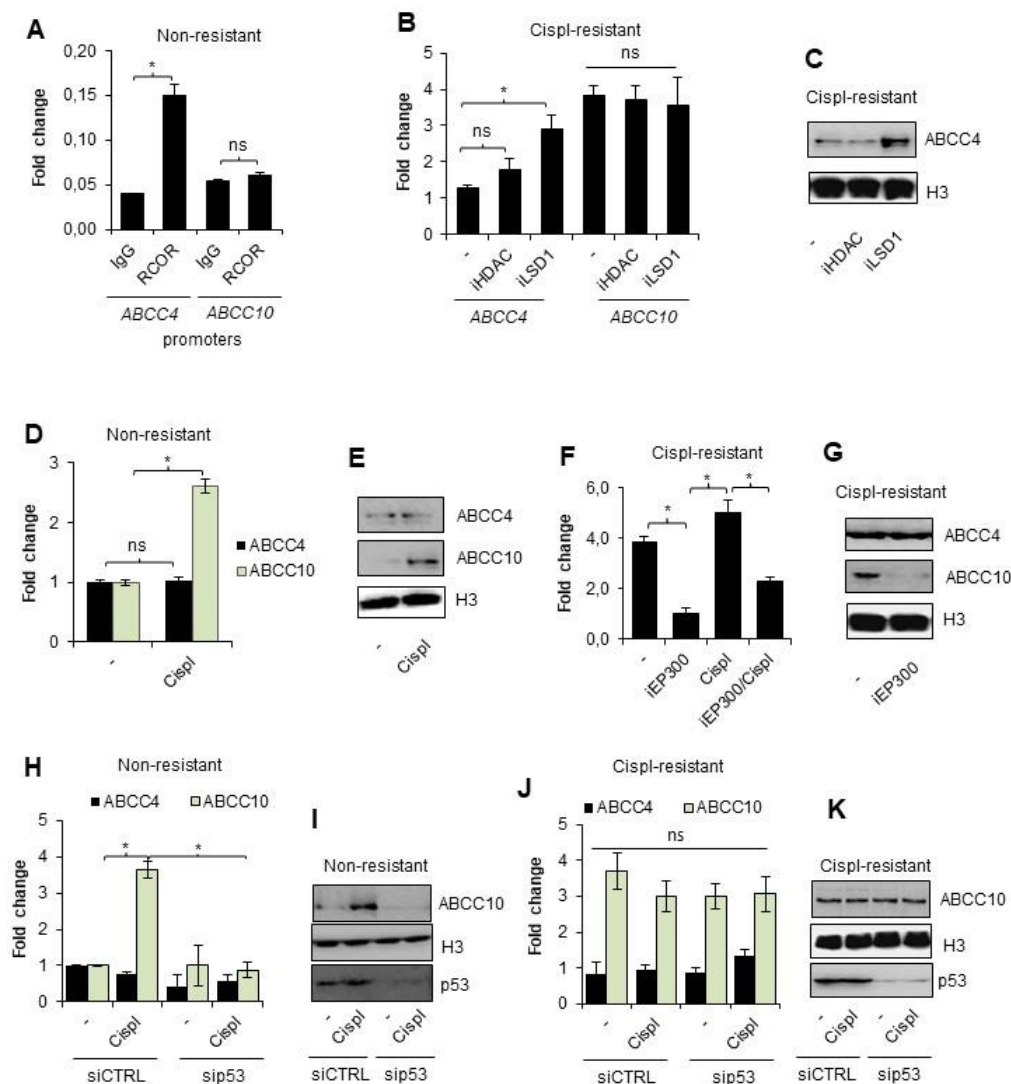


Figure 4. Overexpression of *ABCC10* in cisplatin-resistant MDA-MB-231 cells is controlled by EP300 that activates *ABCC10* transcription in p53-dependent fashion during the direct response of non-resistant breast cancer cells to cisplatin. **(A)** Enrichment of CoREST protein at the promoters of *ABCC4* and *ABCC10* was studied by ChIP-qPCR. Ten percent input was used as an internal control. **(B)** Response of *ABCC4* and *ABCC10* to HDAC and LSD1 inhibition was tested by measurement of mRNA level in cisplatin-resistant cells exposed to the action of iLSD1 (0.1 μ M SP2509) and iHDAC (250 μ M sodium butyrate) for 24 h. mRNA of ABCC genes was quantified by TaqMan-based real-time PCR and normalized to *ACTB*, *GAPDH* and *TBP*, and the gene expression of non-resistant untreated cells was set as 1. **(C)** A similar approach was employed to assess iLSD1 and iHDAC effect on *ABCC4* and *ABCC10* protein level, which was visualized by Western blot. Histone H3 was taken as a loading control. **(D)** Activation of *ABCC4* and *ABCC10* by short treatment of non-resistant cells with cisplatin (10 μ M) for 24 h was studied by quantifying their mRNA level by TaqMan-based real-time PCR. After normalization to housekeeping genes (*ACTB*, *GAPDH*, *TBP*), gene expression was referred to untreated control that was assumed as 1. **(E)** Response of *ABCC10* to 24 h exposure of non-resistant cell to cisplatin (10 μ M) was confirmed by visualizing *ABCC10* protein by Western blot. Histone H3 was used as a control. **(F)** TaqMan-based real-time PCR was utilized to confirm the contribution of EP300 to overexpression of *ABCC10* in cisplatin-resistant MDA-MB-231 cell line. Breast cancer cells were added with iEP300 (5 μ M C646) for 24 h. Simultaneously, the impact of 10 μ M cisplatin on *ABCC10* transcription alone and in combination with iEP300 was tested. In this experiment, iEP300 was added to cells for 1 h prior to cisplatin. Gene transcription was normalized to *ACTB*, *GAPDH*, and *TBP* and the value for untreated cisplatin-resistant cells was assumed as 1. **(G)** The impact of

EP300 inhibitor—5 μ M C646—added to cisplatin-resistant cells on expression of *ABCC10* was confirmed at the protein level by Western blot. *ABCC4* served and non-responding genes and histone H3 were used as a loading control. (H–K) Impact of p53 on induction of *ABCC4* and, particularly, *ABCC10* by 10 μ M cisplatin added to non-resistant and cisplatin-resistant MDA-MB-231 cells was tested by applying p53 targeted siRNA. Cells were transfected in parallel with siCTRL and sip53, and after 48 h, cisplatin was administrated to cells for another 24 h. Gene transcription was measured by TaqMan-based real-time PCR (non-resistant cells—H, cisplatin resistant—J) as described in previous experiments and protein was visualized by Western blot (non-resistant—I, cisplatin resistant—K). (A,B,D,F,H,J) All bars represent the mean of replicates $\pm$ SEM. (A) The difference in RCOR enrichment at *ABCC4* and *ABCC10* was analyzed with the Mann–Whitney and *t* test, respectively. (B,H) The impact of HDAC and LSD1 inhibition on *ABCC4* and *ABCC10* expression and cisplatin on non-resistant MDA-MB-231 with different p53 levels was evaluated with Kruskal–Wallis test and Dunn’s multiple comparison test. (D) The change in expression of *ABCC4* and *ABCC10* was analyzed with *t* test. (F) The expression of *ABCC10* in cisplatin-resistant MDA-MB-231 was compared the ANOVA with Tukey’s post hoc test. (J) Difference between p53-deficient and non-deficient cisplatin-resistant MDA-MB-231 was evaluated with the ANOVA and Tukey’s multiple comparison test. (A,B,D,F,H,J) Statistically significant differences between analyzed groups were marked with * when $p < 0.05$. Detailed statistical analysis can be found in Table S1. Protein bands in Western blot images were quantified by densitometry with ImageJ, and data are included in Table S2. Original WB can be found at Figure S1.

Non-resistant breast cancer cells augmented the expression of *ABCC10*, but not *ABCC4*, after their incubation with a single dose of cisplatin (Figure 4D,E). Furthermore, EP300 was responsible for *ABCC10* overexpression in the drug-resistant phenotype since the EP300 inhibitor—C646—substantially reduced mRNA and protein levels of *ABCC10* (Figure 4F,G, respectively). Similarly, transcription of this gene was not considerably increased by a single dose of cisplatin. Expression of *ABCC4* expression remained at the same level regardless of acetyltransferase inhibition.

Having confirmed EP300 as an activator of *ABCC10* transcription under cisplatin-induced stress, in the next step, we tested the mutual interdependence between p53 and EP300-mediated expression of this gene in both phenotypes of MDA-MB-231 cells. Similar to lung cancer, p53 was necessary for EP300-mediated induction of *ABCC10* expression by cisplatin (Figure 4H,I). Transient silencing of p53 did not allow for the increase in EP300-dependent gene transcription in MDA-MB-231 non-resistant cells. Moreover, none of the tested conditions had a significant impact on *ABCC4* expression. Furthermore, deficiency of p53 did not alter *ABCC10* transcription in cisplatin-resistant cells, thereby suggesting that this protein is crucial for the direct gene response to cisplatin (Figure 4J,K).

Overall, these data suggest that EP300 acts as a key activator of *ABCC10* in cisplatin-treated MDA-MB-231 cells but requires p53 to trigger direct *ABCC10* transcription in response to the drug.

4. Discussion

Our study demonstrates a novel mechanism that involves cooperation between EP300 and p53 and explains differences in expression of ABC family transporters between non-resistant and cisplatin-resistant NSCLC and TNBC cells. We provide experimental evidence that exposure of non-small cell lung and triple-negative breast cancer cells to cisplatin is associated with the recruitment of acetyltransferase and p53-dependent activation of the *ABCC10* promoter. The product of this gene was shown to confer resistance to a variety of drugs, including taxanes, nucleoside analogs, epothilone B, Vinca alkaloids, anthracyclines, but also to gefitinib, which acts as an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) that is often considered clinically as first-line therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) with EGFR-activating mutations [34,35]. Although *ABCC10* was shown to be highly expressed in non-small cell lung cancer cells and serves as a predictive marker for multi-drug resistance, our

results show that it can be further elevated by cancer cell exposure to an alkylating drug—cisplatin [34,36]. Despite over two decades of comprehensive research on the topic of multidrug resistance, or in particular, gained during cisplatin-based chemotherapy, this cancer cell feature remains elusive and is assigned to various pathways, machineries, and biological molecules. According to the current state of knowledge, abnormal patterns of epigenetic changes, such as methylation and acetylation, can be responsible for the development of multidrug resistance in cancer. An altered methylation pattern was detected in the promoters of *ABCB1*, *ABCC1*, and *ABCG2* in breast and lung cancer, whereas the defective activity of histone acetylases including EP300, CBP, and PCAF was reported to be implicated in *ABCB1* overexpression [37,38]. These findings underline the necessity of a deep understanding of epigenetic landscapes, which drives the formation of multi-drug-resistant phenotypes in human tumors, to successfully target drug-resistant phenotypes. In a relatively recent report, EP300 bromodomain inhibitor, I-CBP112, was shown to decrease the expression of *ABCC1*, *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC5*, and *ABCC10* transporters in MDA-MB-231 cells [27]. Similarly, knockdown of EP300 decreased the expression of *ABCC1* and *ABCG2* in TNBC cells, thereby suggesting the crucial role of the acetyltransferase interaction with chromatin on the high transcription efficacy of some ABC gene family members associated with neoplastic transformation. Considering our current study, EP300 emerges as a key, chromatin-bound enzyme responsible for *ABCC10* overexpression in cisplatin-resistant cancer cells of different tissue origin, e.g., lung and breast [39]. Hence, the above-mentioned enzyme may be considered in the future as a target for breaking multi-drug resistance in some types of cisplatin-resistant cancers. To date, C646 has been documented to transcriptionally repress tumor formation in breast and pancreatic cancer growth by suppressing cyclin B1 and CDK1 [40,41]. Depending on its target and tissue, EP300 plays different roles in tumorigenesis and multi-drug resistance. Zhou et al. proposed a mechanism of EP300 downregulation by miR-106b~25, which increased tolerance to doxorubicin and helped to avoid doxorubicin-induced senescence in breast cancer cells [42]. In turn, increased activity of EP300 correlated with enhanced resistance to a variety of compounds in prostate cancer [43–45]. In breast cancer cells, inhibition of acetyltransferase sensitized cancer cells to a variety of chemotherapeutics, by impeding drug efflux and increasing drug accumulation [27].

Our current study provides evidence on the role of EP300 in cancer cell response to cisplatin and the possible involvement of this enzyme in gaining a multidrug-resistant phenotype of A549 and MDA-MB-231 cell lines. Such a hypothesis is supported by the fact that EP300 inhibitor prevents the cisplatin-induced direct increase in *ABCC10* transcription and reduces higher *ABCC10* expression in the cisplatin-resistant phenotype. In the initial phase of development of cell resistance to cisplatin and other chemotherapeutics, which in our model, was triggered by cancer cell exposure to the alkylating drug, acetyltransferase is recruited to the gene promoter of *ABCC10*, where it facilitates gene expression and maintains it at a higher level in drug-resistant cells, which are generally characterized by EP300-enriched chromatin. The observed higher abundance of the enzyme in nuclei of cisplatin-resistant phenotypes may further suggest that EP300 supports the loss of cancer cell vulnerability to chemotherapeutics by controlling the transcription of numerous genes other than *ABCC10*, which allows cells to overcome anticancer drug toxicity or influx. Such an option may be supported by the study that was focused on the antiapoptotic *BCL2* gene, which emerged transcriptionally to be controlled by EP300 in cardiac myocytes, whereas the CtBP1–p300–FOXO3a complex acts as a transcriptional repressor of the apoptotic regulators Bax and Bim in human osteosarcoma cells [46,47].

EP300 activity was insufficient to increase *ABCC10* transcription in response to the alkylating agent upon p53 deficiency; however, the latter protein was dispensable for the maintenance of high gene transcription in cisplatin-resistant cells. This suggests that p53 might be necessary for the recruitment of EP300 to the gene promoter but does not assist the interaction of the enzyme with chromatin after binding to DNA. Such a possibility seems to be supported by confocal imaging of immunostained acetyltransferase in non-resistant

A549 cells exposed to cisplatin, where strong enrichment of chromatin-bound EP300 was only observed in a p53 proficient background; however, p53 deficiency did not affect higher acetyltransferase abundance in the nuclei of the cisplatin-resistant phenotype. In line with our findings, numerous other papers describe p53 as a driver of cell adaptation to the alkylating agent. Cisplatin-resistant squamous head and neck carcinoma that bears cytoplasm-accumulated mutant p53—but not with mutant p53—accumulated in the nucleus and overexpressed glutathione, *ABCC2*, and *ABCG2* [48]. p53 was also reported to increase drug efflux independently from ABC-transcription regulation. Together with the Rab-coupling protein, this tumor suppressor was reported to facilitate *ABCB1* reconstitution to the plasma membrane, thereby increasing cisplatin efflux [49]. The role of p53 in the development of cell resistance to cisplatin goes beyond alteration in drug efflux. This protein was reported to contribute to apoptosis evasion of NSCLC cells H1299 by interacting with caspase 9, hence preventing its cleavage and activation [24]. In RAS-mutant ovarian cancer, p53 induces HDAC4 phosphorylation and cytoplasmic translocation, therefore increasing the expression of Atg3, Atg12, and LC3B, in turn promoting cisplatin-induced apoptosis escape via autophagy [50].

In our model, p53 emerged indispensable for EP300-dependent increase in *ABCC10* in non-resistant NSCLC and TNBC cells treated with a single dose of cisplatin. This might be mechanistically explained by the documented involvement of p53 in the acetylase interaction with DNA. Both mutant and wild-type tumor suppressors were shown to activate the acetyltransferase activity of p300 through the enhancement of p300 autoacetylation, which resulted in the accumulation of the enzyme near the transcription start sites and the enrichment of transcription-activating histone marks [26]. Furthermore, cisplatin-induced recruitment of EP300 by p53 has already been reported; Liu et al. observed EP300/CITED2 enrichment at the promoter of *ERCC1* that was mediated by p53 after cell exposure to an alkylating drug [51]. Of note, *ERCC1* acts as an endonuclease responsible for the 5'-incision during DNA repair. These findings suggest that the protein, which is known as a tumor suppressor, may help cancer cells gain a drug-resistant phenotype. Interdependence between EP300 and p53 occurs in both tested cell lines, regardless of their p53 status. A549 cells express wild-type p53, whereas MDA-MB-231 cells possess single R280K mutants [52]. This natively occurring gain of function mutation in MDA-MB-231 cells correlates with the number of cancer cell processes, including proliferation, metastasis and apoptosis evasion [53,54]. The missense mutation limits interactions between the protein and DNA by removing two hydrogen bonds that are formed between R280 and the DNA in wild-type p53, potentially decreasing its activity [55,56]. According to the study by Vrba et al., due to limited DNA binding ability, R280K p53 mutant selectively recognizes transcriptionally active promoters with high levels of acetylation [57]. Assuming that in our ABCC genes, which are actively transcribed upon cisplatin treatment or in cisplatin-resistant phenotype, one may expect that promoters of target ABCC genes are transcriptionally permissive and possess high levels of acetylation. Therefore, even the R280K mutant may interact with these regions. Increased affinity of p53 toward transcriptionally permissive genomic regions, which is caused by the gain of function mutation, may additionally stimulate ABCC gene expression and, hence, enhance chemoresistant phenotype of cancer cells. Conversely, considering the relevance of promoter acetylation that is vital for the R280K p53 mutant to bind the DNA, inhibition of Ep300 may be considered as an alternative treatment against cancers possessing the p53 mutation, by hampering promoter acetylation and thus mutant p53 binding to the target promoters.

Another aspect that deserves attention is the chromatin architecture at the gene promoters that allows for or interferes with p53-dependent gene activation by EP300 in response to cisplatin. In both considered cell lines, non-small cell lung cancer and triple-negative breast cancer, the promoters of genes, which were not overexpressed in the cisplatin-resistant phenotype, were enriched in components of the CoREST repressive complex such as CoREST (RCOR1—REST corepressor 1) and enzymatically active subunits: HDAC1 and LSD1. The last two enzymes were successfully targeted with their inhibitors, which unlocked

suppressed transcription of *ABCC3* and *ABCC4* in A549 and MDA-MB-231 cell lines, respectively. Although CoREST protein was detected at the above-mentioned gene promoters, the dominant role of HDAC1 and LSD1 in gene repression varied between the two cell lines. LSD1 inhibitor increased transcription of *ABCC4*, whereas the effect of pan-HDAC inhibitor was observed for *ABCC3*. This may be explained by the presence of various transcription coactivators or histone marks (particularly K4meK9ac, K4meK9, and K4K9ac) at the gene promoters since the cross-talk between LSD1 and HDAC1 is shaped by the substrate availability [31]. The role of HDAC and LSD1-dependent gene repression in the regulation of drug resistance in cancer has already been documented. Wang et al. observed increased expression of the *ABCC10* transporter, while the expression of *ABCC3* was lowered in A549 and HCT116 cells after iHDACs (SAHA and TSA) treatment [58]. In a study by Shi et al., sodium butyrate sensitized HCT116 and A549 cells to chlorambucil; however, simultaneously, resistance to 5-fluorouracil was enhanced [59]. This suggests that the effect of HDAC inhibitors may depend on the drug that the inhibitor is combined with or on the specificity of the HDAC inhibitor since the referred sodium butyrate lacks specificity toward any particular HDAC. Moreover, the effect of simultaneous deficiency of two or more HDACs activity may vary from inhibition of a single enzyme. The other CoREST complex member, LSD1, was reported to repress *ABCC1* and *ABCC10* gene expression upon inhibition of EP300 in the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231 [27]. Bearing in mind that the promoter of *ABCC10* is not repressed by LSD1 and HDACs in MDA-MB-231 and A549 cells, nor enriched in CoREST protein, the deficiency of EP300 activity seems to recruit histone demethylase or the entire CoREST complex to the *ABCC10* gene regulatory element. Moreover, inversely, the lack of the CoREST repressive complex at the *ABCC10* promoter allows for EP300 binding and transcription enhancement in cancer cells treated with cisplatin. Therefore, the CoREST complex seems to mark promoters of *ABCC* genes, which remain irresponsive to stimulation with cisplatin. Considering our findings, CoREST distribution in the genome may be considered as a predictive marker of *ABCC* gene response to cisplatin-based chemotherapy. Specific inhibitors of inducible membrane transporters may be combined with alkylating drugs in future work to overcome multi-drug resistance caused by increasing the expression of the CoREST-free *ABCC* transporter during chemotherapy. Furthermore, other areas are worth considering with possible clinical perspectives. These include CoREST involvement in the development of cancer cell resistance to other chemotherapeutics, particularly anthracyclines, the contribution of this repressive complex to modulate other cancer-promoting gene expressions during chemotherapy, and the applicability of the above-described CoREST-p53-EP300 interdependence to p53-mutated tumors.

5. Conclusions

In summary, our study reveals a novel interdependence between CoREST occurrence at the *ABCC* gene promoters and their responsiveness to cisplatin. We provide an insight into p53-dependent transcriptional activation of CoREST-free *ABCC10* by EP300 in cells exposed to an alkylating drug. Acetyltransferase is responsible for higher *ABCC10* expression in cisplatin-resistant non-small cell lung and triple-negative breast cancer cell lines. The described regulatory mechanism may be of particular importance for future anti-cancer treatment approaches involving cisplatin.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers14040894/s1>, Figure S1: Full Western blot images; Figure S2: p53-dependent response of *ABCC2* and *ABCC5* to cisplatin; Table S1: Raw data and statistical analysis. Table S2: Densitometry readings/ratios for all presented Western blot images.

Author Contributions: Conceptualization, A.R.; methodology, A.R. and M.S. (Maciej Sobczak); validation, M.S. (Maciej Sobczak) and A.R.; investigation, M.S. (Maciej Sobczak), M.S. (Magdalena Strachowska), K.G. and A.R.; resources, A.R.; writing—original draft preparation, M.S. (Maciej Sobczak) and A.R.; writing—review and editing, M.S. (Maciej Sobczak), M.S. (Magdalena Stra-

chowska), K.G. and A.R.; supervision, A.R.; project administration, A.R.; funding acquisition, A.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

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

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the supplementary material Table S1.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Zhang, Q.; Lu, Q. Bin New Combination Chemotherapy of Cisplatin with an Electron-Donating Compound for Treatment of Multiple Cancers. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 788. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Fennell, D.A.; Summers, Y.; Cadranell, J.; Benepal, T.; Christoph, D.C.; Lal, R.; Das, M.; Maxwell, F.; Visseren-Grul, C.; Ferry, D. Cisplatin in the Modern Era: The Backbone of First-Line Chemotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Treat. Rev.* **2016**, *44*, 42–50. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Wishart, D.S.; Feunang, Y.D.; Guo, A.C.; Lo, E.J.; Marcu, A.; Grant, J.R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Sayeeda, Z.; et al. DrugBank 5.0: A Major Update to the DrugBank Database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D1074–D1082. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. O’Grady, S.; Finn, S.P.; Cuffe, S.; Richard, D.J.; O’Byrne, K.J.; Barr, M.P. The Role of DNA Repair Pathways in Cisplatin Resistant Lung Cancer. *Cancer Treat. Rev.* **2014**, *40*, 1161–1170. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Dilruba, S.; Kalayda, G.V. Platinum-Based Drugs: Past, Present and Future. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2016**, *77*, 1103–1124. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Galluzzi, L.; Senovilla, L.; Vitale, I.; Michels, J.; Martins, I.; Kepp, O.; Castedo, M.; Kroemer, G. Molecular Mechanisms of Cisplatin Resistance. *Oncogene* **2012**, *31*, 1869–1883. [\[CrossRef\]](#)
7. Lan, D.; Wang, L.; He, R.; Ma, J.; Bin, Y.; Chi, X.; Chen, G.; Cai, Z. Exogenous Glutathione Contributes to Cisplatin Resistance in Lung Cancer A549 Cells. *Am. J. Transl. Res.* **2018**, *10*, 1295–1309. [\[PubMed\]](#)
8. Rees, D.C.; Johnson, E.; Lewinson, O. ABC Transporters: The Power to Change. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 218–227. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Hilgeroth, A.; Hemmer, M.; Coburger, C. The Impact of the Induction of Multidrug Resistance Transporters in Therapies by Used Drugs: Recent Studies. *Mini Rev. Med. Chem.* **2012**, *12*, 1127–1134. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Li, Y.; He, L.R.; Gao, Y.; Zhou, N.N.; Liu, Y.; Zhou, X.K.; Liu, J.F.; Guan, X.Y.; Ma, N.F.; Xie, D. CHD1L Contributes to Cisplatin Resistance by Upregulating the ABCB1–NF-KB Axis in Human Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 99. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Zhou, Y.; Ling, X.L. Establishment of a Cisplatin-Induced Multidrug Resistance Cell Line SK-Hep1/DDP. *Chin. J. Cancer* **2010**, *29*, 167–171. [\[CrossRef\]](#)
12. Materna, V.; Liedert, B.; Thomale, J.; Lage, H. Protection of Platinum–DNA Adduct Formation and Reversal of Cisplatin Resistance by Anti-MRP2 Hammerhead Ribozymes in Human Cancer Cells. *Int. J. Cancer* **2005**, *115*, 393–402. [\[CrossRef\]](#)
13. Savaraj, N.; Wu, C.; Wangpaichitr, M.; Kuo, M.T.; Lampidis, T.; Robles, C.; Furst, A.J.; Feun, L. Overexpression of Mutated MRP4 in Cisplatin Resistant Small Cell Lung Cancer Cell Line: Collateral Sensitivity to Azidothymidine. *Int. J. Oncol.* **2003**, *23*, 173–179. [\[CrossRef\]](#)
14. Weaver, D.A.; Crawford, E.L.; Warner, K.A.; Elkhairi, F.; Khuder, S.A.; Willey, J.C. ABCC5, ERCC2, XPA and XRCC1 Transcript Abundance Levels Correlate with Cisplatin Chemoresistance in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines. *Mol. Cancer* **2005**, *4*, 18. [\[CrossRef\]](#)
15. Jaromi, L.; Csongei, V.; Vesel, M.; Abdelwahab, E.M.M.; Soltani, A.; Torok, Z.; Smuk, G.; Sarosi, V.; Pongracz, J.E. Kras and Egfr Mutations Differentially Alter Abc Drug Transporter Expression in Cisplatin-Resistant Non-Small Cell Lung Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5384. [\[CrossRef\]](#)
16. Fletcher, J.I.; Haber, M.; Henderson, M.J.; Norris, M.D. ABC Transporters in Cancer: More than Just Drug Efflux Pumps. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 147–156. [\[CrossRef\]](#)
17. Miller, D.S. Regulation of ABC Transporters Blood-Brain Barrier: The Good, the Bad, and the Ugly. *Adv. Cancer Res.* **2015**, *125*, 43–70. [\[CrossRef\]](#)
18. Crawford, R.R.; Potukuchi, P.K.; Schuetz, E.G.; Schuetz, J.D. Beyond Competitive Inhibition: Regulation of ABC Transporters by Kinases and Protein-Protein Interactions as Potential Mechanisms of Drug-Drug Interactions. *Drug Metab. Dispos.* **2018**, *46*, 567. [\[CrossRef\]](#)
19. Bush, J.A.; Li, G. Cancer Chemoresistance: The Relationship between P53 and Multidrug Transporters. *Int. J. Cancer* **2002**, *98*, 323–330. [\[CrossRef\]](#)
20. Scotto, K.W. Transcriptional Regulation of ABC Drug Transporters. *Oncogene* **2003**, *22*, 7496–7511. [\[CrossRef\]](#)

21. Garg, N.; Kumar, P.; Gadhave, K.; Giri, R. The Dark Proteome of Cancer: Intrinsic Disorderedness and Functionality of HIF-1 α along with Its Interacting Proteins. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2019**, *166*, 371–403. [\[CrossRef\]](#)
22. Sobczak, M.; Pietrzak, J.; Płoszaj, T.; Robaszkiewicz, A. BRG1 Activates Proliferation and Transcription of Cell Cycle-Dependent Genes in Breast Cancer Cells. *Cancers* **2020**, *12*, 349. [\[CrossRef\]](#)
23. Ito, A.; Lai, C.H.; Zhao, X.; Saito, S.; Hamilton, M.H.; Appella, E.; Yao, T.P. P300/CBP-Mediated P53 Acetylation Is Commonly Induced by P53-Activating Agents and Inhibited by MDM2. *EMBO J.* **2001**, *20*, 1331. [\[CrossRef\]](#)
24. Chee, J.L.Y.; Saidin, S.; Lane, D.P.; Leong, S.M.; Noll, J.E.; Neilsen, P.M.; Phua, Y.T.; Gabra, H.; Lim, T.M. Wild-Type and Mutant P53 Mediate Cisplatin Resistance through Interaction and Inhibition of Active Caspase-9. *Cell Cycle* **2013**, *12*, 278. [\[CrossRef\]](#)
25. Ghosh, R.; Kaypee, S.; Shasmal, M.; Kundu, T.K.; Roy, S.; Sengupta, J. Tumor Suppressor P53-Mediated Structural Reorganization of the Transcriptional Coactivator P300. *Biochemistry* **2019**, *58*, 3434–3443. [\[CrossRef\]](#)
26. Kaypee, S.; Sahadevan, S.A.; Patil, S.; Ghosh, P.; Roy, N.S.; Roy, S.; Kundu, T.K. Mutant and Wild-Type Tumor Suppressor P53 Induces P300 Autoacetylation. *iScience* **2018**, *4*, 260. [\[CrossRef\]](#)
27. Strachowska, M.; Gronkowska, K.; Michlewska, S.; Robaszkiewicz, A. Cbp/P300 Bromodomain Inhibitor-i-Cbp112 Declines Transcription of the Key Abc Transporters and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapy Drugs. *Cancers* **2021**, *13*, 4614. [\[CrossRef\]](#)
28. Wang, H.; Huang, C.; Zhao, L.; Zhang, H.; Yang, J.M.; Luo, P.; Zhan, B.X.; Pan, Q.; Li, J.; Wang, B.L. Histone Deacetylase Inhibitors Regulate P-Gp Expression in Colorectal Cancer via Transcriptional Activation and mRNA Stabilization. *Oncotarget* **2016**, *7*, 49848. [\[CrossRef\]](#)
29. Kim, S.A.; Zhu, J.; Yennawar, N.; Eek, P.; Tan, S. Crystal Structure of the LSD1/CoREST Histone Demethylase Bound to Its Nucleosome Substrate. *Mol. Cell* **2020**, *78*, 903–914.e4. [\[CrossRef\]](#)
30. Qureshi, I.A.; Gokhan, S.; Mehler, M.F. REST and CoREST Are Transcriptional and Epigenetic Regulators of Seminal Neural Fate Decisions. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 4477. [\[CrossRef\]](#)
31. Song, Y.; Dagil, L.; Fairall, L.; Robertson, N.; Wu, M.; Ragan, T.J.; Savva, C.G.; Saleh, A.; Morone, N.; Kunze, M.B.A.; et al. Mechanism of Crosstalk between the LSD1 Demethylase and HDAC1 Deacetylase in the CoREST Complex. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 2699–2711.e8. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Charlier, C.; Kintz, P.; Dubois, N.; Plomteux, G. Fatal Overdosage with Cisplatin. *J. Anal. Toxicol.* **2004**, *28*, 138–140. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Pietrzak, J.; Płoszaj, T.; Pułaski, Ł.; Robaszkiewicz, A. EP300-HDAC1-SWI/SNF Functional Unit Defines Transcription of Some DNA Repair Enzymes during Differentiation of Human Macrophages. *Biochim. Biophys. Acta-Gene Regul. Mech.* **2019**, *1862*, 198–208. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Sun, Y.L.; Chen, J.J.; Kumar, P.; Chen, K.; Sodani, K.; Patel, A.; Chen, Y.L.; Chen, S.D.; Jiang, W.Q.; Chen, Z.S. Reversal of MRP7 (ABCC10)-Mediated Multidrug Resistance by Tariquidar. *PLoS ONE* **2013**, *8*, 55576. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Zhao, H.; Huang, Y.; Shi, J.; Dai, Y.; Wu, L.; Zhou, H. ABCC10 Plays a Significant Role in the Transport of Gefitinib and Contributes to Acquired Resistance to Gefitinib in NSCLC. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1312. [\[CrossRef\]](#)
36. Oguri, T.; Ozasa, H.; Uemura, T.; Bessho, Y.; Miyazaki, M.; Maeno, K.; Maeda, H.; Sato, S.; Ueda, R. MRP7/ABCC10 Expression Is a Predictive Biomarker for the Resistance to Paclitaxel in Non-Small Cell Lung Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 1150–1155. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Zappe, K.; Cichna-Markl, M. Aberrant DNA Methylation of ABC Transporters in Cancer. *Cells* **2020**, *9*, 2281. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Toth, M.; Boros, I.M.; Balint, E. Elevated Level of Lysine 9-acetylated Histone H3 at the MDR1 Promoter in Multidrug-resistant Cells. *Cancer Sci.* **2012**, *103*, 659. [\[CrossRef\]](#)
39. Ring, A.; Kaur, P.; Lang, J.E. EP300 Knockdown Reduces Cancer Stem Cell Phenotype, Tumor Growth and Metastasis in Triple Negative Breast Cancer. *BMC Cancer* **2020**, *20*, 1–14. [\[CrossRef\]](#)
40. Li, Q.L.; Wang, D.Y.; Ju, L.G.; Yao, J.; Gao, C.; Lei, P.J.; Li, L.Y.; Zhao, X.L.; Wu, M. The Hyper-Activation of Transcriptional Enhancers in Breast Cancer. *Clin. Epigenetics* **2019**, *11*, 1–17. [\[CrossRef\]](#)
41. Ono, H.; Kato, T.; Murase, Y.; Nakamura, Y.; Ishikawa, Y.; Watanabe, S.; Akahoshi, K.; Ogura, T.; Ogawa, K.; Ban, D.; et al. C646 Inhibits G2/M Cell Cycle-Related Proteins and Potentiates Anti-Tumor Effects in Pancreatic Cancer. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 10078. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Zhou, Y.; Hu, Y.; Yang, M.; Jat, P.; Li, K.; Lombardo, Y.; Xiong, D.; Coombes, R.C.; Raguz, S.; Yagüe, E. 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.* **2014**, *21*, 462. [\[CrossRef\]](#)
43. Ono, H.; Basson, M.D.; Ito, H. P300 Inhibition Enhances Gemcitabine-Induced Apoptosis of Pancreatic Cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 51301. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Pan, W.; Zhang, Z.; Kimball, H.; Qu, F.; Berling, K.; Stopsack, K.H.; Lee, G.S.M.; Choueiri, T.K.; Kantoff, P.W. Abiraterone Acetate Induces CREB1 Phosphorylation and Enhances the Function of the CBP-P300 Complex, Leading to Resistance in Prostate Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* **2021**, *27*, 2087. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Gruber, M.; Ferrone, L.; Puh, M.; Santer, F.R.; Furlan, T.; Eder, I.E.; Sampson, N.; Schäfer, G.; Handle, F.; Culig, Z. P300 Is Upregulated by Docetaxel and Is a Target in Chemoresistant Prostate Cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **2020**, *27*, 187. [\[CrossRef\]](#)
46. Kawamura, T.; Ono, K.; Morimoto, T.; Akao, M.; Iwai-Kanai, E.; Wada, H.; Sowa, N.; Kita, T.; Hasegawa, K. Endothelin-1-Dependent Nuclear Factor of Activated T Lymphocyte Signaling Associates with Transcriptional Coactivator P300 in the Activation of the B Cell Leukemia-2 Promoter in Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* **2004**, *94*, 1492–1499. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

47. Li, C.; Xiao, X.Q.; Qian, Y.H.; Zhou, Z.Y. The CtBP1–P300–FOXO3a Transcriptional Complex Represses the Expression of the Apoptotic Regulators Bax and Bim in Human Osteosarcoma Cells. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 22365–22377. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Tonigold, M.; Rossmann, A.; Meinold, M.; Bette, M.; Märken, M.; Henkenius, K.; Bretz, A.C.; Giel, G.; Cai, C.; Rodepeter, F.R.; et al. A Cisplatin-Resistant Head and Neck Cancer Cell Line with Cytoplasmic P53(Mut) Exhibits ATP-Binding Cassette Transporter Upregulation and High Glutathione Levels. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2014**, *140*, 1689–1704. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Phatak, V.; von Grabowicki, Y.; Janus, J.; Officer, L.; Behan, C.; Aschauer, L.; Pinon, L.; Mackay, H.; Zanivan, S.; Norman, J.C.; et al. Mutant P53 Promotes RCP-Dependent Chemoresistance Coinciding with Increased Delivery of P-Glycoprotein to the Plasma Membrane. *Cell Death Dis.* **2021**, *12*, 207. [\[CrossRef\]](#)
50. Zhang, X.; Qi, Z.; Yin, H.; Yang, G. Interaction between P53 and Ras Signaling Controls Cisplatin Resistance via HDAC4- and HIF-1 α -Mediated Regulation of Apoptosis and Autophagy. *Theranostics* **2019**, *9*, 1096. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Liu, Y.C.; Chang, P.Y.; Chao, C.C.K. CITED2 Silencing Sensitizes Cancer Cells to Cisplatin by Inhibiting P53 Trans-Activation and Chromatin Relaxation on the ERCC1 DNA Repair Gene. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 10760. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Negrini, M.; Sabbioni, S.; Haldar, S.; Possati, L.; Castagnoli, A.; Corallini, A.; Barbanti-Brodano, G.; Croce, C.M.; Câțz, A. Tumor and Growth Suppression of Breast Cancer Cells by Chromosome 17-Associated Functions1. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 1818–1824. [\[PubMed\]](#)
53. Walerych, D.; Napoli, M.; Collavin, L.; Del Sal, G. The Rebel Angel: Mutant P53 as the Driving Oncogene in Breast Cancer. *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 2007–2017. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Pham, T.H.; Park, H.M.; Kim, J.; Hong, J.T.; Yoon, D.Y. STAT3 and P53: Dual Target for Cancer Therapy. *Biomedicines* **2020**, *8*, 637. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Gomes, A.S.; Trovão, F.; Andrade Pinheiro, B.; Freire, F.; Gomes, S.; Oliveira, C.; Domingues, L.; Romão, M.J.; Saraiva, L.; Carvalho, A.L. The Crystal Structure of the R280K Mutant of Human P53 Explains the Loss of DNA Binding. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1184. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. VCV000376657.7-ClinVar-NCBI. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/376657/?new_evidence=false (accessed on 2 February 2022).
57. Vrba, L.; Junk, D.J.; Novak, P.; Futscher, B.W. P53 Induces Distinct Epigenetic States at Its Direct Target Promoters. *BMC Genomics* **2008**, *9*, 486. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Wang, H.; Chi, C.H.; Zhang, Y.; Shi, B.; Jia, R.; Wang, B.J. Effects of Histone Deacetylase Inhibitors on ATP-Binding Cassette Transporters in Lung Cancer A549 and Colorectal Cancer HCT116 Cells. *Oncol. Lett.* **2019**, *18*, 63–71. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Shi, B.; Xu, F.F.; Xiang, C.P.; Jia, R.; Yan, C.H.; Ma, S.Q.; Wang, N.; Wang, A.J.; Fan, P. Effect of Sodium Butyrate on ABC Transporters in Lung Cancer A549 and Colorectal Cancer HCT116 Cells. *Oncol. Lett.* **2020**, *20*, 148. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Łódź, 6.04.2022

Mgr Maciej Sobczak
Katedra Biofizyki Ogólnej,
Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki,
Pomorska 141/143, 90-236, Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Sobczak, M.; Pitt, A.R.; Spickett, C.M.; Robaszkiewicz, A. PARP1 Co-Regulates EP300–BRG1-Dependent Transcription of Genes Involved in Breast Cancer Cell Proliferation and DNA Repair. *Cancers* 2019, 11, 1539. <https://doi.org/10.3390/cancers11101539> mój wkład w niniejszą pracę polegał na przeprowadzeniu eksperymentów, których wyniki zilustrowano na figurach: 1B, 1C, 2E, 2F, 2G, 3A, 3B, 3C, 3E, 4A, 4B, 4C, 4E; obróbce statystycznej i interpretacji wyników dotyczących wymienionych figur, przygotowaniu manuskryptu, edytowanie finalnej wersji manuskryptu. Swój wkład procentowy szacuję na 60%.

Sobczak, M.; Pietrzak, J.; Płoszaj, T.; Robaszkiewicz, A. BRG1 Activates Proliferation and Transcription of Cell Cycle-Dependent Genes in Breast Cancer Cells. *Cancers* 2020, 12, 349. <https://doi.org/10.3390/cancers12020349> mój wkład w niniejszą pracę polegał na przeprowadzeniu eksperymentów, których wyniki zilustrowano na figurach 1C, 1D, 1F, 2C, 2D, 2F, 3B, 4A; obróbce statystycznej (z wyjątkiem 2C) i interpretacji wyników dotyczących wymienionych figur, przygotowaniu manuskryptu, edytowanie finalnej wersji manuskryptu. Swój wkład procentowy szacuję na 40%.

Sobczak, M.; Strachowska, M.; Robaszkiewicz, A. Udział kompleksów SWI/SNF opartych na aktywności BRG1 w determinowaniu fenotypu komórek nowotworowych. *Postepy Biochem.* 2020, 10–18. https://doi.org/10.18388/pb.2020_312 mój wkład polegał na przygotowaniu manuskryptu, edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Swój wkład szacuję na 85%.

Sobczak, M.; Strachowska, M.; Gronkowska, K.; Robaszkiewicz, A. Activation of ABCC Genes by Cisplatin Depends on the CoREST Occurrence at Their Promoters in A549 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Cancers* 2022, 14, 894. <https://doi.org/10.3390/cancers14040894> mój wkład w niniejszą pracę polegał na przeprowadzeniu eksperymentów, których wyniki zilustrowano na figurach; 1A–1H, 2A, 2B (western blot dla ABCC3 i ABCC10), 2C, 2D, 2E, 2G, 2H (Western blot dla ABCC3), 2I, 2J (Western blot dla ABCC3), 3A, 3B, 3C (Western blot dla ABCC10), 3E, 3F, 3G (Western blot dla ABCC3), 3H, 3I (Western blot dla ABCC10), 4A, 4C (Western blot dla ABCC4), 4G (Western blot dla ABCC4 i ABCC10), 4K (Western blot dla ABCC10) obróbce statystycznej i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu, edytowanie finalnej wersji manuskryptu. Swój wkład procentowy szacuję na 70%.



(podpis)

Łódź, 06.04.2022

Dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz, prof. UŁ
Katedra Biofizyki Ogólnej,
Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki,
Pomorska 141/143, 90-236, Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Sobczak, M.; Pitt, A.R.; Spickett, C.M.; Robaszkiewicz, A. PARP1 Co-Regulates EP300–BRG1-Dependent Transcription of Genes Involved in Breast Cancer Cell Proliferation and DNA Repair. *Cancers* 2019, 11, 1539. <https://doi.org/10.3390/cancers11101539> mój wkład w niniejszą pracę polegał na zdefiniowaniu hipotezy badawczej, przeprowadzeniu eksperymentu, którego wyniki zilustrowano na figurach: 1A, 2A, 2B, 2C, 2D, 3D, 4D i Supplementary Table 1; obróbce statystycznej i interpretacji wyników dotyczących wymienionych figur, opracowaniu graficznym wyników do manuskryptu, przygotowaniu i edycji manuskryptu, procedowaniu procedur w czasopiśmie naukowym, przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów, zapewnieniu finansowania dla prowadzonych badań, sprawowaniu nadzoru merytorycznego i naukowego nad prowadzonymi badaniami.

Mój wkład procentowy szacuję na 25%.

Sobczak, M.; Pietrzak, J.; Płoszaj, T.; Robaszkiewicz, A. BRG1 Activates Proliferation and Transcription of Cell Cycle-Dependent Genes in Breast Cancer Cells. *Cancers* 2020, 12, 349. <https://doi.org/10.3390/cancers12020349> mój wkład w niniejszą pracę polegał na zdefiniowaniu hipotezy badawczej, przeprowadzeniu eksperymentów, których wyniki zilustrowano na figurach: 1A, 1B, 3D, 4B, 4C, 4D, przygotowaniu schematu na wykresie 4E; opracowaniu graficznym wyników do manuskryptu, przygotowaniu i edycji manuskryptu, procedowaniu procedur w czasopiśmie naukowym, przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów, zapewnieniu finansowania dla prowadzonych badań, sprawowaniu nadzoru merytorycznego i naukowego nad prowadzonymi badaniami.

Mój wkład procentowy szacuję na 29%.

Sobczak, M.; Strachowska, M.; Robaszkiewicz, A. Udział kompleksów SWI/SNF opartych na aktywności BRG1 w determinowaniu fenotypu komórek nowotworowych. *Postepy Biochem.* 2020, 10–18. https://doi.org/10.18388/pb.2020_312 mój wkład polegał na przygotowaniu koncepcji pracy przeglądowej, wyborze jej zakresu oraz źródeł informacji, edycji manuskryptu, procedowaniu procedur w czasopiśmie naukowym, przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów.

Swój wkład szacuję na 10%.

Sobczak, M.; Strachowska, M.; Gronkowska, K.; Robaszkiewicz, A. Activation of ABCC Genes by Cisplatin Depends on the CoREST Occurrence at Their Promoters in A549 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Cancers* 2022, 14, 894. <https://doi.org/10.3390/cancers14040894> mój wkład w niniejszą pracę polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej, przeprowadzeniu eksperymentów, których wyniki zilustrowano w wykresie 4B, 4D, 4E (Western blot dla ABCC4 i ABCC10), 4F, 4H, 4I (Western blot dla ABCC10), 4J, opracowaniu graficznym wyników, edycji manuskryptu, procedowaniu procedur w czasopiśmie naukowym, przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów, zapewnieniu finansowania dla prowadzonych badań, sprawowaniu nadzoru merytorycznego i naukowego nad prowadzonymi badaniami.

Mój wkład procentowy szacuję na 20%.

Apnieszko Robaszkiewicz
.....

(podpis)

Łódź, 06.04.2022

Dr n.med. Tomasz Płoszaj

Zakład Genetyki Klinicznej,

Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi,

Pomorska 251, 92-213, Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Sobczak, M.; Pietrzak, J.; Płoszaj, T.; Robaszkiewicz, A. BRG1 Activates Proliferation and Transcription of Cell Cycle-Dependent Genes in Breast Cancer Cells. *Cancers* 2020, 12, 349.

<https://doi.org/10.3390/cancers12020349> mój wkład w niniejszą pracę polegał na sprawowaniu nadzoru merytorycznego nad eksperymentami wykorzystującymi analizą bioinformatyczną i pomocy w wizualizacji wyników tej analizy, przeprowadzeniu analizy do wykresu 1E, opracowaniu statystycznym wyników prezentowanych na wykresie 2C.

Mój wkład procentowy szacuję na 1%.

Tomasz Płoszaj
.....

(podpis)

Łódź, 6.04.2022

Mgr Magdalena Strachowska
Katedra Biofizyki Ogólnej,
Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki,
Pomorska 141/143, 90-236, Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Sobczak, M.; Strachowska, M.; Robaszkiewicz, A. Udział kompleksów SWI/SNF opartych na aktywności BRG1 w determinowaniu fenotypu komórek nowotworowych. Postepy Biochem. 2020, 10–18. https://doi.org/10.18388/pb.2020_312 mój wkład polegał na wykonaniu figur i edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy szacuję na 5%.

Sobczak, M.; Strachowska, M.; Gronkowska, K.; Robaszkiewicz, A. Activation of ABCC Genes by Cisplatin Depends on the CoREST Occurrence at Their Promoters in A549 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Cancers* 2022, 14, 894. <https://doi.org/10.3390/cancers14040894> mój wkład polegał na wykonaniu części eksperymentów pokazanych na figurach 2B (Western blot dla H3), 2F (Western blot dla H3), 2H (Western blot dla H3), 2J (Western blot dla H3), 3C (Western blot dla H3), 3G (Western blot dla H3 i p53), 3I (Western blot dla H3 i p53), 4C (Western blot dla H3), 4E (Western blot dla H3), 4G (Western blot dla H3), 4I (Western blot dla H3 i p53), 4K (Western blot dla H3 i p53) oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy oceniam na 5%.



(podpis)

Łódź, 6.04.2022

Mgr Karolina Gronkowska

Katedra Biofizyki Ogólnej,

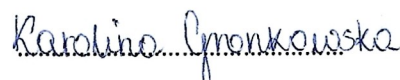
Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki,

Pomorska 141/143, 90-236, Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Sobczak, M.; Strachowska, M.; Gronkowska, K.; Robaszkiewicz, A. Activation of *ABCC* Genes by Cisplatin Depends on the CoREST Occurrence at Their Promoters in A549 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Cancers* 2022, 14, 894. <https://doi.org/10.3390/cancers14040894> mój udział polegał na wykonaniu eksperymentów pokazanych na figurach 2F (Western blot dla *ABCC3* i *ABCC10*), 2K, 3D, 4E (Western blot dla *ABCC3* i *ABCC10*) oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Swój udział oceniam na 5%.



(podpis)

Łódź, 05.04.2022

Dr Julita Pietrzak-Zwierzchowska

Katedra Biofizyki Ogólnej,

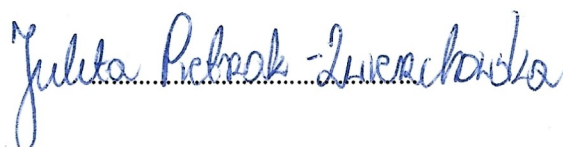
Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki,

Pomorska 141/143, 90-236, Łódź

Oświadczenie

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Sobczak, M.; Pietrzak, J.; Płoszaj, T.; Robaszkiewicz, A. BRG1 Activates Proliferation and Transcription of Cell Cycle-Dependent Genes in Breast Cancer Cells. *Cancers* 2020, 12, 349. <https://doi.org/10.3390/cancers12020349> mój wkład polegał na wykonaniu części doświadczeń ukazanych na figurach 2A, 2B, 2E, 3A, 3C, analizie i interpretacji wyników związanych z wyżej wymienionymi figurami oraz przygotowaniu manuskryptu. Swój udział procentowy szacuję na 30%.



(podpis)

Prof. Corinne M Spickett
School of Life & Health Sciences,
Aston University,
Aston Triangle, Birmingham, B4 7ET, UK
e-mail: c.m.spickett@aston.ac.uk

Birmingham, 20th Sept 2021

STATEMENT

I hereby declare that my contribution to the considered paper entitled **PARP1 Co-Regulates EP300-BRG1-Dependent Transcription of Genes Involved in Breast Cancer Cell Proliferation and DNA Repair** by Maciej Sobczak , Andrew R Pitt , Corinne M Spickett, Agnieszka Robaszkiewicz published in Cancers in 2019 (Oct 11;11(10):1539. DOI: 10.3390/cancers11101539) consisted of planning and supervision of the interactomics experiments. My contribution is valued as 5%.



Prof. Corinne M Spickett

Prof. Andrew R Pitt
School of Life & Health Sciences,
Aston University,
Aston Triangle, Birmingham, B4 7ET, UK
e-mail: a.r.pitt@aston.ac.uk

Birmingham, 1st October 2021

STATEMENT

I hereby declare that my contribution to the considered paper entitled **PARP1 Co-Regulates EP300-BRG1-Dependent Transcription of Genes Involved in Breast Cancer Cell Proliferation and DNA Repair** by Maciej Sobczak , Andrew R Pitt , Corinne M Spickett, Agnieszka Robaszkiewicz published in Cancers in 2019 (Oct 11;11(10):1539. DOI: 10.3390/cancers11101539) consisted of conducting mass spectrometry analysis and partial preparation of manuscript. My contribution is valued as 10%.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. R. Pitt', with a stylized, cursive script.

Prof. Andrew R Pitt