



SZKOŁA DOKTORSKA
BioMedChem

Uniwersytetu Łódzkiego
i Instytutów Polskiej
Akademii Nauk w Łodzi



Magdalena Alicja Strachowska

Praca doktorska:

**Przełamywanie oporności wielolekowej
nowotworów na poziomie genomu:
opracowanie metody zapobiegającej
nadekspresji transporterów ABC w
komórkach nowotworowych opartej na
inhibitorkach enzymów remodelujących
chromatynę**

Doctoral thesis:

**Overcoming multidrug resistance in
cancer at the genome level: developing a
method to counteract overexpression of
ABC transporters in cancer cells based on
inhibitors of chromatin remodeling
enzymes**

- Promotor/Supervisor
dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz, prof. UŁ
z Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu Łódzkiego

Składam serdeczne podziękowania dla Pani dr hab. Agnieszki Robaszkiewicz, prof. UŁ za pomoc, motywację do rozwoju naukowego oraz opiekę merytoryczną podczas przygotowania niniejszej pracy doktorskiej.

Z całego serca dziękuję pracownikom i doktorantom Katedry Biofizyki Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego za niezwykle pozytywną atmosferę w pracy, ogrom motywacji w bardziej „deszczowe” dni, dzielenie się ze mną swoim „know-how”, jak również za niezliczoną ilość frykasów, które nieraz poprawiały mi humor. Będę ciepło wspominać każdy spędzony z Wami dzień.

Największe podziękowania składam swojej Rodzinie, która była dla mnie ogromnym wsparciem, autorytetem oraz inspiracją podczas mojej przygody naukowej. Dziękuję za niezwykłą ciepłliwość, zaagażowanie oraz wyrozumiałość podczas słuchania moich uczelnianych opowieści oraz relacji z przeprowadzanych ekspreymentów, a także za wszystkie złote rady przy podejmowaniu ciężkich decyzji.

Spis treści

1.	Źródła finansowania pracy doktorskiej	4
2.	Dorobek naukowy	5
3.	Patenty	9
4.	Staże zagraniczne	9
5.	Wstęp	10
6.	Cel pracy	14
7.	Hipotezy badawcze.....	14
8.	Materiały i metody	16
9.	Omówienie wyników	26
10.	Wnioski	47
11.	Literatura	47
12.	Streszczenie pracy doktorskiej w języku polskim	49
13.	Streszczenie pracy doktorskiej w języku angielskim	51

Załączniki:

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

1. Źródła finansowania pracy doktorskiej

Grant Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Preludium 21 - 2022/45/N/NZ5/01371 pt. "Rola kompleksu PARP1/HPF1 w warunkowaniu oporności na doksorubicynę w potrójnie ujemnym raku piersi", kierownik: Mgr Magdalena Strachowska.



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



2. Dorobek naukowy

Niniejsza rozprawa doktorska oparta jest na 2 artykułach oryginalnych i dwóch pracach przeglądowych publikowanych w recenzowanych czasopismach.

Strachowska, M.; Gronkowska, K.; Michlewska, S.; Robaszkiewicz, A. (2021). CBP/p300 Bromodomain Inhibitor-I-CBP112 Declines Transcription of the Key ABC Transporters and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapy Drugs. Cancers, 13(18), 4614

IF = 6,575, MNiSW = 140 pkt

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na wykonaniu eksperymentów określających wpływ I-CBP112 na uwrażliwienie komórek na działanie cytostatyków (w tym test wykorzystujący resazurynę oraz ApoTox-Glo Triplex Assay), porównaniu działania I-CBP112 oraz powszechnie stosowanych inhibitorów ABC, określeniu zmian w ekspresji trasnporterów ABC po zastosowaniu badanego inhibitora (w tym wykonanie Real-Time PCR, Western Blot oraz mikroskopii konfokalnej) oraz jego wpływie na akumulowanie leków, porównaniu działania I-CBP112 w linii MDA-MB-231 z linią HepG2, analizie statystycznej oraz interpretacji otrzymanych wyników, przygotowaniu figur, tekstu manuskryptu oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu.

Swój udział procentowy oceniam na 45%.

Strachowska, M.; Gronkowska, K.; Sobczak, M.; Grodzicka, M.; Michlewska, S.; Kołacz, K.; Sarkar, T.; Korszun, J.; Ionov, M.; Robaszkiewicz, A. (2023). I-CBP112 declines overexpression of ATP-binding cassette transporters and sensitized drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines to chemotherapy drugs. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie, 168, 115798.

IF = 7.419, MNiSW = 140 pkt

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na wykonaniu eksperymentów dotyczących potwierdzenia oporności uzyskanych linii MDA-MB-231 (w tym ocena wrażliwości na cytostatyki oraz analiza ekspresji transporterów ABC z wykorzystaniem techniki Real-Time PCR, Western Blot oraz mikroskopii konfokalnej), określeniu wpływu I-CBP112 na ekspresję trasnporterów ABC oraz akumulację leków (Real-Time PCR, Western Blot oraz mikroskopia konfokalna, ponadto dla akumulacji leków wykonana została cytometria przepływową), wygenerowaniu sferoidów oraz weryfikacji wpływu I-CBP112 na akumulowanie leków wewnątrz kultur 3D, porównaniu nasilenia działania wybranych cytostatyków po zastosowaniu I-CBP112 oraz powszechnie używanych

inhibitorów ABC, określeniu stopnia apoptozy oraz obkurczania się sferoidów po inkubacji z I-CBP112 oraz wybranymi cytostatykami, ocena profilu bezpieczeństwa badanego inhibitora względem komórek prawidłowych, jego wpływ na polaryzację makrofagów, a także wykonanie testu *in silico* w celu charakterystyki właściwości ADMET, wykonaniu immunofenotypowania wyizolowanych monocytów oraz limfocytów, analizie statystycznej oraz interpretacji otrzymanych wyników, przygotowaniu figur, tekstu manuskryptu oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy oceniam na 35%.

Strachowska, M.; Robaszkiewicz, A. (2024). Characteristics of anticancer activity of CBP/p300 inhibitors - Features of their classes, intracellular targets and future perspectives of their application in cancer treatment. Pharmacology & therapeutics, 257, 108636.

IF = 13,5, MNiSW = 200 pkt

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na wykonaniu części analiz *in silico* off-targetów, farmakokinetyki, właściwości ADMET oraz dokowania molekularnego badanych inhibitorów CBP/p300, przygotowaniu pierwotnej oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu, a także współuczestniczeniu w odpowiedzi na recenzje.

Swój udział procentowy oceniam na 50%.

Kołacz, K.; Gronkowska, K.; **Strachowska, M.; Robaszkiewicz, A.** Poliploidia jako rezultat terapii przeciwnowotworowych i przyczyna braku ich skuteczności. Postępy biochemii, 325 – 335.

MNiSW = 70 pkt

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na przygotowaniu pierwotnej oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu, wykonaniu rycin 2, a także współuczestniczeniu w odpowiedzi na recenzje.

Swój udział procentowy oceniam na 25%.

Suma: 550 pkt MNiSW, IF = 27,494

Pozostały dorobek naukowy:

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

MNiSW = 20 pkt

Sobczak, M., **Strachowska, M.**, Gronkowska, K., Karwaciak, I., Pułaski, Ł., Robaszkiewicz, A. (2021). LSD1 Facilitates Pro-Inflammatory Polarization of Macrophages by Repressing Catalase. Cells, 10(9), 2465.

IF = 7.666, MNiSW = 140 pkt

Sobczak, M., **Strachowska, M.**, Gronkowska, K., Robaszkiewicz, A. (2022). Activation of ABCC Genes by Cisplatin Depends on the CoREST Occurrence at Their Promoters in A549 and MDA-MB-231 Cell Lines. Cancers, 14(4), 894.

IF = 5.2, MNiSW = 140 pkt

Gronkowska, K., Michlewska, S., Płoszaj, T., **Strachowska, M.**, Stępień, A., Maciej Borowiec, M., Bednarek, A., Robaszkiewicz, A. Pharmacological inhibition of SWI/SNF with PFI3 or SMARCA2/4 PROTAC degrader ACBI1 ameliorates paclitaxel-induced cancer drug resistance by repressing ABCC membrane transporters – w recenzji

Suma: 300 pkt MNiSW, IF = 12,866

Komunikaty zjazdowe

Międzynarodowe

Strachowska, M.; Sobczak, M.; Gronkowska, K.; Robaszkiewicz, A. “*LSD1 contributes to defining pro-inflammatory phenotype of human macrophages by repressing catalase*”. 20th Biennial Meeting of SFRR International - konferencja online (15.03 -18.03.2021r.)

Strachowska, M.; Sobczak, M.; Robaszkiewicz, A. „*The impact of PARP inhibitors on transcription of multidrug resistance-relevant ABC transporters in the triple negative breast cancer cells*”. EMBL Conference: Chromatin and Epigenetics - konferencja online (17.05 - 20.05.2021r.)

Strachowska, M.; Sobczak, M.; Gronkowska, K.; Robaszkiewicz, A." *Effects of LSD1 inhibition on macrophage specialization into a proinflammatory phenotype*". SciForum: 1st International Electronic Conference on Molecular Sciences: Druggable Targets of Emerging Infectious Diseases - konferencja online (1.09 -14.09.2021r.)

Strachowska, M.; Robaszkiewicz, A. „*Effect of PARP inhibitors on the regulation of ABC transporters expression in breast cancer cells*”. FEBS Lecture Course - "FEBS Advances Lectures Course PARP2021" - Barcelona, Hiszpania (7.09 - 10.09.2021r.)

Strachowska, M.; Robaszkiewicz, A. “*Bromodomain inhibitor I-CBP112 breaks multidrug resistance conferred by overexpression of ABC transporters in cisplatin-resistant triple negative breast cancer*”. The Biochemistry Global Summit - the 25th IUBMB, 46th FEBS and 15th PABMB Congresses - Lizbona, Portugalia (9.07 - 14.07.2022r.)

Strachowska, M.; Robaszkiewicz, A. „*HPF1-dependent ADP-ribosylation of serine residues confers doxorubicin resistance in a model of triple negative breast cancer*”. EMBO|FEBS Lecture Course - Molecular mechanisms in signal transduction and cancer – Spetses, Grecja (16.08 - 24.08.2022r.)

Sobczak, M.; **Strachowska, M.**; Gronkowska, K.; Robaszkiewicz, A." *p53 as a direct inducer of ABCC10 expression in A549 and MDA-MB-231 cells in response to cisplatin*”. 4th ISFMS-Biochemistry, Molecular Biology and Druggability of Proteins – Florencja, Włochy (6.09 - 9.09.2022r.)

Strachowska, M.; Robaszkiewicz, A. “*Multidrug resistance beware! CBP/p300 bromodomain inhibitor is coming!*”. Clinical Epigenetics International Conference 2023 - Szczecin (24.06-26.06.2023r.)

Strachowska, M.; Robaszkiewicz, A. “*HPF1-dependent ADP-ribosylation of serine residues and its impact on the phenomenon of multidrug resistance*”. 8th Warsaw Conference on Perspectives of Molecular Oncology, Warszawa (7 - 8.09.2023r.)

Gronkowska, K.; Michlewska, S.; Płoszaj, T.; Kołacz, K.; **Strachowska, M.**; Borowiec, M.; Robaszkiewicz, A. „*HIF1A-EP300-BRG1 functional crosstalk on the chromatin defines transcription of ABC transporters in paclitaxel resistant breast and lung cancers*”. 23rd FEBS Young Scientists’ Forum (YSF), Pawia, Włochy (26-29.06.2024r.)

Gronkowska, K.; Michlewska, S.; Płoszaj, T.; Kołacz, K.; **Strachowska, M.**; Borowiec, M.; Robaszkiewicz, A. „*HIF1A-EP300-BRG1 functional crosstalk on the chromatin defines transcription of ABC transporters in paclitaxel resistant breast and lung cancers*”. FEBS Congress, Mediolan, Włochy (29.06-03.07.2024r.)

Krajowe

Strachowska, M.; Robaszkiewicz, A. „*Kompleks PARP1/HPF1 w walce z opornością wielolekową komórek nowotworowych - molekularny klucz do sukcesu?*”. IX Ogólnopolska Konferencja Biologii Molekularnej, Łódź (14 - 15.03.2024r.)

Strachowska, M.; Robaszkiewicz, A. „*Identification of a transcription factor involved in the regulation of PARP-dependent ABC gene expression*”. VI Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Biologii Medycznej, Warszawa (19-21.09.2024 r.)

Gronkowska, K.; Michlewska, S.; Płoszaj, T.; **Strachowska, M.**; Borowiec, M.; Robaszkiewicz. „*SWI/SNF inhibitor PFI3 and SMARCA2/4 PROTAC degrader ACBI1 as potential chemosensitizers in paclitaxel-resistant breast and lung cancers*”. VI Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Biologii Medycznej, Warszawa (19-21.09.2024 r.) – II miejsce w sesji posterowej Młodych Naukowców

3. Patenty

Współautor patentu zatytułowanego „Inhibitor acetyltransferazy do zastosowania do leczenia niedrobnokomórkowego raka płuc”. Numer prawa wyłącznego: Pat.245595.

4. Staże zagraniczne

Staż zagraniczny finansowany w ramach programu PROM 2023 w Laboratorium Lóránta Székvolgyi na Uniwersytecie w Debreczynie, Węgry. Podczas stażu zdobyłam wiedzę niezbędną do wykonania metody ChIP-Seq zaplanowanej w ramach projektu Preludium 21.

5. Wstęp

Niezależnie od nieustannych starań naukowców w poszukiwaniu innowacyjnych terapii w walce z nowotworami, nie udało się do tej pory znaleźć idealnego rozwiązania. European Cancer Information donosi, że na przestrzeni kilkunastu lat liczba przypadków śmiertelnych z powodu raka może być nawet o 27,6% wyższa w porównaniu z rokiem 2022 – i wzrosnąć z 1,33 mln do 1,68 mln przypadków. Według WHO 1 na 5 osób zachoruje na nowotwór, przy czym u 1 na 9 mężczyzn i u 1 na 12 kobiet walka z nowotworem zakończy się niepowodzeniem (1). Pomimo wysiłku naukowców w opracowywaniu nowych terapii przeciwnowotworowych, postępu wiedzy oraz możliwości, jakie dają nam nowe podejścia terapeutyczne, nowotwory stanowią drugą najczęstszą przyczynę zgonów w Polsce. Chociaż ogromny nacisk kładziony jest na badania obejmujące terapie spersonalizowane, celowane, czy immunoterapie, chemioterapia nadal pozostaje jednym z najczęstszych wyborów podczas leczenia raka. W wielu przypadkach po początkowej poprawie wskaźników przeżywalności w odpowiedzi na kilka cykli chemioterapii następuje nawrót choroby.

Jako przykład posłużyć może wysoki, sięgający aż 42% nawrót choroby u pacjentek z potrójnie ujemnym rakiem piersi (TNBC), wyróżniającym się brakiem receptora estrogenowego (ER), receptora progesteronowego (PR) i HER2, które leczone są chemioterapią oraz terapią miejscową. Spowodowane jest to wykształceniem przez komórki nowotworowe mechanizmów adaptujących je do warunków stresowych wywołanych przez czynniki o charakterze cytostatycznym, hipoksję oraz autofagię (2), co nazywane jest powszechnie opornością wielolekową nowotworów (z ang. *multidrug resistance - MDR*). Istnieje wiele mechanizmów predysponujących komórki rakowe do przeżycia w warunkach stresu, a w niniejszej pracy uwagę poświęcono zagadnieniu nadekspresji transbłonowych białek ABC. W komórkach prawidłowych regulują one wewnętrzkomórkowy poziom hormonów, jonów, produktów przemiany materii, składników odżywcznych, steroli, lipidów oraz ksenobiotyków trasnportując je przez błony wewnętrz- i zewnętrzkomórkowe (3). W komórkach nowotworowych odgrywają kluczową rolę w usuwaniu szerokiej gamy leków cytostatycznych poza komórkę lub ich zamknięcie wewnętrz organelli wewnętrzkomórkowych takich jak lisosomy, autofagosomy i endosomy. Do aktywności enzymatycznej wykorzystują energię uzyskaną z hydrolizy ATP. Białka ABC podzielone są na siedem rodzin, ale tylko pięć z nich (A-D, G) posiada domenę transmembranową (TMD). 44 białka z rodzin A-D oraz G kodowane są u ludzi przez 48 genów (4). Białka z dwóch dodatkowych podrodzin (E-F) odgrywają kluczową rolę w biogenezie rybosomów, translacji i transporcie RNA – ABCE, a także są częścią kompleksu rybosomowego – ABCF (3,5). Białka ABCE i ABCF posiadają tożsame do innych ABC domeny wiążące ATP, jednakże nie posiadają domeny trasnbłonowej. Na

rdzeń struktury białek z podrodziny A-D oraz G składają się dwie domeny wiążące nukleotydy (NBD) oraz dwie domeny transbłonowe. W transporterach ABC domena NBD wiąże oraz hydrolizuje ATP, zaś domena TMD jest odpowiedzialna za translokację (eksport i import) substratu (4).

Ogony histonów mogą być modyfikowane przez acetylację, metylację, fosforylację, ubikwitylację, GlcNAcylację, cytrulinację, krotonilację i izomeryzację. Towarzyszą one zmianom w strukturze chromatyny i ekspozycji miejsc wiążania białek do DNA w celu aktywacji lub zahamowania transkrypcji genów. Jedną z najlepiej scharakteryzowanych modyfikacji jest acetylacja lisyny, która działa najczęściej jako aktywator transkrypcji; towarzyszy ona również replikacji, naprawie DNA i upakowaniu DNA w nukleosomy. Acetyltransferazy histonowe (HAT) są odpowiedzialne za przeprowadzanie acetylacji reszt lisyny histonów, czynników transkrypcyjnych i innych białek zaangażowanych w proces transkrypcji, podczas gdy proces odwrotny jest katalizowany przez deacetylazy histonowe (HDAC). Acetylowane histony są rozpoznawane przez białka posiadające bromodomenę i wskazują miejsca wiążania do chromatyny. Bromodomeny należą do silnie konserwatywnych struktur, których sekwencja zawiera ~110 aminokwasów. Na ich budowę składają się cztery leowskretne helisy (α A, α B, α C i α Z), a hydrofobowa kieszeń utworzona jest z dwóch pętli pomiędzy helisami α B i α C, a także helisami α Z i α A. Struktura hydrofobowej kieszeni bromodomeny może jednocześnie oddziaływać z kilkoma acetylowanymi resztami lisyny. Ten charakterystyczny element budowy bromodomen definiuje ich rolę w mechanizmach epigenetycznej kontroli transkrypcji genów. Białka zawierające bromodomeny można podzielić na trzy następujące grupy: elementy kompleksów remodelujących chromatynę, składniki acetyltransferaz histonowych oraz białka bromodomenowo-zewnętrzne (BET). Opisana interakcja pomiędzy nukleosomami i bromodomenami może być hamowana, a mechanizm ten znalazł zastosowanie w terapiach przeciwnowotworowych oraz badaniach klinicznych. Dla przykładu, inhibitor JQ1 wiąże się z kieszenią bromodomeny BET imitując acetylowaną lisynę. W wyniku tego procesu zahamowana zostaje interakcja białek BET z histonami, co prowadzi do ich usunięcia z chromatyny oraz wprowadzenia komórki na drogę apoptozy. Właściwości inhibitora JQ1 hamujące proliferację oraz indukujące różnicowanie komórek nowotworowych zostały wykazane względem modelu raka środkowej linii NUT oraz ostrej białaczki szpikowej. Poza obniżeniem proliferacji komórek JQ1 obniżała ekspresję c-Myc w raku endometrium oraz raku jajnika (6–9). Do I fazy badań klinicznych wybrany został analog JQ1 – TEN-010, którego działanie zweryfikowane zostało u pacjentów z zaawansowanymi guzami litymi, nowotworami złośliwymi (NCT01987362) oraz ostrą białaczką szpikową (NCT02308761).

W jednej z poprzednich prac zespołu opisany został mechanizm, w którym wydrukowanie oporności na cisplatynę w linii niedrobnokomórkowego raka płuc A549 oraz potrójnie negatywnego raka piersi MDA-MB-231, uwarunkowane było pojawiением się acetyltransferazy histonowej p300 na promotorze genu kodującego transporter *ABCC10*. Biorąc pod uwagę fakt, iż p300 posiada aktywności acetyltransferazy oraz krotonylotransferazy, a także jest zlokalizowane na promotorach genów w liniach z wyindukowaną opornością wielolekową, w niniejszej pracy doktorskiej sprawdzono, czy zahamowanie działania p300 poprzez zastosowanie inhibitora bromodomeny CBP/p300 może wpłynąć na uwrażliwienie komórek nowotworowych na powszechnie stosowane chemioterapeutyki poprzez obniżenie transkrypcji części genów z rodziny ABC. Wybrany do tego celu związek - I-CBP112 należy do grupy inhibitorów, które specyficznie i kompetencyjne hamują interakcję pomiędzy bromodomeną CBP/p300 odpowiedzialną za wiązanie acetylo-lizyny a chromatyną. Chociaż niejednokrotnie wskazywano w literaturze potencjalnie przeciwnowotworowe działanie wybranych inhibitorów p300 i jego homologu CBP to nie przedstawiono wcześniej właściwości fizykochemicznych tych związków, które predysponowałyby je lub wykluczały z wyłączenia przynajmniej do badań na zwierzętach czy testów klinicznych (10–13). Brakowało istotnych informacji o parametrach ADMET (z ang. *Absorption–Distribution–Metabolism–Excretion–Toxicity*) oraz wpływie inhibitorów p300 na komórki prawidłowe. Jednym z istotnych aspektów bezpiecznego stosowania związków o właściwościach przeciwnowotworowych jest ich zdolność do indukowania poli(aneu)ploidii, która obok opisanych wcześniej transporterów ABC, jest jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za oporność wielolekową nowotworów. Choć informacje o tworzeniu komórek polianeuploidycznych w odpowiedzi na pojawienie się czynników stresowych w środowisku można znaleźć w literaturze, to dokładna rola poszczególnych ścieżek sygnałowych czy czynników transkrypcyjnych indukujących tego typu formę tolerancji na stres jest stosunkowo słabo poznana. Komórki poli(aneu)poidalne charakteryzują się zwiększoną ilością materiału genetycznego izwielokrotnioną liczbą chromosomów. Przez wzgląd na posiadanie jednego olbrzymiego lub kilku mniejszych jąder nazywane są one poliploidalnymi olbrzymymi komórkami nowotworowymi (z ang. *polypliod giant cancer cells - PGCC*). Ten typ komórek odpowiedzialny jest za odtworzenie populacji po ustąpieniu szkodliwych czynników. Stąd określenie zdolności związków o charakterze przeciwnowotworowym do indukowania poli(aneu)ploidii jest aspektem równie istotnym dla wyleczenia choroby jak właściwości farmakokinetyczne i ADMET.

Często opisywana rola PARP1 w nowotworach dotyczy udziału tego białka w naprawie DNA, regulowaniu transkrypcji czy procesach metabolicznych, natomiast moją uwagę przyciągnęła ADP-rybozylacja kompleksu aktywującego transkrypcję BRG1-EP300, którego obecność

stwierdzono na promotorach niektórych transporterów ABC. PARP1 katalizuje przyłączanie poli-ADP-rybozy do asparaginianu lub glutaminianu, jednak gdy C4orf27/HPF1 jest rekrutowany do miejsca uszkodzenia DNA, ADP-rybozylacja zachodzi na resztach seryny. Biorąc pod uwagę istotną rolę I-CBP1112 w hamowaniu działania bromodomenu CBP/p300 i jednoczesnym obniżeniu ekspresji transporterów ABC, postanowiłem sprawdzić wpływ inhibitorów białka PARP1 na represję genów, które są regulowane przez białko p300. W ramach tego badania wykorzystane zostały dwa inhibitory białka PARP1, które różnią się mechanizmem działania. Veliparib nie indukuje powstawania pułapkowego kompleksu PARP-DNA, co jest niezwykłym atutem w porównaniu z innymi iPARP, ponieważ nie inicjuje on mielosupresji, której cechą charakterystyczną jest obniżony poziom komórek szpiku kostnego. Drugi z analizowanych inhibitorów – Olaparib wiąże PARP1 z DNA. W 2018 roku został zatwierdzony przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) do leczenia zaawansowanego raka jajnika, jajowodu, a także pierwotnego raka otrzewnej, które posiadają germinalną lub somatyczną mutację w genie *BRCA1* lub *BRCA2* ze względu na ich wrodzony defekt naprawy rekombinacji homologicznej (HRR). Inhibitory PARPu w układzie z lekami przecinowotworowymi obniżają zdolność komórki nowotworowej do naprawy uszkodzeń spowodowanych działaniem cytostatyków, co prowadzi do akumulowania abberacji, a następnie śmierci komórki. W ramach projektu Preludium 21 zidentyfikowano czynniki transkrypcyjne, które mogą być odpowiedzialne za obserwowaną PARP1-zależną nadekspresję transporterów ABC w komórkach MDA-MB-231 opornych na doktorubicynę. Badania wykonane w ramach tego projektu mogą być istotnym kamieniem milowym w walce z opornością wielolekową nowotworów piersi opornych na standardową chemioterapię.

W niniejszej pracy przedstawione zostało porównanie wrażliwości linii bazowych oraz uzyskanych z nich linii opornych na chemioterapeutyki oraz ekspresję transporterów ABC. Do przeprowadzenia badań stanowiących temat niniejszej rozprawy doktorskiej wykorzystano linie bazowe i wygenerowane linie oporne na wybrane chemioterapeutyki, charakteryzujące się zwiększoną ekspresją białek ABC, których rolę w oporności potwierdzono eksperymentalnie. Dla uzyskania modelu istotnego z punktu widzenia klinicznego wyprowadzono linie oporne odpowiednio na doktorubicynę z potrójnie negatywnego raka piersi (MDA-MB-231) i cisplatynę z niedrobnokomórkowego raka płuc (A549) oraz z obydwu linii uzyskano komórki oporne na paklitaksel. Szczegółowo opisany został mechanizm działania inhibitora bromodomenu CBP/p300 – I-CBP112 w komórkach bazowych (Praca eksperimentalna nr 1) oraz opornych (Praca eksperimentalna nr 2) w kontekście zależnej od p300 transkrypcji genów odpowiedzialnych za transport przebłonowy leków. Omówione zostało znaczenie inhibitora w ekspresji białek ABC

warunkujących oporność na chemioterapeutyki w wybranych fenotypach opornych, na akumulowanie leków wewnątrz komórek, a także nasilenie toksyczności w hodowlach 2D i 3D. Ponadto wykonane zostały badania *in vitro* oraz *in silico* mające na celu określenie profilu bezpieczeństwa inhibitora I-CBP112. Praca przeglądowa nr 1 podsumowała właściwości obecnie stosowanych w badaniach inhibitorów CBP/p300, które oddziałują z domeną katalityczną acetyltransferazy histonowej (A-485, C646, L002) lub bromodomeną CBP/p300 oddziałującą z chromatyną (SGC-CBP30, I-CBP112, CPI-637, PF-CBP1, GNE-781, CCS1477, UMB298), a także podwójnych inhibitorów BET CBP/p300 (NEO2734, XP-524). W opisanej pracy przeglądowej szczególny nacisk został położony na omówienie potencjalnych, klinicznie istotnych celów побocznych wybranych inhibitorów. Opisano właściwości farmakokinetyczne oraz parametry Absorbca · Dystrybucja · Metabolizm · Eliminacja · Toksyczność (ADMET). W pracy przeglądowej nr 2 podsumowane zostały mechanizmy powstawania komórek poli(aneu)ploidalnych, określona została również rola tego typu komórek w nowotworach, a także omówione zostały perspektywy przełamywania zjawiska poliploidii będącego jednym z mechanizmów przyczyniających się do oporności wielolekowej.

6. Cel pracy

Celem badań realizowanych w ramach prezentowanej pracy doktorskiej było określenie roli p300 w wytwarzaniu oporności wielolekowej na wybrane chemioterapeutyki poprzez nasilanie transkrypcji genów z rodziny ABC. Głównym narzędziem badawczym był inhibitor bromodomeny CBP/p300 – I-CBP112, zaś narzędziem uzupełniającym były inhibitory polimerazy poli (ADP-rybozy) -1 (PARP-1), która jest dowiedzionym ko-regulatorem p300 i BRG1. Badania nad białkiem PARP1 zainspirowały mnie do rozpoczęcia projektu, który miał na celu zbadanie roli kompleksu PARP1/HPF1 w warunkowaniu oporności wielolekowej w potrójnie ujemnym raku piersi opornym na doxorubicynę. Biorąc pod uwagę możliwe zastosowanie przeciwnowotworowe inhibitorów p300, przewidziane zostało bezpieczeństwo ich stosowania oraz zidentyfikowane zostały inne enzymatyczne cele dla inhibitorów p300, hamowanie aktywności których może przynieść potencjalną korzyść chorym na nowotwory.

7. Hipotezy badawcze

Wiodąca hipoteza badawcza zakładała możliwość uzupełnienia standardowej chemioterapii o komercyjnie dostępny inhibitor acetyltransferazy p300 – I-CBP112, w celu obniżenia lub pełnego wyeliminowania nabytej oporności wielolekowej komórek

nowotworowych przy kolejnej dawce chemioterapeutyku. Wymieniony związek miał hamować transkrypcję genów kodujących białka z rodziny ABC biorące aktywny udział w usuwaniu leków poza komórkę lub ich akumulowanie w wewnętrzkomórkowych organellach. Uzupełniająca hipoteza zakładała udział kompleksu PARP1/HPF1 w regulowaniu transkrypcji genów kodujących białka ABC, co w konsekwencji warunkowało oporność komórek linii MDA-MB-231 na doktorubicynę.

W ramach niniejszej pracy zrealizowano następujące cele szczegółowe:

- Wyłoniono kluczowe białka ABC ulegające nadekspresji po uzyskaniu oporności w poszczególnych liniach nowotworowych.
- Zidentyfikowano wewnętrzkomórkową lokalizację białek ABC w komórkach wybranych linii bazowych oraz opornych.
- Określono wpływ inhibitora bromodomeny CBP/p300 oraz inhibitorów PARP-1 na ekspresji białek ABC.
- Określono potencjalne cele poboczne inhibitorów CBP/p300.
- Sprawdzono potencjalną rolę ADP-rybozylacji w zależnej od p300 nadekspresji białek ABC.
- Zidentyfikowano czynnik transkrypcyjny towarzyszący PARP1 w miejscach regulatorowych wybranych PARP1/p300-zależnych genów ABC ulegających nadekspresji w liniach opornych.
- Zidentyfikowano modyfikacje potranslacyjne, które mogą wpływać na funkcjonowanie białka PARP-1.

8. Materiały i metody

Materiał badawczy

- Linia potrójnie ujemnego raka piersi MDA-MB-231 – bazowa (Sigma-Aldrich), oporna na cisplatynę, oporna na doksorubicynę i oporna na paklitaksel
- Linia niedrobnokomórkowego raka płuc A549 – bazowa (ATCC), oporna na cisplatynę oraz oporna na paklitaksel
- Linia nowotworowa wątrobowokomórkowa HepG2 (ATCC)
- Linie pierwotne (ATCC)
- Monocyty oraz limfocyty wyizolowane z kożuszka leukocytarnego (Centrum Krwiodawstwa w Łodzi)

Hodowla komórkowa oraz traktowanie inhibitorami

Linia MDA-MB-231 przez pierwszych pięć pasaży hodowana była w medium L15 z suplementacją 15% FBS, antybiotyków penicylina-streptomycyna (kolejno 50 U/mL oraz 50 µg/mL) bez CO₂ (zgodnie z zaleceniami producenta). Następnie w ciągu dwóch tygodni komórki zostały zaadaptowane do pożywki DMEM z 10% surowicą bydlęcą FBS, z uwzględnieniem antybiotyków penicylina-streptomycyna (kolejno 50 U/mL oraz 50 µg/mL) i hodowli w atmosferze 5% CO₂. Komórki A549 hodowane były w pożywce DMEM z 10% FBS oraz antybiotykami penicylina-streptomycyna (kolejno 50 U/mL oraz 50 µg/mL) w atmosferze 5% CO₂.

Komórki wysiewane były na płytke co najmniej 24h przed planowanym traktowaniem inhibitorami. Następnie inkubacja z inhibitorami w stężeniu 2,5 µM i 10 µM - I-CBP112 (iCBP/p300), 1 µM – Olaparib (iPARP1) oraz 1 µM Veliparib (iPARP1) trwała 72h. Wyjątkiem był eksperyment, w którym sprawdzano bezpośredni wpływ I-CBP112 na aktywność transporterów ABC obecnych w błonie komórek, i w tym przypadku inkubacja trwała 2h.

Indukowanie oporności na wybrane cytostatyki

Komórki linii MDA-MB-231 traktowane były lekami przeciwnowotworowymi w stężeniach 1 µM dla doksorubicyny oraz 0,05 µM dla paklitakselu, a linia A549 inkubowana była z 10 µM cisplatyną oraz 0,05 µM paklitakselem. Traktowanie istotnie klinicznymi cytostatykami powtarzane było co około 4 tygodnie w jednorazowych dawkach w zależności od zdolności proliferacyjnych komórek. Następnie po 48 godzinach leki były usuwane z hodowli, a komórki były hodowane w pożywce DMEM bez dodatku leków do następnego traktowania.

Badane inhibitory

- Inhibitor bromodomeny CBP/p300 – I-CBP112
- Inhibitory PARP – Olaparib i Veliparib

Narzędzia badawcze – analizy in vitro

Lista odczynników oraz dokładna metodyka, które zostały wykorzystane w niniejszej pracy doktorskiej figurują w załączonych publikacjach.

1) Praca eksperymentalna nr 1 pt.: *“CBP/p300 bromodomain inhibitor – I-CBP112 declines transcription of the key ABC transporters and sensitizes cancer cells to chemotherapy drugs”* oraz praca eksperymentalna nr 2 pt.: *„I-CBP112 declines overexpression of ATP-binding cassette transporters and sensitized drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines to chemotherapy drugs”*.

Metodyka wykorzystana w obydwu pracach została już opublikowana z tego względu w niniejszej pracy zostanie omówiona w formie skróconej.

- Testy na żywotność komórek - resazuryna, barwienie Aneksyną V (mikroskopia konfokalna), ApoTox-Glo™ Triplex Assay
- Testy na poziom apoptozy – mikroskop konfokalny, ApoTox-Glo™ Triplex Assay, Western Blot
- Oznaczanie poziomu mRNA – Real-Time PCR
- Oznaczanie poziomu białek – Western Blot
- Oznaczanie akumulowania leków – cytometr, czytnik fluorescencyjny, mikroskop konfokalny
- Określenie poziomu transporterów ABC oraz ich lokalizacja w komórce – mikroskopia konfokalna
- Pomiar wielkości sferoidów – mikroskopia konfokalna
- W pracy eksperymentalnej uwzględniającej działanie inhibitora I-CBP112 w liniach opornych MDA-MB-231 oraz A549 wykonane zostało dokowanie molekularne mające na celu określenie oraz porównanie miejsc wiązania oraz powinowactwo I-CBP112, doksorubicyny, jak również inhibitorów ABC – Tariquidar, Reversanu i MK-571 do białek ABCB1, ABCC1 i ABCG2. Analiza ta wykonana została w celu weryfikacji, czy I-CBP112 poza hamowaniem transkrypcji, może bezpośrednio hamować aktywność transporterów. Do tego celu wykorzystano narzędzie CB-Dock2.

→ Wykonany został również test ADMET (absorpcja–dystrybucja–metabolizm–wydalanie–toksyczność), który pozwolił na określenie właściwości farmakokinetycznych I-CBP112. Do tego celu wykorzystano narzędzia takie jak Swiss ADME oraz pkCSM.

Określenie wpływu I-CBP112 na funkcjonalną interakcję pomiędzy p300, LSD1, strukturą chromatyny i transkrypcji genów kodujących transportery ABC wykonane zostało przez innych członków zespołu badawczego dr hab. Agnieszki Robaszkiewicz.

Technika ChIP-qPCR obejmującą ocenę wpływu inhibitora CBP/p300 na H3K4me3, a także porównanie działania I-CBP112 na transkrypcję ABC w kombinacji z inhibitorem LSD1 (SP2509) wykonana została przez innych członków zespołu badawczego dr hab. Agnieszki Robaszkiewicz.

Określenie % hemolizy w erytrocytach po traktowaniu I-CBP112 wykonane zostało przez Panią Magister Marię Grodzicką.

2) Oznaczenie właściwości ADMET i potencjalnych celów nieswoistych dla inhibitorów CBP/p300 (Praca przeglądowa nr 1 pt.: *"Characteristics of anticancer activity of CBP/p300 inhibitors – Features of their classes, intracellular targets and future perspectives of their application in cancer treatment"*)

W trakcie przygotowania pracy przeglądowej wykonane zostały analizy *in silico*, które uwzględniały takie narzędzia jak SwissTargetPrediction, w celu zidentyfikowania celów pobocznych dla opisywanych inhibitorów CBP/p300, SwissADME do określenia parametrów ADME oraz właściwości farmakokinetycznych, których wartości dodatkowo potwierdzone zostały za pomocą narzędzia pkCSM. Do przeprowadzenia wyżej wymienionych analiz wykorzystano struktury SMILES. Ponadto, wykonano dokowanie molekularne dla wybranych układów związek/powszechnie znany inhibitor – ligand, które umożliwiło przewidzenie powinowactwa oraz zidentyfikowanie dokładnego motywu miejsca wiązania potencjalnego ligandu w kieszeni badanego białka. Powszechnie znane, silnie wiążące inhibitory CBP/p300 obejmowały związki, które są obecnie w badaniach klinicznych lub zostały już zaakceptowane przez FDA. W celu przeprowadzenia dokowania molekularnego wykorzystane zostały krystaliczne struktury 3D białek z Protein Data Bank lub AlphaFold oraz struktury wybranych inhibitorów ze strony PubChem .

3) Kolejny etap badań obejmował analizę bezpieczeństwa inhibitora I-CBP112 w kontekście jego potencjalnej zdolności do bezpośredniego indukowania lub nasilania zjawiska polinukleacji wywołanej cytostatykami. Zagadnienie to zostało szczegółowo omówione w opublikowanej pracy przeglądowej pt.: „*Poliploidia jako rezultat terapii przeciwnowotworowych i przyczyna braku ich*

skuteczności". Wyniki, które nie zostały jeszcze opublikowane mają wysoką wartość naukową, ponieważ uzupełniają zagadnienia dotyczące przeciwnowotworowych właściwości omawianego inhibitora.

- Cytometria przepływową – określenie zmian cyklu komórkowego z wyróżnieniem komórek polianeuploidalnych w oparciu o zawartość DNA

Eksperyment ten rozpocząłem od wysiania 500 tys. komórek na płytke 6-dołkową linii MDA-MB-231 opornej na doksorubicynę oraz paklitaksel i A549 opornej na cisplatynę oraz paklitaksel. Następnie przeprowadzona została 72-godzinna inkubacja z I-CBP112, po której dodano doksorubicynę w stężeniu 0,1 µM na kolejne 48-godzin. Po tym czasie komórki zostały dwukrotnie przepłukane PBS, a następnie utrwalone w roztworze 0,5% formaldehydu w PBSie. Do permabilizacji wykorzystano Triton X-100 w stężeniu 0,1% dla A549 oraz 0,05% dla MDA-MB-231, a po 15-minutowej inkubacji dodana została RNAza na około 4 godziny. W ostatnim etapie do zawiesiny komórek dodano DAPI (1 µg/mL, 15 minut), a następnie przeprowadzony został cytometryczny pomiar fluorescencji wzbudzeniu 350 nm i emisji 470 nm. Do analizy uzyskanych wyników wybrano oprogramowanie FlowJo™ v10.8 Software. Populacja komórek została zidentyfikowana w oparciu o parametry FSC-A i SSC-A, a następnie w formie histogramu zwizualizowany został cykl komórkowy z dodatkowym uwzględnieniem komórek polijądrzastych, dla których zawartość DNA przekraczała ilość DNA w komórkach znajdujących się w fazie G2. Dla każdego układu eksperimentalnego wykonane zostały trzy powtórzenia biologiczne.

4) W ostatnim etapie badań nad rozprawą doktorską skupiłam się na białku PARP1 oraz jego wpływie na regulowanie transkrypcji transporterów ABC w linii bazowej MDA-MB-231 oraz opornej na doksorubicynę. Protokoły dla poniższych metod, z wyjątkiem wyciszenia białek PARP1 i HPF1, Co-IP oraz ChIP-Seq, znajdują się w opublikowanych pracach eksperimentalnych, które są podstawą mojej pracy doktorskiej.

- Real-Time PCR

- wpływ inhibitorów PARP1 na ekspresję transporterów ABC
- wpływ wyciszenia składowych kompleksu PARP1/HPF1 na ekspresję ABC
- określenie wpływu wyciszenia czynnika SMARCA1 na ekspresję genów ABCC3, ABCC4 i ABCC5 w linii opornej na doksorubicynę

- Western Blot

- wpływ iPARP na poziom białek ABC

- ko-immunoprecipitacji białka PARP1 z analizą składników potencjalnego kompleksu/koregulatorów
 - określenie poziomu ADP-rybozylacji
- Mikroskopia konfokalna
- wpływ iPARP na ekspresję białek ABC oraz akumulację leków
 - wpływ siPARP1 oraz siHPF1 na akumulację leków w kulturach 2D oraz sferoidach
 - określenie kolokalizacji białek kompleksu oraz ich lokalizacja
 - wpływ siSMARCA1 na akumulowanie leków (metoda uzupełniająca do pomiarów na czytniku fluorescencyjnym)
- Ko-immunoprecipitacja (Co-IP)
- określenie zależności powstawania kompleksu PARP1/HPF1 od czynników uszkadzających takich jak etopozyd i H₂O₂
 - określenie modyfikacji potranslacyjnych białka PARP1
 - zweryfikowanie fizycznej interakcji SMARCA1 z p300, PARP1 oraz HPF1
- Immunoprecipitacja chromatyny z analizą fragmentów za pomocą senwencjonownia nowej generacji (ChIP-Seq) dla białka PARP1
- zidentyfikowanie czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za PARP1-zależną ekspresję transporterów ABC
 - określenie stopnia modyfikacji histonów, takich jak H3K4me3 i H2K27ac, w miejscu występowania PARP1 na chromatynie wybranych genów ABC

Odczynniki wykorzystane na tym etapie:

- ✓ przeciwciało anty-SMARCA1 (numer katalogowy: #MA5-31912, ID przeciwciała: 2H7B9, Thermo Fisher)
- ✓ przeciwciało anty-PARP1 (numer katalogowy: #9532, ID przeciwciała: 46D11, Cell Signaling Technology)
- ✓ przeciwciało anty-HPF1 (numer katalogowy: HPA043467, Sigma Aldrich)
- ✓ przeciwciało anty-p300 (numer katalogowy: #54062, ID przeciwciała: D2X6N, Cell Signaling Technology)
- ✓ siRNA dla SMARCA1 (numer katalogowy: #AM16708, ID siRNA: 142645, Thermo Fisher)
- ✓ siRNA dla PARP1 (numer katalogowy: sc-29437, Santa Cruz Biotechnology)
- ✓ siRNA dla HPF1 (numer katalogowy: AM16709, ID siRNA: 215741, Ambion)

✓ startery

	Forward	Reverse
<i>PARP1</i>	5'- AAGCCCTAAAGGCTCAGAACG-3'	5'-ACCATGCCATCAGCTACTCGGT-3'
<i>HPF1</i>	5'- TCGCTTGAACAGAGAACCGTGA-3'	5'-TGGAACAAACCAAGCCTGCAC-3'
<i>SMARCA1</i>	5'-GCTTGGCATGGTCCAATGGA-3'	5'-TTTGGCTGTTTGGAGGCCG-3'

Wyciszenie białek PARP1 oraz HPF1

Komórki linii bazowej oraz opornej na doksorubicynę MDA-MB-231 dzień przed transfekcją zostały wysiane na 24-dołkową płytke w gęstości 100 tysięcy komórek na dołek. Po 24 godzinach przygotowany został kompleks lipofektaminy RNAiMAX : siRNA w medium OptiMEM, a następnie dodany do komórek. Po 4-godzinnej inkubacji uzupełnione zostało medium DMEM z 10% FBS i antybiotykami do objętości 1 ml. Po 72-godzinach do stranfekowych komórek dodany został TRIzol, a następnie przeprowadzona została izolacja RNA oraz odwrotna transkrypcja. W ostatnim etapie zmiany w ekspresji genów ABC po wyciszeniu składowych kompleksu określone zostały metodą Real-Time PCR z wykorzystaniem starterów, których sekwencje znajdują się w opublikowanych pracach eksperymentalnych będących częścią rozprawy doktorskiej.

Ko-immunoprecypitacja oraz immunoprecypitacja

Ogólny opis metody:

Komórki linii bazowej MDA-MB-231 wysiane zostały w gęstości 5 milionów komórek na szalkę o średnicy 90 mm. Następnego dnia, po trzykrotnym przepłukaniu PBSem, komórki zostały zawieszone w buforze do IP (20 mM HEPES – KOH; 50 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA; 20% glycerol; 0,1% NP-40) z inhibitorami PIC, PMSF i DTT oraz zebrane do probówki typu eppendorf. Zawiesina komórek została zsonikowana na aparacie Diagenode Bioruptor 300 przez 35 cykli / high. Po odwirowaniu zawiesiny 10 % supernatantu zebrane zostało na kontrolę całkowitej zawartości analizowanych białek w próbie (input), a pozostała część próbki rozzielona została na próbę z przeciwciałem (właściwe IP) oraz na kontrolę IgG. Po 2-godzinnej inkubacji lizatu z przeciwciałem dodane zostały kulki magnetyczne na dodatkowe 2 godziny. Następnie kulki zostały przepłukane buforem do IP, zawieszone w buforze lizującym do elektroforezy z β-

merkaptoetanolem oraz buforem obciążającym. Tak przygotowana mieszanina była inkubowana w 70°C przez 10 minut. Po oddzieleniu kulek od lizatu białka rozdzielono za pomocą techniki Western Blot.

Eksperyment obejmujący ko-immunoprecypitację dotyczący weryfikacji powstawania kompleksu PARP1/HPF1 w odpowiedzi na czynniki uszkadzające w linii bazowej MDA-MB-231 rozpoczął się od wysiania komórek, a następnie po 24-godzinach, komórki zostały potraktowane etopozydem (25 µM) oraz H₂O₂ (25 µM) oraz inkubowane odpowiednio przez dwie i cztery godziny. W kolejnym kroku wykonana została ko-immunoprecypitacja połączona z detekcją białek techniką Western Blot podczas której wykorzystane zostały przeciwciała anty-PARP1 oraz anty-HPF1. W ramach ko-immunoprecypitacji wykonane zostało również badanie określające pojawienie się fizycznej interakcji białka SMRACA1 z PARP1, p300 oraz HPF1 w linii MDA-MB-231 opornej na doksorubicynę w porównaniu z linią bazową. Analiza obejmująca immunoprecypitację oraz identyfikację modyfikacji potranslacyjnych białka PARP1 w linii bazowej, opornej na doksorubicynę i opornej na paklitaksel MDA-MB-231 opierała się na przeciwciałach swoistych dla metylacji, acetylacjii oraz fosforylacji. W przypadku eksperymentów obejmujących tworzenie się kompleksu PARP1 i HPF1 oraz weryfikację modyfikacji potranslacyjnych do immunoprecypitacji wybrane zostało przeciwciało anty-PARP1.

ChIP-Seq

Immunoprecypitację chromatyny wykonałam zgodnie z wcześniej opublikowanym protokołem znajdującym się w publikacji Wiśnik i innych (14). Komórki linii MDA-MB-231 bazowej oraz opornej na doksorubicynę wysiano na szalkę w ilości 10 milionów komórek na szalkę o średnicy 150 mm. Następnego dnia komórki utrwalono 1 % formaldehydem, a po 10- minutowej inkubacji proces został zatrzymany 125 mM glicyną. Po inkubacji z odpowiednimi buforami komórki zawieszono w buforze do lizy, a następnie wyizolowaną chromatynę zsonikowano za pomocą sonikatora Diagenode Bioruptor 300. Po 24-godzinnej inkubacji z przeciwciałami skonfigowanymi z kulkami magnetycznymi immunoprecypitowana chromatyna została przepłukana w buforach do oczyszczania, a następnie przeprowadzony został całonocny proces odsieciowywania w 65°C. DNA wyizolowano za pomocą ekstrakcji fenol:chloroform:alkohol izoamylowy. Biblioteka do sekwencjonowania została przygotowana z wykorzystaniem zestawu NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit with Sample Purification Beads for Illumina® zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta, a następnie zsekwencjonowana zestawem NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 Cycles) w Zakładzie Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

PARP1 został immunoprecytywowany przeciwiałem anty-PARP1 w linii bazowej oraz opornej na doksorubicynę MDA-MB-231. Ponadto dla linii opornej wybrane zostały dwie modyfikacje H3K4me3 i H3K27ac. Dane obejmujące wybrane modyfikacje w linii bazowej MDA-MB-231 uzyskane zostały z bazy Short Reads Achieve z NCBI o numerach SRR22007612 (H3K4me3) oraz SRR15130683 (H3K27ac).

Analiza bioinformatyczna

Etap badań *in silico* będących częścią projektu Preludium 21, który miał na celu zidentyfikowanie czynnika transkrypcyjnego odgrywającego kluczową rolę w PARP1-zależnej ekspresji transporterów ABC rozpoczęty został od analizy wyników uzyskanych metodą ChIP-Seq z wykorzystaniem platformy UseGalaxy. W pierwszej kolejności, po usunięciu adapterów, sprawdzona została jakość uzyskanych odczytów. Następnie odczyty zostały zmapowane do genomu ludzkiego hg19 przy pomocy narzędzia Bowtie 2. W kolejnym etapie za pośrednictwem narzędzia MACS2 peak calling wyłoniono regiony bogate w PARP1 przy p-value = 0,001. Następnie narzędzie bedtools intersect intervals pozwoliło na znalezienie wspólnych regionów dla sekwencji wąskich pików wzbogaconych w PARP1 oraz regionów zdających się w odległości do \pm 170 000 od miejsca inicjacji transkrypcji (TSS) PARP1-zależnych genów kodujących transportery ABCC3, ABCC4 i ABCC5. Narzędzie XSTREME z pakietu MEME-Suite pozwoliło na wygenerowanie listy czynników transkrypcyjnych dla zidentyfikowanych motywów. Na liście czynników znalazły się p53, p73 oraz SMARCA1. Biorąc pod uwagę fakt, że SMARCA1 należy do rodziny białek SWI/SNF, która jest odpowiedzialna za ATP-zależne zmiany struktury chromatyny, do dalszej analizy wybrany został ostatni z wymienionych trzech czynników.

Analizy statystyczne

Wyniki zostały przedstawione jako średnie \pm SEM. Normalność rozkładu została sprawdzona za pomocą testu Shapiro-Wilka dla eksperymentów z mniejszą liczbą prób lub Kołmogorowa-Smirnowa dla eksperymentów z większą liczbą prób. Różnica pomiędzy dwiema średnimi sprawdzona została za pomocą nieparametrycznego testu Manna-Whitneya w zestawie danych o rozkładzie innym niż normalny. Test t-Studenta wybrany został dla porównania dwóch średnich w próbach spełniających wymogi rozkładu Gaussa. Dla porównań wielokrotnych przeprowadzona została jednokierunkowa analiza wariancji ANOVA1, a następnie wybrany został test Tukeya lub Poprawka Bonferroniego dla określenia potencjalnych różnic między próbami. Dane istotne statystycznie oznaczono "**", gdy $p < 0,05$, w przeciwnym razie oznaczono "ns".

W pierwszym etapie za pomocą techniki Real-Time PCR określone zostały zmiany w poziomie ekspresji genów ABC po zastosowaniu inhibitorów białka PARP1 – Olaparibu i Veliparibu, dodanych w stężeniu 1 µM, w linii bazowej MDA-MB-231 oraz w liniach opornych na cisplatynę i doksorubicynę. Spadek poziomu białka wybranych białek ABC potwierdzony został metodą Western Blot, a dla linii bazowej MDA-MB-231 również techniką mikroskopii konfokalnej. W celu weryfikacji hipotezy o wpływie obniżenia poziomu transporterów ABC na akumulowanie antracyklin posiadających właściwości autofluorescencji – doksorubicyny i daunorubicyny oraz znakowanego fluorescyjnie paklitakselu Oregon-Green, zastosowano technikę mikroskopii konfokalnej, gdzie oprócz fluorescencji leków zobrazowano również jądro komórkowe (wybarwione DAPI) i cytoskielet (wybarwiony falloidyną). Mając na uwadze ostatnie doniesienia dotyczące wpływu białka C4orf27/HPF1 na działanie PARP1 wyciszoną zarówno PARP1 jak i HPF1, a następnie zweryfikowano wpływ wyciszenia wymienionych wyżej białek na ekspresję ABCB1, grupę ABCC oraz ABCG2 w linii MDA-MB-231 bazowej oraz opornej na doksorubicynę. Kolokalizacja białek oraz wpływ wyciszenia składowych kompleksu PARP1/HPF1 na akumulowanie leków oceniony został za pomocą mikroskopii konfokalnej jak opisano wyżej. Ponadto, w celu odwzorowania warunków panujących w guzie, wygenerowane zostały kultury 3D w formie sferoidów. Immunoprecypitacja białka PARP1 dla linii bazowej TNBC w obecności etopozydu oraz H2O2 pozwoliła na zweryfikowanie zależności tworzenia się kompleksu PARP1/HPF1 od czynników uszkadzających DNA. Aktywność PARP1 określono na podstawie zmian poziomu ADP-rybozylacji po traktowaniu komórek doksorubicyną oraz po 2-godzinnym czasie na naprawę. Aby określić możliwy udział innych czynników w determinowaniu aktywności PARP1 porównano poziom modyfikacji potranslacyjnych tego białka takich jak acetylacja, fosforylacja oraz metylacja pomiędzy linią bazową i liniami opornymi na doksorubicynę oraz paklitaksem.

Ostatni etap badań w ramach rozprawy doktorskiej obejmował wykonanie metody immunoprecypitacji chromatyny połączonej z sekwencjonowaniem nowej generacji dla białek PARP1 i HPF1. Ze względu na brak możliwości zidentyfikowania miejsc występowania białka HPF1, co prawdopodobnie spowodowane było brakiem komercyjnie dostępnego przeciwciała dedykowanego dla tej metody, do dalszej analizy wybrany został wynik sekwencjonowania regionów bogatych w PARP1 w linii bazowej oraz opornej na doksorubicynę MDA-MB-231. Wyniki w formacie fastq zostały poddane analizie bioinformatycznej, która pozwoliła na wyłonienie miejsc wiążania PARP1 w odległości do ± 170 000 od miejsca inicjacji transkrypcji (TSS) PARP1-zależnych genów genów kodujących transportery ABC. Analiza motywów bogatych w PARP1 umożliwiła wygenerowanie potencjalnej listy czynników transkrypcyjnych mogących regulować ekspresję genów ABC. Aby zweryfikować udział wyłonionego białka SMARCA1 na ekspresję wybranych

genów ABC oraz żywotność komórek w warunkach stresu cyto- i genotoksycznego porównano wymienione parametry w komórkach z normalnych i wyciszonym poziomem SMARCA1. Wykonano również pomiar akumulowania doksorubicyny oraz paklitakselu znakowanego sondą Oregon Green z wykorzystaniem czytnika fluorescencyjnego oraz mikroskopii konfokalnej w komórkach różniących się poziomem SMARCA1. Przejściowe wyciszenie SMARCA1 potwierdzono za pomocą techniki real-time PCR i western blot.

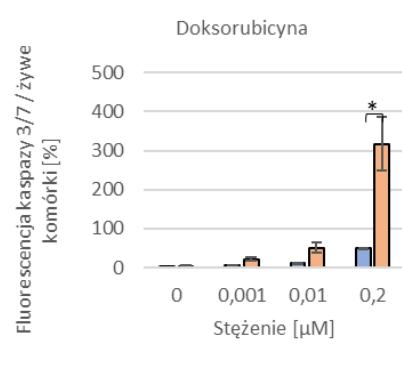
9. Omówienie wyników

Pierwsza publikacja pt.: „*CBP/p300 bromodomain inhibitor – I-CBP112 declines transcription of the key ABC transporters and sensitizes cancer cells to chemotherapy drugs*” wchodząca w skład rozprawy doktorskiej miała na celu zbadanie działania inhibitora I-CBP112 względem bazowych linii nowotworowych MDA-MB-231, A549 oraz HepG2, które różnią się profilem ekspresji transporterów ABC. Uwzględnione w pracy badania rozpoczęły się od określenia IC50 wybranych cytostatyków, a także porównania zmian w IC50 w odpowiedzi na działanie inhibitora bromodomeny CBP/p300 – I-CBP112 (Figura 1). Ponieważ badany inhibitor istotnie zmniejszył IC50 wszystkich badanych leków przeciwnowotworowych we wszystkich trzech rozpatrywanych liniach komórkowych, a jednocześnie sam obniżył liczbę żywych komórek w populacji do 60%, zweryfikowana została hipoteza o zależnym od inhibicji p300/CBP zaburzeniu cyklu komórkowego. Obniżenie poziomu markerów podziałów mitotycznych przy jednoczesnych braku aktywacji kaspaz 3/7 oraz proteazy charakterystycznej dla martwych komórek (Figura 1) sugerowało, że I-CBP112 nie wykazuje bezpośredniej cytotoxiczności, ale hamuje przebieg cyklu komórkowego.

A

	NT [IC50 µM]	I-CBP112[IC50 µM]
Doksorubicyna	0,178085	0,000275
Daunorubicyna	0,212055	0,00033
Paklitaksel	2,444649	0,0114774
Cisplatyna	12,80723	0,1513262
Bleomycyna	32,48275	0,8136982
Etopozyd	37,37057	2,6808907
Metotreksat	119,1627	10,620595

B



C

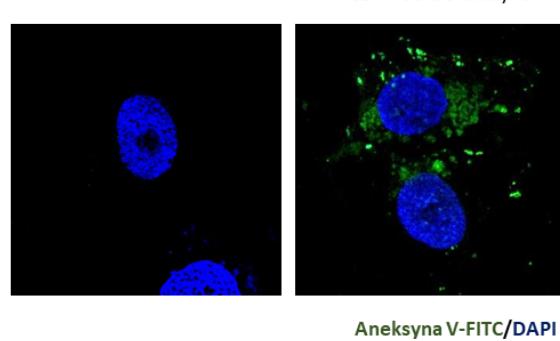


Figura 1. I-CBP112 istotnie obniża wartości IC₅₀ wszystkich badanych cytostatyków, a także nasila procesy zaprogramowanej śmierci komórki w kombinacji z doksorubicyną. (A) Nasilona toksyczność wybranych leków po zastosowaniu I-CBP112 została określona testem na żywotność z wykorzystaniem resazuryny. (B) Stosunek pomiędzy fluorescencją kaspazy 3/7, a cytoplazmatycznej aktywności proteazy został określony poprzez zastosowanie testu ApoTox-Glo™. (C) Nasilona eksternalizacja fosfatydyloseryny, która jest znacznikiem apoptozy, zobrazowana została za pomocą mikroskopii konfokalnej.

Mając na uwadze nasilenie toksyczności leków w odpowiedzi na działanie inhibitora I-CBP112 oraz zwiększenie frakcji komórek apoptotycznych przez kombinacje I-CBP112-lek, sprawdzony został wpływ inhibitora na poziom białek mogących odpowiadać za oporność wielolekową nowotworów – transporterów ABC, akumulowanie oraz wewnętrzkomórkową lokalizację leków. Uzyskane wyniki potwierdziły działanie I-CBP112 wyciszące transkrypcję większości genów ABC oraz nasiloną akumulację leków (Figura 2).

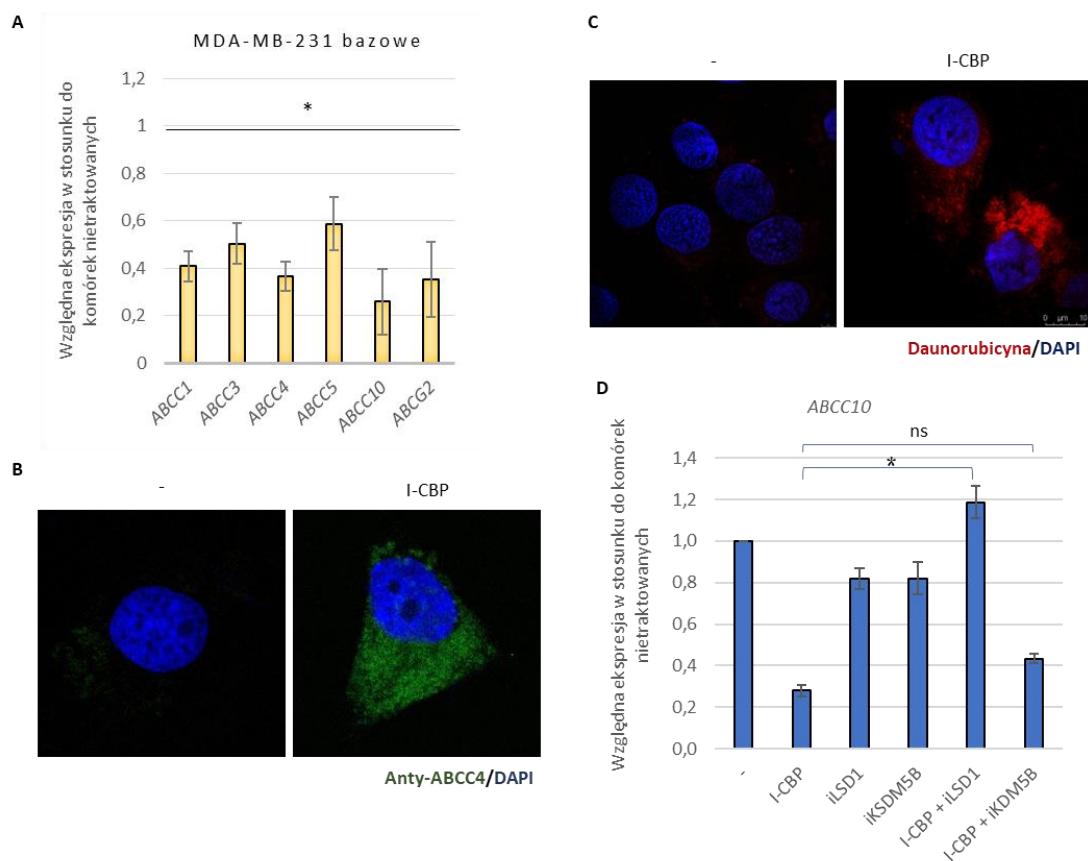


Figura 2. I-CBP112 obniża ekspresję genów ABC, nasila akumulowanie leków, a jego działanie jest zależne od LSD1. (A)(B) Real-Time PCR oraz mikroskopia konfokalna wskazały na obniżony poziom transorterów ABC po zastosowaniu badanego inhibitora bromodomeny. (C) Nasilone akumulowanie daunorubicyny zostało określone przy pomocy mikroskopii konfokalnej. DNA zostało wybarwione DAPI. (D) Wpływ inhibitorów LSD1 oraz KDM5B w połączeniu z I-CBP112 oraz indywidualnie na zmiany w ekspresji ABCC10 został określony przy pomocy metody Real-Time PCR. Uzyskane wyniki ujawniły, że badany inhibitor działa w sposób LSD1-zależny.

W ramach badań porównałam działanie inhibitora I-CBP112 oraz powszechnie stosowanego inhibitora obecnych w błonie białek z grupy ABCC – probenecidu. Uzyskane wyniki podkreśliły porównywalną skuteczność działania probenecidu i I-CBP112 względem nasilenia toksyczności leków oraz zwiększenia akumulowania leków. Ostatni etap badań omówionej publikacji dotyczył zbadania mechanizmu działania I-CBP112 względem transkrypcji transporterów ABC. Wygenerowane wyniki jednoznacznie wskazywały na zależne od białka LSD1 hamowanie ekspresji genów ABC przez badany inhibitor bromodomeny CBP/p300 (Figura 2) (15).

W drugiej pracy eksperimentalnej pt.: „*I-CBP112 declines overexpression of ATP-binding cassette transporters and sensitized drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines to chemotherapy drugs*” wykazano przeciwnowotworowe właściwości inhibitora I-CBP112 względem wygenerowanych, klinicznie istotnych linii nowotworowych MDA-MB-231 oraz A549. Oceniono także bezpieczeństwo badanego związku. Jako pierwszy określony został profil oporności uzyskanych linii. Etap ten obejmował porównanie wrażliwości komórek na działanie wybranych cytostatyków oraz określenie zmian w poziomie transporterów ABC między liniami opornymi i bazowymi. Wyindukowane linie oporne wykazywały obniżoną wrażliwość na większość chemioterapeutyków, z wyjątkiem 5-fluorouracylu. Obniżony poziom aktywności kaspaży 3/7 w liniach opornych w odpowiedzi na traktowanie cytostatykami potwierdził istotny spadek wrażliwości wyindukowanych linii. Nabyciu oporności towarzyszył wzrost ekspresji białek ABC (Figura 3).

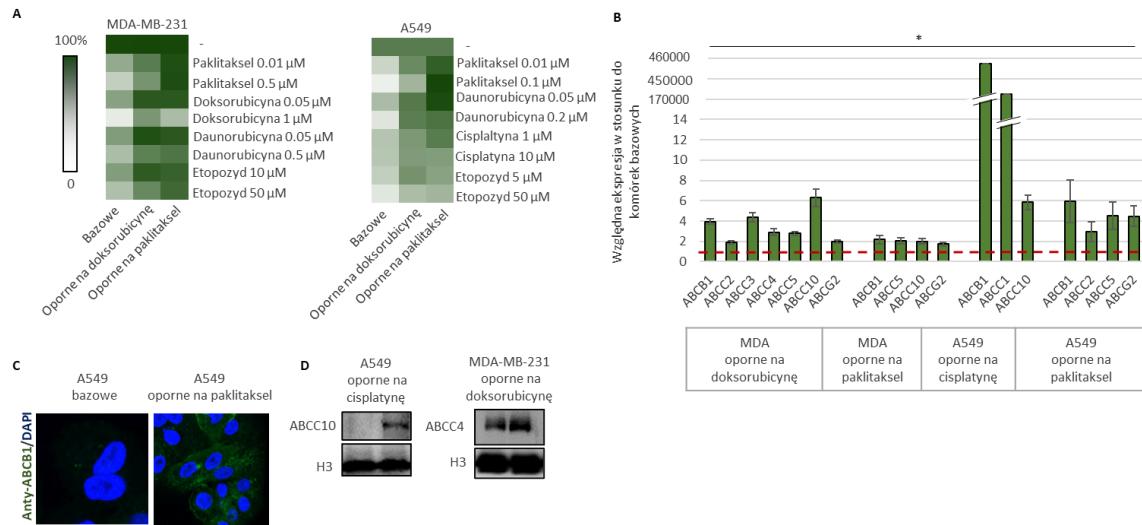


Figura 3. Linie oporne wykazują zmniejszoną wrażliwość na leki oraz zwiększyony poziom transporterów ABC. (A) Test żywotności z wykorzystaniem resazuryny wykazał, że wyindukowanie klinicznie istotne linie oporne wykazały mniejszą wrażliwość na wybrane cytostatyki w porównaniu z liniami bazowymi MDA-MB-231 oraz A549. Ponadto nadekspresja transporterów ABCB1, grupy ABCC oraz ABCG2 została potwierdzona z wykorzystaniem (B) metody Real-Time PCR na poziomie mRNA, (C) mikroskopii konfokalnej oraz (D) metody Western Blot.

W kolejnym etapie badań oceniono wpływ inhibitora I-CBP112 na transkrypcję genów ABC w liniach opornych A549 i MDA-MB-231. Związek ten w stężeniu 2,5 µM istotnie obniżała ekspresję większości badanych genów z wykluczeniem *ABCC4* we wszystkich liniach poza A549 opornymi na paklitaksel, *ABCC10* w A549 opornych na cisplatynę i ABCB1 w linii A549 opornej na paklitaksel (Figura 4). Pomiar fluorescencji doksorubicyny, daunorubicyny i paklitakselu Oregon-Green potwierdził hamowanie akumulowania leków przez I-CBP112. Ponadto cytometria przepływową pozwoliła na porównanie działania badanego inhibitora CBP/p300 z działaniem znanych inhibitorów iABC takich jak probenecid, tariquidar i MK-571 na akumulowanie leków .

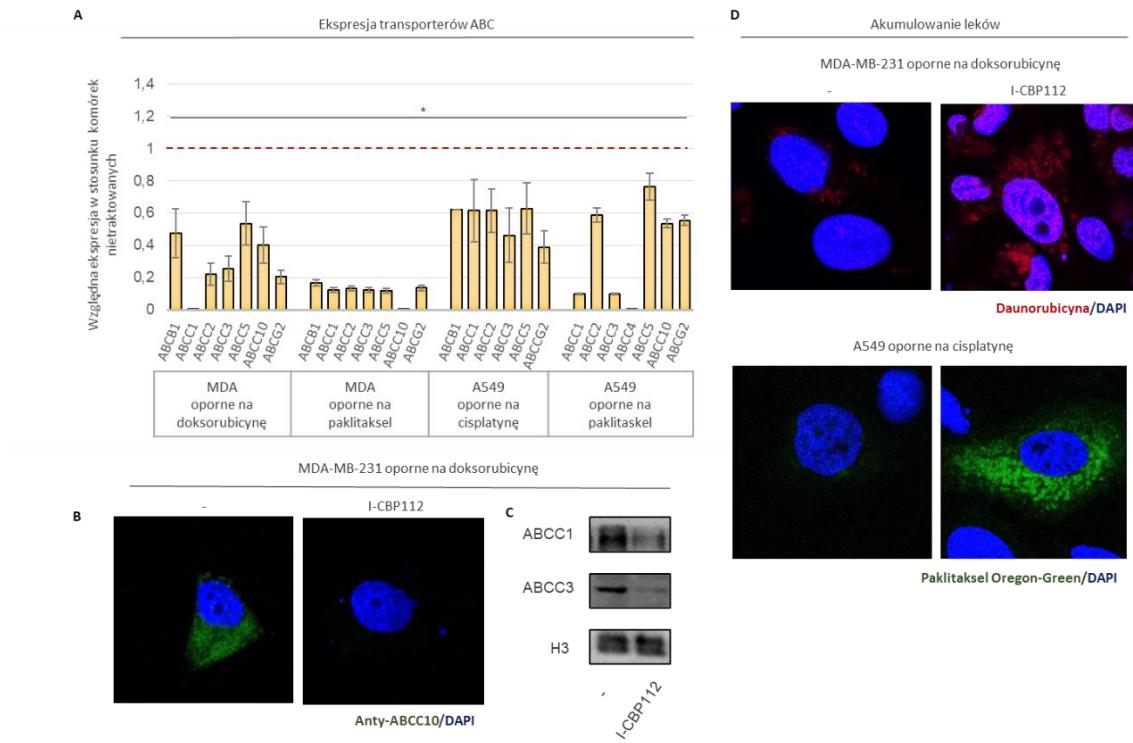


Figura 4. I-CBP112 hamuje ekspresję genów kodujących transportery ABC, które ulegają nadekspresji podczas uzyskiwania oporności na leki, a także nasila akumulowanie leków przeciwnowotworowych. Obniżona ekspresja transporterów ABC została potwierdzona za pomocą metody Real-Time PCR (A), mikroskopii konfokalnej (B) oraz metody Western Blot (C). (D) Ponadto porównanie autofluorescencji daunorubicyny oraz znakowanego paklitakselu Oregon-Green z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej potwierdził nasiloną akumulację wybranych cytostatyków wewnętrz komórek opornych.

Nawiązując do mechanizmu działania I-CBP112 powodującego wiązanie LSD1 do promotorów genów ABC opisanego w pierwszej pracy eksperimentalnej, sprawdziłem wpływ inhibitora LSD1 na zależne od inhibitora CBP/p300 hamowanie transkrypcji wybranych genów ABC oraz zmiany w poziomie trzymetylacji lizyny 4 histonu H3. W komórkach linii opornych na dokoszorubicynę MDA-MB-231 i opornych na paklitaksel A549 - I-CBP112 istotnie obniżył badaną metylację na promotorach genów ulegających nadekspresji w liniach opornych. Ponadto traktowanie komórek inhibitorem LSD1 zahamowało działanie I-CBP112 obniżające ekspresję genów kodujących transportery ABC (Figura 5). Wynik ten potwierdził niezależny od linii komórkowej mechanizm działania I-CBP112.

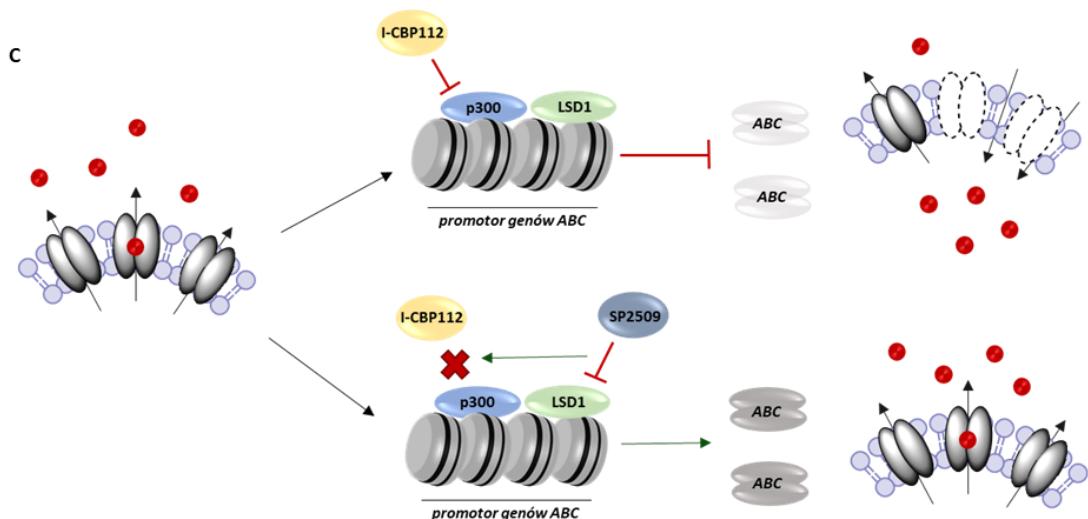
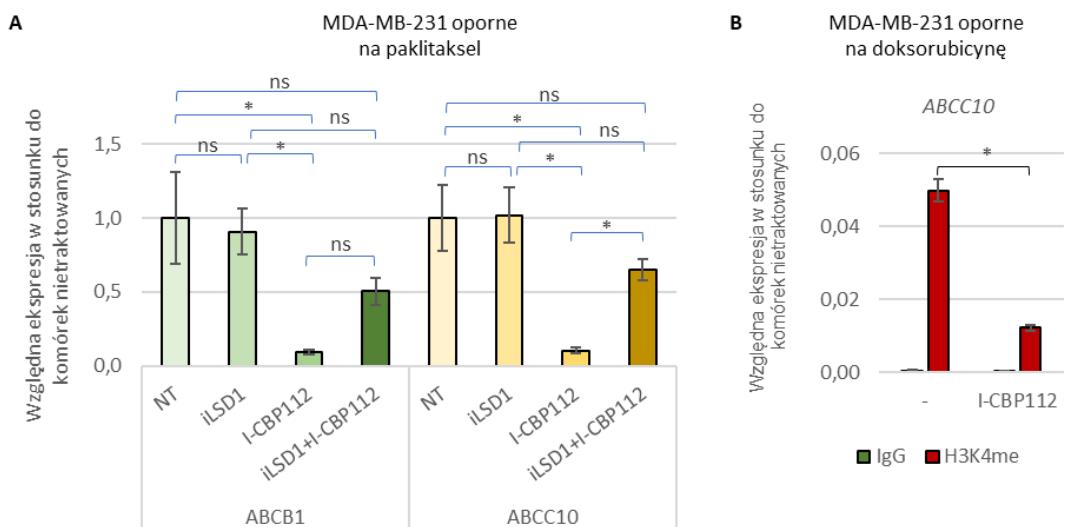


Figura 5. I-CBP112 działa w sposób LSD1-zależny oraz obniża trzymetylację H3K4. (A) Wpływ inhibitora LSD1 na działanie represywne I-CBP112 względem *ABCB1* i *ABCC10* został określony z wykorzystaniem Real-Time PCR. (B) Zmiana w metylacji H3K4 spowodowana działaniem I-CBP112 na promotorze genu *ABCC10* została potwierdzona za pomocą techniki ChIP-qPCR. (C) Schemat prawdopodobnego mechanizmu działania I-CBP112 w obecności oraz przy braku demetylazy LSD1.

Analiza dokowania ABCB1 wykazała, że inhibitor I-CBP112 łączy się z resztami aminokwasowymi w kieszeni C1, które oddziałują z doksorubicyną, jednakże nie prezentował miejsc wspólnych z Tariquidarem. Oddziaływał z resztami aminokwasowymi obecnymi w kieszeniach C1 i C2 białka ABCG2, które są również odpowiedzialne za wiązanie Tariquidaru oraz doksorubicyny. W przypadku białka ABCC1, I-CBP112 wiązało się do kieszeni C2, która bierze udział w wiązaniu doksorubicyny, Reversanu oraz MK-571 (Figura 6). Pomimo wyniku sugerującego, że I-CBP112 może hamować transport doksorubicyny przez transporter ABCC1, analiza krótkookresowego wpływu inhibitora na akumulowanie leków nie wykazała istotnych zmian w poziomie wewnętrzkomórkowej fluorescencji doksorubicyny, daunorubicyny oraz paklitakselu. Sugeruje to, że związek ten nie hamuje bezpośrednio aktywności ABCC1. Co ważniejsze, I-CBP112 uwrażliwia oraz zwiększa cytotoxiczność opornych linii nowotworowych na działanie cytostatyków, a jednocześnie, poza obniżeniem ekspresji transporterów ABC, uaktywnia dodatkowe szlaki śmierci komórkowej na co wskazuje spadek żywotności komórek po traktowaniu samym inhibitorem. Ponadto, w przypadku niektórych cytostatyków I-CBP112 działał skuteczniej na nasilenie działania leków niż powszechnie znane inhibitory ABC.

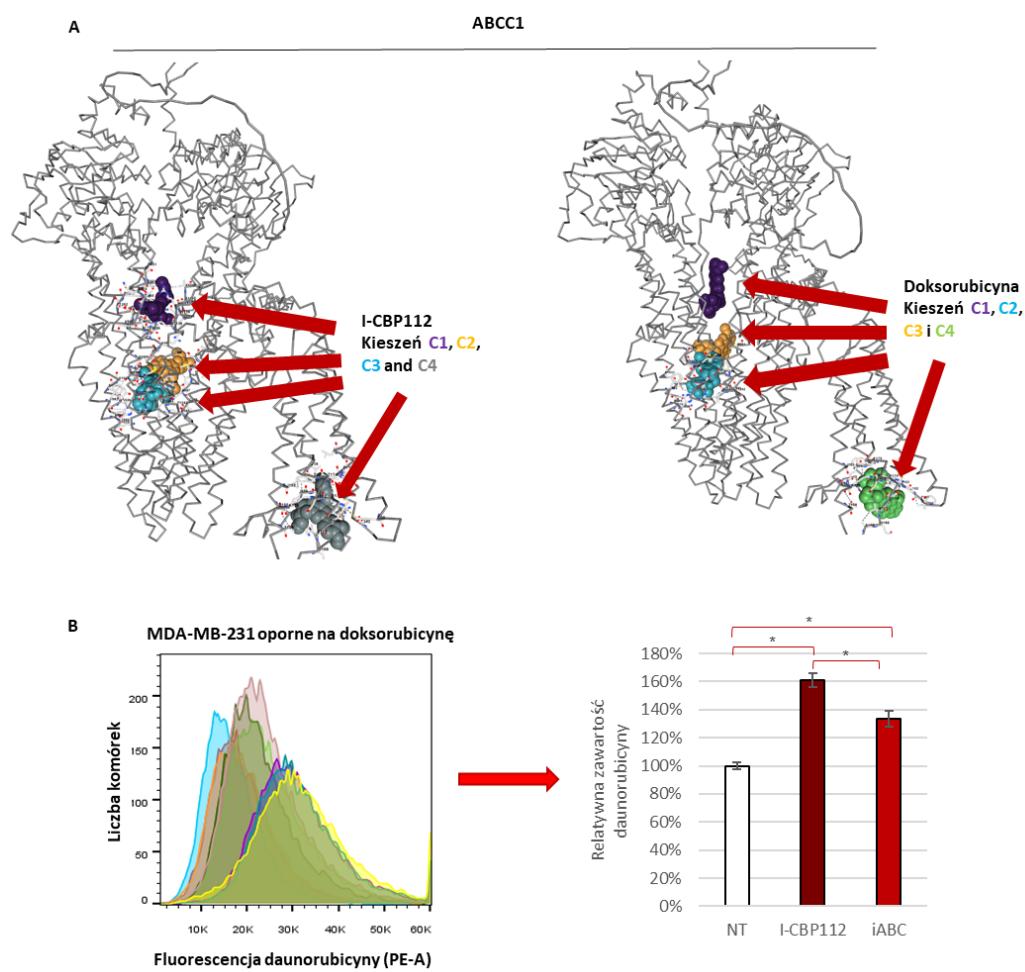


Figura 6. I-CBP112 łączy się z ABCC1 w miejscu wiążania doksorubicyny oraz wpływa na zwiększoną akumulację antracyklin. (A) Dokowanie molekularne I-CBP112 oraz doksorubicyny z białkiem ABCC1 zostało wykonane w programie CB-Dock2. (B) Cytometria przepływową pozwoliła na zaobserwowanie wyższej akumulacji daunorubicyny po inkubacji z I-CBP112 oraz iABC.

Kolejny etap obejmował eksperymenty na sferoidach, które lepiej niż hodowle 2D odzwierciedlają warunki w guzach rakowych. Badany inhibitor istotnie nasilił indukcję apoptozy oraz obkurczanie się guza w kombinacji z lekami (Figura 7).

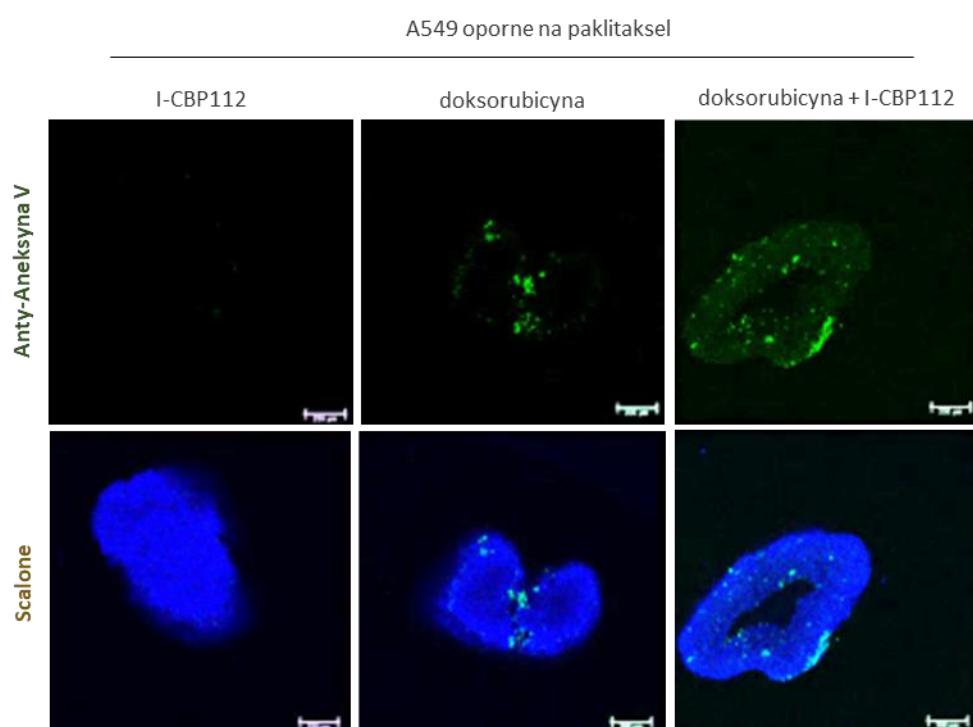


Figura 7. I-CBP112 nasila indukcję apoptozy w następstwie traktowania doksorubicyną

Mając na uwadze fakt, iż inhibitor I-CBP112 w połączeniu z chemioterapeutykami może być potencjalnym kandydatem do badań *in vivo*, postanowiłam określić profil bezpieczeństwa badanego związku względem komórek pierwotnych i prawidłowych. Wyniki uzyskane w ramach tego etapu zwróciły uwagę na kilka istotnych właściwości I-CBP112. Po pierwsze badany inhibitor polaryzuje makrofagi M0 w kierunku prozapalnym – M1, po drugie nie nasila toksyczności leków przeciwnowotworowych w hodowlach limfocytów oraz monocytów *in vitro*, a także nie wpływa bezpośrednio na żywotność badanych w tym etapie komórek prawidłowych. Posiada także preferowane właściwości ADME, wykazuje wysoką biodostępność, a także nie wykazuje profilu toksyczności względem komórek prawidłowych (Figura 8) (16).

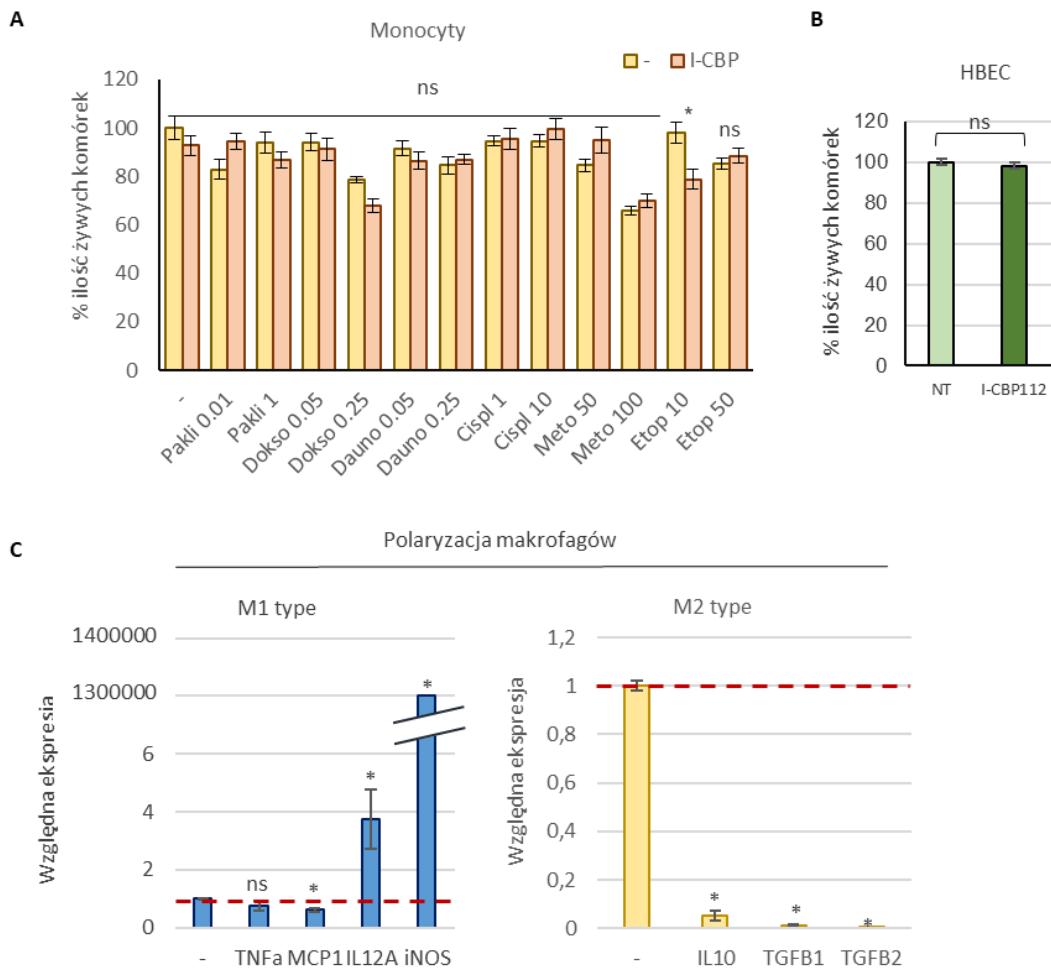


Figura 8. I-CBP112 nie jest toksyczny względem komórek prawidłowych oraz polaryzuje makrofagi w kierunku przecinowotorowym M1. (A) Pomiar żywych komórek (monocytów) z wykorzystaniem testu z resazuryną wskazał na brak nasilenia toksyczności wybranych cytostatyków po zastosowaniu I-CBP112, (B) a ponadto nie wpłynął bezpośrednio ich żywotność komórek prawidłowych HBEC. (C) Wpływ I-CBP112 na polaryzację makrofagów w kierunku prozapalnym został określony przez pomiar ekspresji genów charakterystycznych dla profilu M1 oraz M2.

Mając na uwadze, że zjawisko poli(aneu)ploidii pojawia się w następstwie działania takich cytostatyków jak cisplatyna, dokсорubicyna, czy paklitaksel (17), postanowiłam sprawdzić, czy badany wcześniej inhibitor I-CBP112 wpływa na generowanie komórek PGCC, a także czy będzie nasilał proces polinukleacji indukowany cytostatykami. Eksperyment ten został przeprowadzony w celu uzupełnienia profilu bezpieczeństwa inhibitora bromodomeny CBP/p300.

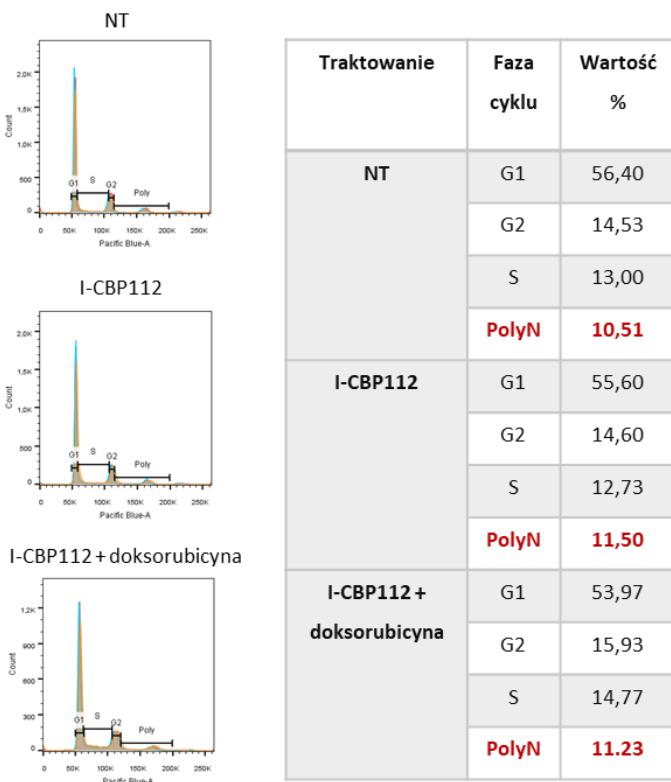


Figura 9. I-CBP112 nie indukuje poli(aneu)ploidii oraz nie nasila polinukleacji w połączeniu z doksorubicyną. Poziom polinukleacji w linii MDA-MB-231 opornej na doksorubicynę określony został za pomocą cytometrii przepływowej. Następnie wykonana została analiza uzyskanych wyników z wykorzystaniem programu FlowJo w oparciu o zależność fluorescencji znacznika DAPI od wewnętrzkomórkowej zawartości DNA odpowiadającej konkretnym fazom cyklu mitotycznego. Wyniki w trzech powtórzeniach biologicznych dla wybranej linii przedstawione zostały w formie histogramu z zaznaczeniem podziału na poszczególne fazy cyklu komórkowego. Wyniki uśrednione z trzech powtórzeń zostały przedstawione w tabeli.

Ewaluacja wpływu I-CBP112 na generowanie procesu poli(aneu)ploidii jednoznacznie wskazała na brak indukcji polinukleacji po indywidualnym zastosowaniu I-CBP112 oraz w połączeniu z doksorubicyną (Figura 9). Mając na uwadze zaprezentowany w drugiej pracy eksperymentalnej profil bezpieczeństwa oraz powyższe wyniki, mogę jednoznacznie stwierdzić, że I-CBP112 jest idealnym kandydatem do dalszych badań przedklinicznych i klinicznych.

W kolejnym etapie postanowiłem scharakteryzować oraz porównać właściwości farmakokinetyczne i potencjalne cele poboczne I-CBP112 z innymi opisanymi inhibitorami CBP/p300. W pracy przeglądowej, w której umieszczono także wyniki rozległych analiz *in silico*, uwzględnione zostały inhibitory trzech grup: inhibitory domeny katalitycznej, inhibitory bromodomény oraz najnowsze, podwójne inhibitory, które jednocześnie celują w centrum katalityczne CBP/p300 oraz BET (bromodomienę i domenę zewnętrznokońcową).

Podobieństwo leku		Absorpcaja		Dystrybucja		Wydalanie			
Zasada Lipinskiego	Ocena biodostępności	Rozpuszczalność w wodzie	Wchłanianie jelitowe	Przepuszczalność przez barierę krew-mózg	Boiled egg model	Całkowite oczyszczanie	Substrat OCT2 dla nerek	Narzędzie Swiss Target Prediction	Narzędzie pkCSM
I-CBP112	Tak	0,55	-4,985	94,911	-0,371	Tak	0,649	Nie	<ul style="list-style-type: none"> • Kinaza tyrozynowo-białkowa SRC → Kinaza • Kinaza białkowo-tyrozynowa ABL → Kinaza • Receptor czynnika wzrostu śródblonka naczyniowego 1 → Kinaza • Receptor naskórkowego czynnika wzrostu erbB1 → Kinaza
Oczekiwane wyniki	* Tak	* 0,55-0,85	* log Kp > -2,5	* Powyżej 30%	* 0,3 do -1	* Im wyżej tym lepiej			Substrat glikoproteiny P

Tabela 1. Podsumowanie przykładowych właściwości ADMET oraz celów pobocznych inhibitora I-CBP112.

Inhibitor I-CBP112 należy do grupy benzoksazepin i hamuje działanie p300 przy IC50 – 625 nM, natomiast CBP już przy 170 nM. Do najczęstszych celów побocznych opisywanego inhibitora należą kinazy, a wśród nich kinazy ABL, SRC oraz receptory czynników wzrostu (Tabela 1). Hamowanie p300/CBP i innych białek sprzyjających wzrostowi i przerzutowaniu raka, które opisane zostały w niniejszej pracy, może nasilać efekt działania obserwowany przy hamowaniu aktywności wyłącznie p300/CBP.

Proces ADP-rybozylacji p300 odgrywa istotną rolę w regulowaniu transkrypcji genów (18). Mając na uwadze fakt, iż I-CBP112 obniża ekspresję transporterów ABC poprzez inhibicję bromodomenu CBP/p300, postanowiłem sprawdzić, czy zastosowanie inhibitorów białka PARP1, będącego kofaktorem p300, również spowoduje represję genów zależnych od wspomnianej wyżej acetyltransferazy. Weryfikacji poddana została hipoteza o udziale PARP1 w p300-zależnej nadekspresji transporterów ABC w komórkach linii MDA-MB-231 opornej na cisplatynę i dokosorubicynę. Istotnym dla sformułowania tej hipotezy było również zaobserwowanie wyższego stopnia ADP-rybozylacji białek i uszkodzeń DNA w komórkach opornych.

W tym celu zastosowałem dwa inhibitory białka PARP1 – Olaparib i Veliparib, różniące się mechanizmem działania. Olaparib indukuje powstawanie „pułapkowych” kompleksów PARP-DNA w miejscu uszkodzenia DNA, a także zatrzymuje aktywność enzymatyczną białka PARP, co prowadzi do śmierci komórki nowotworowej. Veliparib jest silnym inhibitorem PARP1 oraz PARP2, którego mechanizm działania polega głównie na hamowaniu aktywności PARPu.

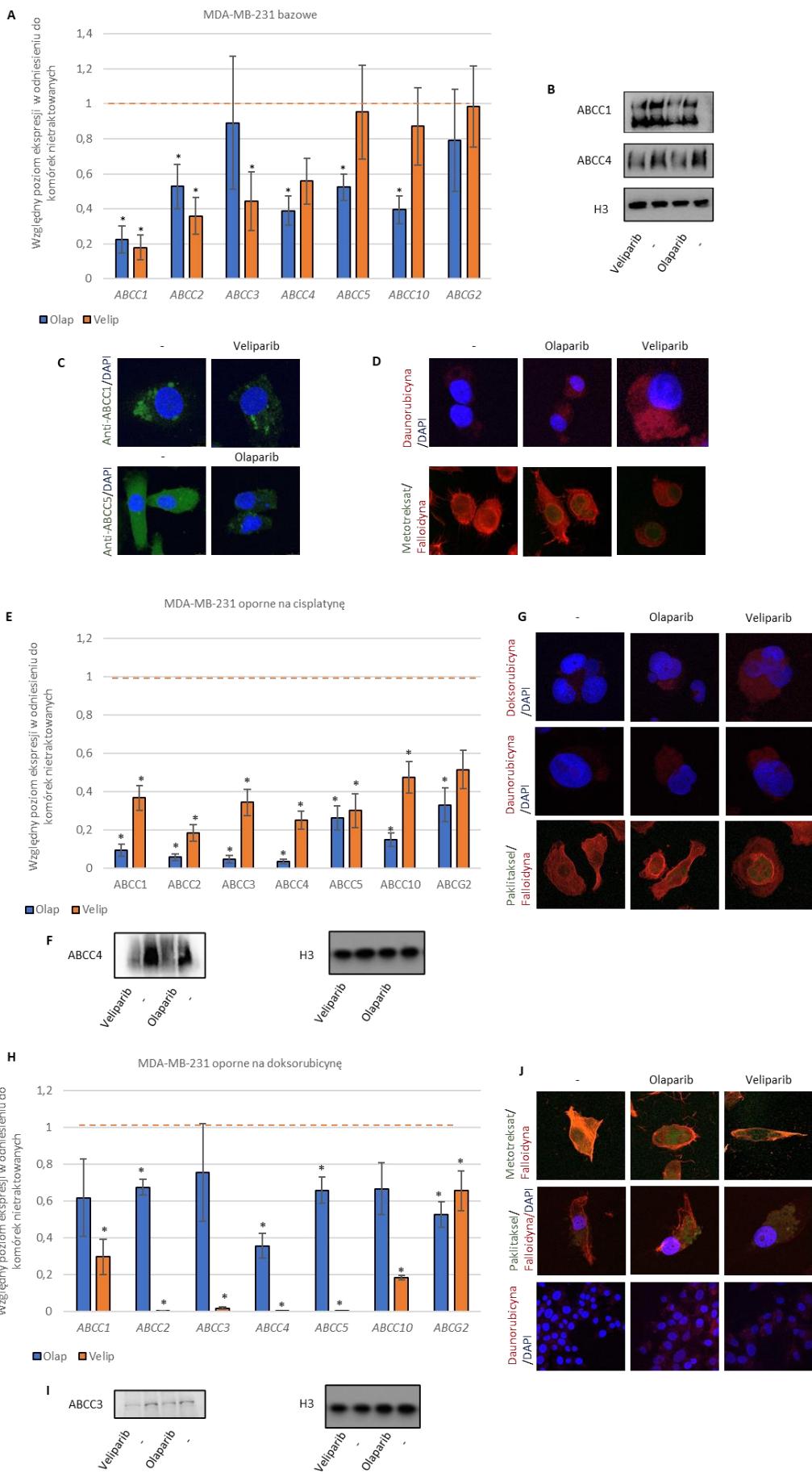


Figura 10. Inhibitory PARP wycisząją transkrypcję p300-zależnych genów ABC i przyczyniają się do zwiększonej akumulacji leków w linii MDA-MB-231 bazowej, opornej na doksorubicynę oraz paklitaksel.
(A)(E)(H) Zmiany w transkrypcji genów ABC określone zostały z wykorzystaniem techniki Real-Time PCR.
(B)(F)(I) Represja wybranych genów potwierdzona została techniką Western Blot, a histon H3 posłużył jako kontrola wewnętrzna. (C) Mikroskopia konfokalna pozwoliła na potwierdzenie zmian w ekspresji transporterów ABC na poziomie białka (D)(G)(J) oraz wpływu inhibitorów na akumulowanie wybranych cytostatyków.

Badania nad inhibitorami PARP oraz ich wpływem na ekspresję genów kodujących transportery ABC rozpoczęłam od weryfikacji zmian w poziomie mRNA i białka wybranych transporterów. W linii bazowej MDA-MB-231 istotny spadek ekspresji genów kodujących transportery ABC widoczny był dla *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3* i *ABCC4* po zastosowaniu obydwu inhibitorów, podczas gdy Olaparib obniżał również poziom mRNA genów *ABCC5* i *ABCC10*. Działanie inhibitorów potwierdzono dla genów *ABCC1* i *ABCC4* potwierdzony został techniką Western Blot. Dodatkowo mikroskopia konfokalna potwierdziła obniżoną ekspresję *ABCC1* w obecności Veliparibu oraz *ABCC5* w obecności Olaparibu. Zastosowanie inhibitorów iPARP podwyższyło akumulowanie daunorubicyny i metotreksatu. Taki sam układ eksperymentalny wykonany został dla linii MDA-MB-231 opornych na cisplatynę i doksorubicynę. W przypadku komórek opornych obniżona została ekspresja wszystkich badanych genów z grupy ABCC, a także ABCG2. Wzrost akumulowania po inkubacji z Olaparibem i Veliparibem widoczny był dla doksorubicyny, daunorubicyny oraz paklitakselu Oregon-Green w komórkach opornych na cisplatynę, zaś dla metotreksatu, paklitakselu oraz daunorubicyny w przypadku komórek opornych na doksorubicynę. Ze względu na brak istotności klinicznej linii MDA-MB-231 opornej na cisplatynę oraz jej charakter czysto kontrolny, dalsze eksperymenty przeprowadzone zostały tylko na linii bazowej oraz opornej na doksorubicynę (Figura 10).

Biorąc pod uwagę coraz liczniejsze doniesienia dotyczące wpływu białka HPF1 na PARP1-zależną ADP-rybozylację w obecności uszkodzeń DNA oraz wpływ inhibitorów PARPu na obniżenie poziomu transporterów ABC, przetestowany został wpływ wyciszenia składowych kompleksu PARP1/HPF1 na ekspresję tych transmembranowych białek. Wykorzystanie techniki Real-Time PCR dowiodło, że wyciszenie PARP1 i HPF1 odgrywa ważną rolę w regulacji ekspresji transporterów ABC w linii opornej na doksorubicynę, ponieważ obniża poziom wszystkich badanych białek ABC.

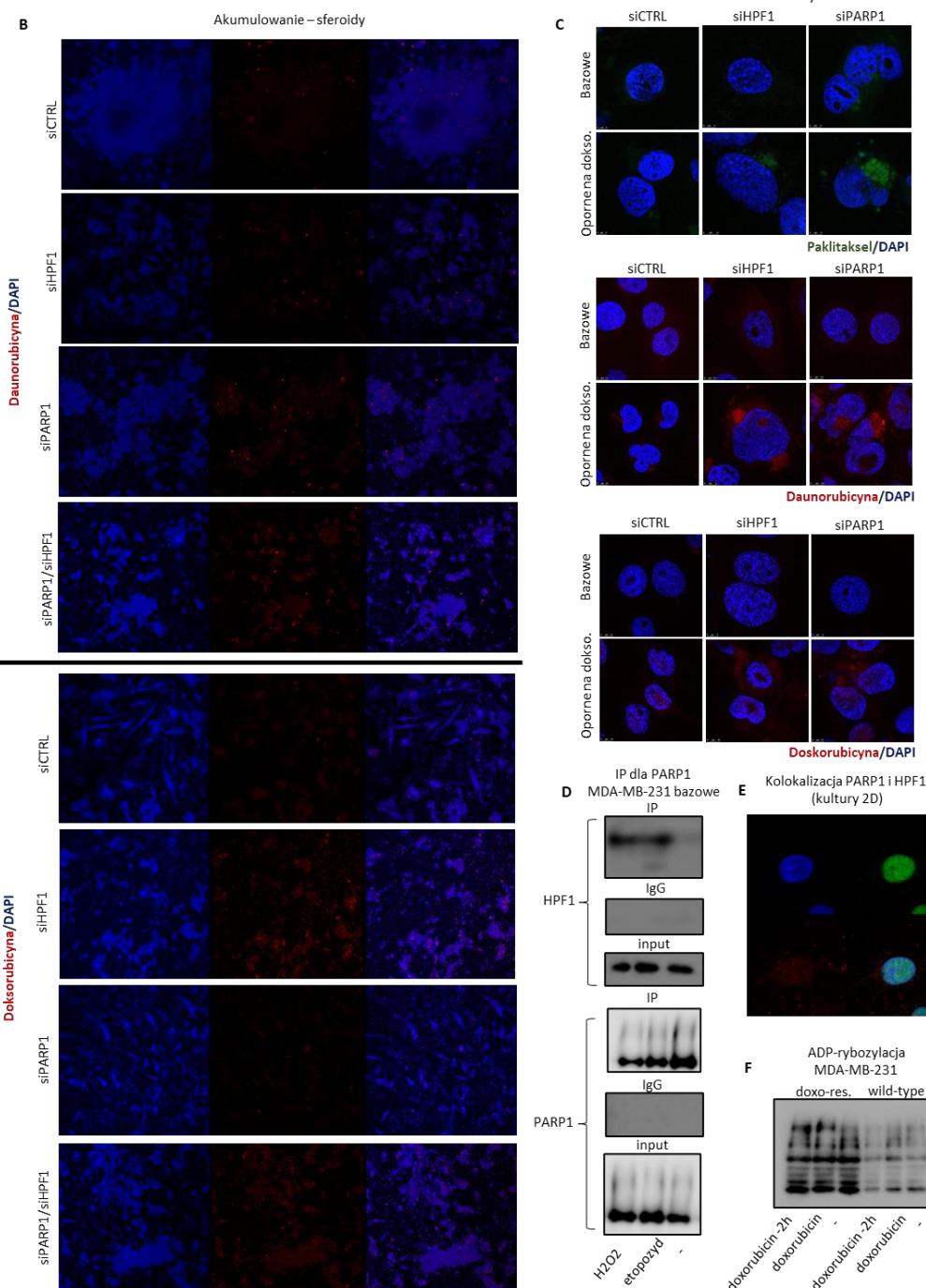
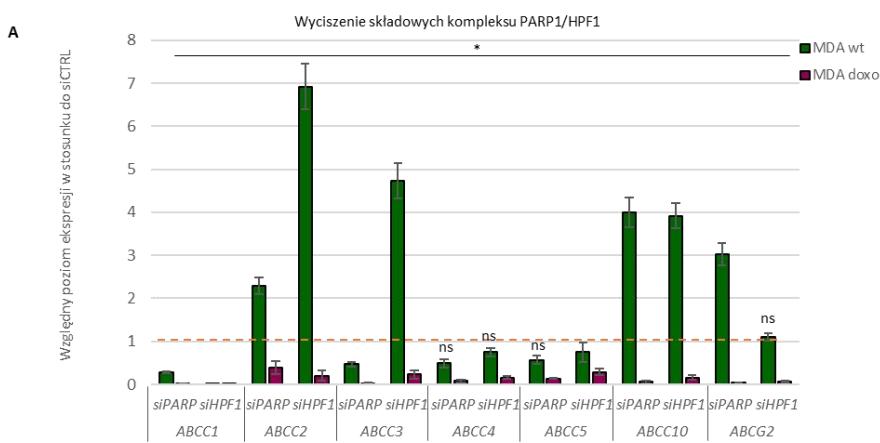


Figura 11. Wyciszenie składowych kompleksu PARP1/HPF1 obniża ekspresję transporterów ABC, podwyższa akumulację leków w kulturach 2D i 3D, a ponadto formowanie się kompleksu jest zależne od czynników uszkadzających DNA. (A) Zmiany w ekspresji transporterów ABC określone zostały za pomocą real-time PCR. (B)(C)(E) Mikroskopia konfokalna pozwoliła na określenie wpływu wyciszenia na akumulowanie leków w kulturach 2D oraz 3D, a także na oznaczenie poziomu kolokalizacji białek kompleksu. (D) W celu zweryfikowania zależności tworzenia się kompleksu od czynników uszkadzających DNA wykonana została ko-immunoprecypitacja PARP1 z detekcją HPF1. (F) Poziom ADP-rybozylacji określony został techniką Western Blot w komórkach linii MDA-MB-231 bazowej oraz opornej na doksorubicynę traktowanych i nietraktowanych doksorubicyną.

W przypadku linii bazowej wyciszenie PARP1 działało hamującą na transkrypcję genów *ABCC1*, *ABCC3*, *ABCC4* i *ABCC5*, a wyciszenie HPF1 zahamowało ekspresję wyłącznie genu *ABCC1*. W linii opornej na doksorubicynę, w której obecne były uszkodzenia DNA nawet bez traktowania jej lekami, jednoskładnikowe wyciszenie PARP1 lub HPF1 obniżyło ekspresję wszystkich badanych genów ABC sugerując zależność działania kompleksu względem ABC od uzyskanej oporności wielolekowej (Figura 11). W kolejnym kroku zmierzony został poziom akumulowania cytostatyków w kulturach 2D oraz 3D – sferoidach po wyciszeniu PARP1 i HPF1. W linii opornej na doksorubicynę wyciszenie składników kompleksu podwyższyło akumulowanie leków przeciwnowotworowych, jednak efekt ten nie był widoczny dla linii bazowej. Zobrazowanie obydwu białek za pomocą immunodetekcji połączonej z mikroskopią konfokalną potwierdziło ich kolokalizację w jądrze komórkowym. W celu zweryfikowania hipotezy o tworzeniu się kompleksu PARP1/HPF1 w wyniku wyższego poziomu uszkodzeń w liniach opornych, potraktowano linię bazową MDA-MB-231 induktorami uszkodzeń DNA takimi jak H₂O₂ i etopozyd. Ko-immunoprecypitacja PARP1 z detekcją komponentu kompleksu za pomocą Western Blot potwierdziła fizyczną interakcję białek w odpowiedzi komórek linii bazowej na działanie czynników stresowych. Jak wspomniano wcześniej, poziom ADP-rybozylacji w linii opornej na doksorubicynę był wyższy niż w linii bazowej MDA-MB-231, co wskazuje na wyższą aktywność PARP1 w fenotypie opornym i możliwy wyższy poziom uszkodzeń DNA, który jest czynnikiem predysponującym do formowania kompleksu PARP1/HPF1. Inkubacja komórek bazowych z doksorubicyną w niewielkim stopniu nasilała stopień ADP-rybozylacji PARP1 w przeciwieństwie do linii opornej, gdzie zaobserwowano istotny wzrost aktywności tego enzymu. Zważywszy na różnice w poziomie ADP-rybozylacji PARP1 pomiędzy badanymi liniami postanowiłem sprawdzić czy poza czynnikami uszkadzającymi DNA inne wewnętrzkomórkowe mechanizmy mogą wpływać na aktywność PARP1 (Figura 11). Wcześniej sze prace eksperymentalne wskazywały na rolę potranslacyjnych modyfikacji PARP1 w determinowaniu jego aktywności enzymatycznej. W tym celu porównany został poziom

modyfikacji potranslacyjnych takich jak metylacja, acetylowanie oraz fosforylacja PARP1 pomiędzy linią MDA-MB-231 bazową, oporną na doksorubicynę oraz oporną na paklitaksel (Figura 12).

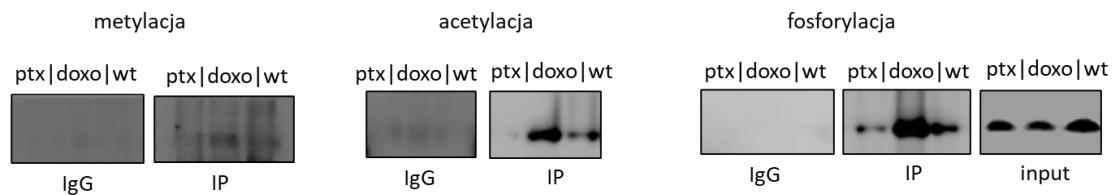


Figura 12. Modyfikacje potranslacyjne białka PARP1. Technika Western Blot pozwoliła na zwizualizowanie oraz porównanie zmian w modyfikacjach potranslacyjnych białka PARP1 takich jak acetylowanie, metylacja i fosforylacji pomiędzy liniami MDA-MB-231 o różnej oporności na leki.

Najwyższy poziom wszystkich badanych modyfikacji widoczny był w linii MDA-MB-231 opornej na doksorubicynę. Obniżenie stopnia acetylowania, metylacji i fosforylacji względem linii bazowej widoczny był dla linii opornej na paklitaksel (Figura 12). Według doniesień literaturowych metylacja i acetylowanie niektórych aminokwasów nasila aktywność białka PARP1. Fosforylacja na początku domeny BRCT prowadzi do aktywacji białka PARP1, jednakże gdy fosforylacja następuje na reszcie Ser177 aktywność białka zostaje zahamowana. Ze względu na fakt, że przeciwciwało wykorzystane do oceny fosforylacji miało szeroki zakres detekcji (pan-fosforylacja), nie możemy jednoznacznie stwierdzić, czy aktywność białka w badanych liniach jest nasilana, czy hamowana przez nasiloną fosforylację w linii opornej na doksorubicynę.

W dalszej kolejności podjęto próbę zidentyfikowania miejsc występowania PARP1 i HPF1 w genomie komórek bazowych i opornych na doksorubicynę za pomocą techniki ChIP-Seq. Ze względu na brak możliwości zidentyfikowania HPF1 na chromatynie, do dalszej analizy wzięły został wynik sekwencjonowania regionów bogatych tylko w PARP1. Przeprowadzona analiza bioinformatyczna pozwoliła na wyłonienie regionów bogatych w PARP1 w odległości do \pm 170 000 od miejsca inicjacji transkrypcji (TSS) wybranych transporterów ABC (Figura 13).

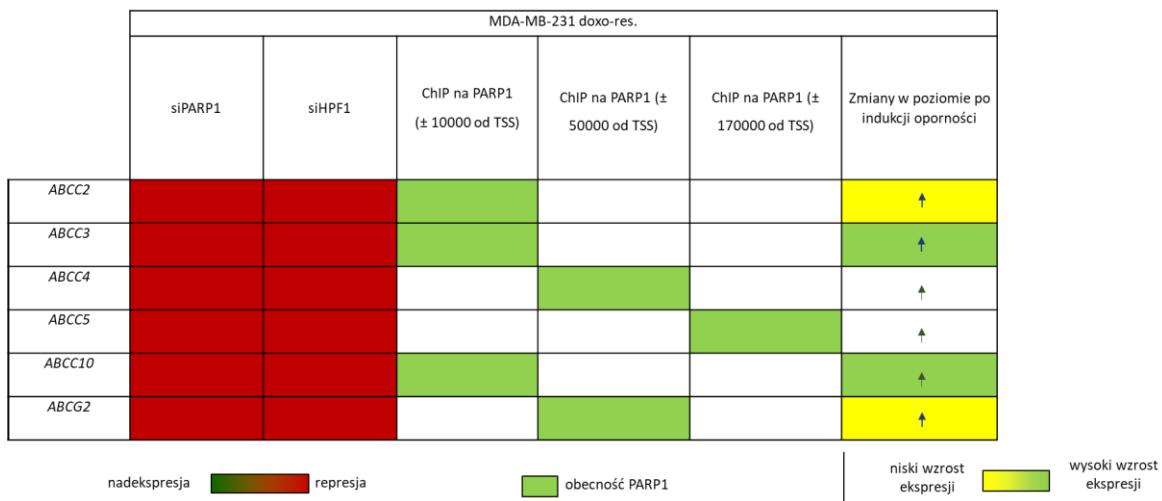


Figura 13. Podsumowanie zależności transkrypcji genów *ABCC3*, *ABCC4* oraz *ABCC5* od białek PARP1 i HPF1, występowanie PARP1 na chromatynie w określonych odległościach od miejsca inicjacji transkrypcji genów ABC oraz zmiany ich poziomu po wyindukowaniu oporności

Ze względu na niski wzrost ekspresji *ABCC2* i *ABCG2* w linii opornej względem linii bazowej do dalszej analizy motywów wybrane zostały regiony bogate w PARP1 genów: *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC5* i *ABCC10*. Ekspresja tych właśnie genów spadała po wyciszeniu PARP1 i jest istotna przy nabieraniu oporności na doksorubicynę. Narzędzie XSTREME z pakietu MEME-Suite pozwoliło na wygenerowanie listy czynników transkrypcyjnych wspólnych dla branych pod uwagę genów w linii opornej. Ze względu na brak możliwości uzyskania motywów dla regionu bogatego w PARP1 znajdującego się w odległości \pm 10 000 od *ABCC10* postanowiłem sprawdzić, czy białko ma istotny wpływ na nabytą oporność komórek na doksorubicynę. Wyciszenie *ABCC10* za pomocą si*ABCC10* nie wypłynęło w istotny sposób na wrażliwość komórek na działanie wybranych leków. Ponieważ *ABCC10* nie wykazał znaczenia dla nabycie przez komórki oporności, region bogaty w PARP1 dla tego genu został pominięty na kolejnych etapach analiz i wnioskowania.

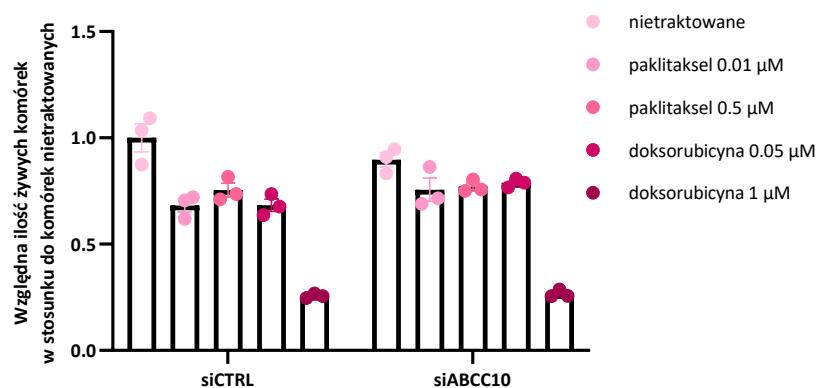


Figura 14. Wpływ wyciszenia ABCC10 na żywotność komórek.

Wyciszenie ABCC10 nie wpłynęło znacząco na żywotność komórek traktowanych badanymi lekami, z tego względu identyfikację istotnego czynnika transkrypcyjnego dla PARP1-zależnej ekspresji genów wykonałam tylko dla motywów wygenerowanych do regionów wspólnych dla PARP1 oraz ABCC3, ABCC4 i ABCC5 (Figura 14).

Z trzech wyłonionych czynników najbardziej prawdopodobnym wydawał się SMARCA1, który należy do rodziny białek SWI/SNF odpowiedzialnych za remodeling chromatyny. Może on być koregulatorem transkrypcji ABCC3, ABCC4 i ABCC5 wyłącznie w linii opornej na doksorubicynę, ponieważ nie pojawił się na liście motywów wyłonionych na regionach wzbogaconych w PARP1 w linii bazowej (Figura 15).

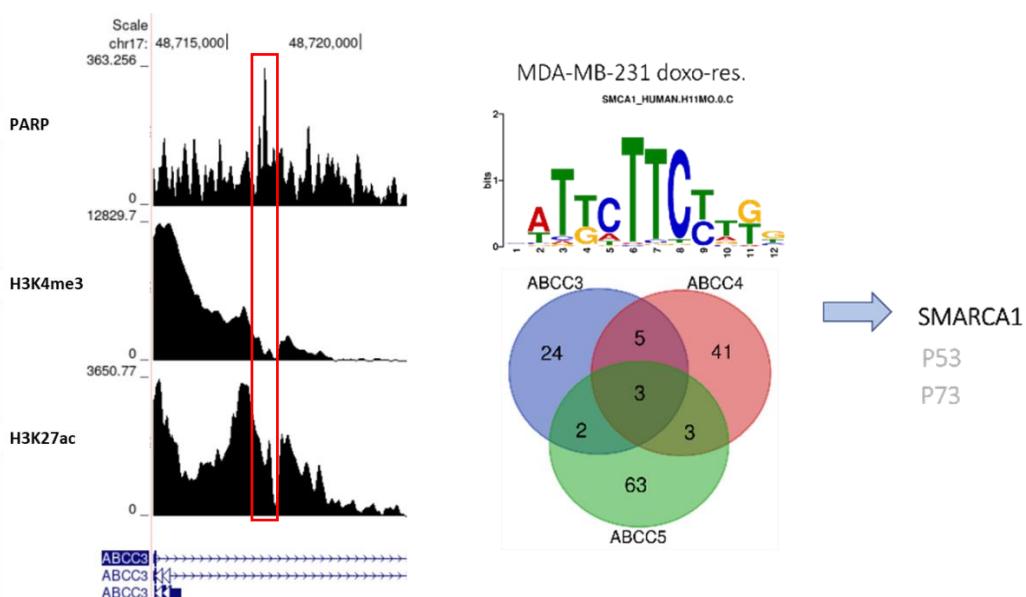


Figura 15. Analiza regionów wybranych do wygenerowania listy czynników odpowiedzialnych za PARP1-zależną ekspresję transporterów ABCC3, ABCC4 i ABCC5.

W kolejnym kroku zweryfikowałam wpływ wyciszenia SMARCA1 na ekspresję transporterów ABC, aby potwierdzić jego rolę jako koregulatora transkrypcji wybranych genów PARP1-zależnych. Wyciszenie SMARCA1 istotnie obniżyło ekspresję genów kodujących ABCC3 i ABCC4, pozostając jednocześnie bez wpływu na ekspresję tych transporterów w linii bazowej MDA-MB-231. Ponadto siSMARCA1 nie obniżyło transkrypcji ABCC5, co wskazuje na prawdopodobny udział innych koregulatorów kontrolujących transkrypcję tego genu w linii opornej na doksorubicynę. Test żywotności oparty na metabolizmie resazuryny wykonany na komórkach z normalnym i zredukowanym poziomem SMARCA1 wykazał, że wyciszenie tego czynnika oraz zastosowanie inhibitora pan-ABCC w podobnym stopniu obniżało odsetek żywych komórek traktowanych

doksorubicyną ($1 \mu\text{M}$) i paklitaksemem ($0,01 \mu\text{M}$) w hodowli MDA-MB-231 opornej na doktorubicynę (Figura 16).

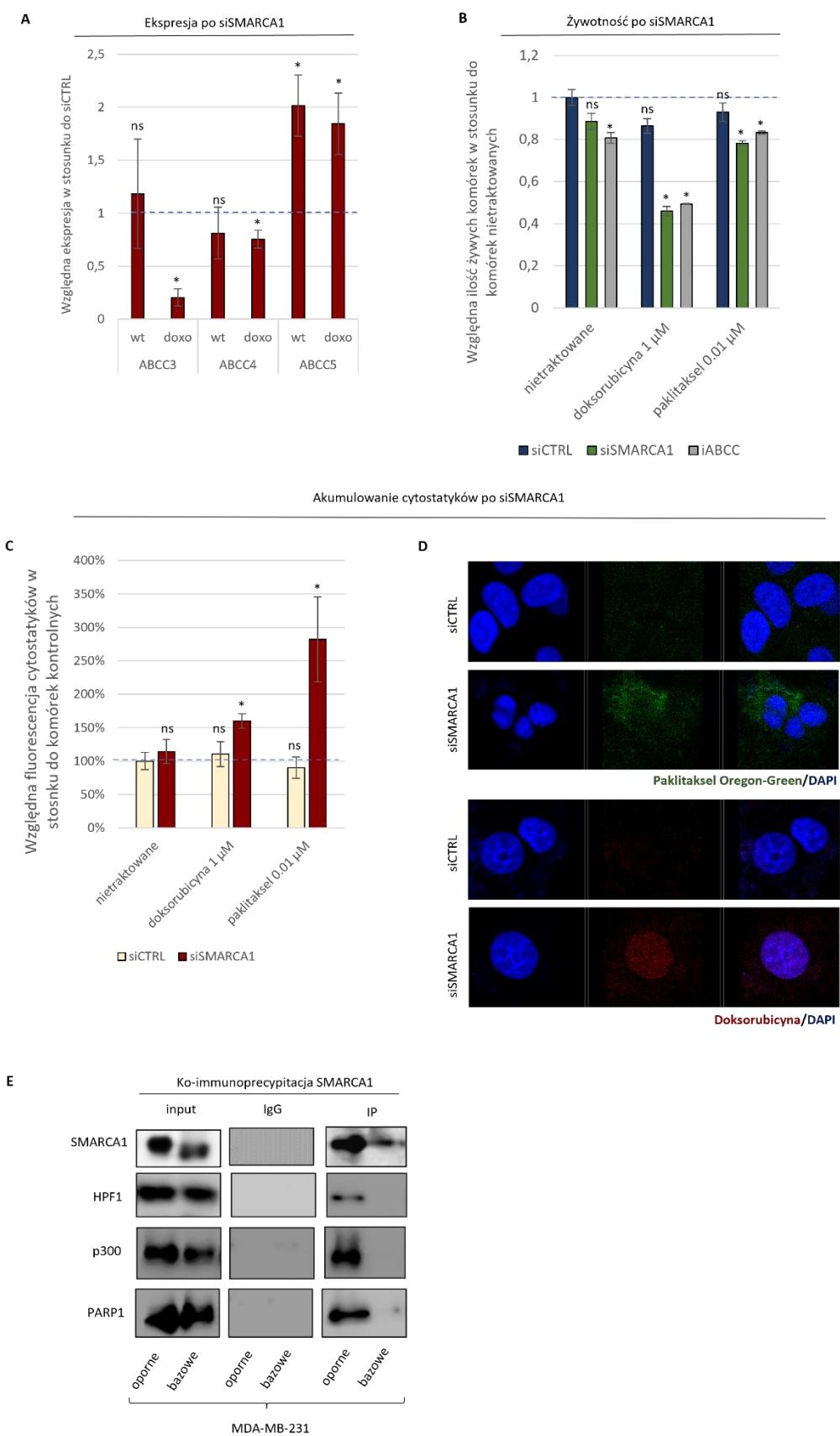


Figura 16. Wpływ wyciszenia SMARCA1 na ekspresję genów ABCC3, ABCC4 oraz ABCC5 oraz wrażliwość komórek na działanie wybranych leków. (A) Technika Real-Time PCR pozwoliła na określenie zmian w ekspresji wybranych genów ABCC po wyciszeniu SMARCA1 w linii MDA-MB-231 bazowej oraz opornej na doksorubicynę. (B) Test z resazuryną wykonany został w celu porównania żywotności komórek po wyciszeniu SMARCA1 oraz zastosowaniu powszechnie znanego inhibitora pan-ABCC - probenecidu w układzie z doksorubicyną ($1 \mu\text{M}$) oraz paklitaksemem ($0,01 \mu\text{M}$). Akumulowanie cytostatyków po wyciszeniu SMARCA1 zmierzone zostało przy pomocy czytnika fluorescencyjnego (C) oraz mikroskopii konfokalnej (D). (E) Ko-immunoprecytypitacja białka SMARCA1 pozwoliła na weryfikację fizycznej interakcji immunoprecytywowanego białka z PARP1, HPF1 oraz p300.

Na ostatnim etapie badań zweryfikowałam wpływ wyciszenia zidentyfikowanego czynnika SMARCA1 na akumulowanie doksorubicyny oraz paklitakselu. Miało to na celu określenie funkcjonalnej korelacji pomiędzy wyciszeniem wybranych transporterów ABC, oczekiwany wzrostem poziomu leków wewnętrz komórek i zaobserwowanym wzrostem wrażliwości komórek na działanie leków, ponieważ wyciszenie SMARCA1 mogło wpływać na inne mechanizmy powiązane z aktywnością kompleksu SWI/SNF na chromatynie i transkrypcję szeregu innych genów. Dwie metody pomiaru akumulacji doksorubicyny: na czytniku fluorescencyjnym oraz za pomocą mikroskopii konfokalnej, jednoznacznie wskazały na wyższy poziom leków wewnętrz komórek po wyciszeniu SMARCA1. Stało się to podstawą do sformułowania wniosku o związku pomiędzy aktywnością SMARCA1 i obecnością tego białka w miejscach regulatorowych ABCC3 i ABCC4, a p300/PARP1-zależną transkrypcją tych genów i nabytą opornością na wybrane leki. Biorąc pod uwagę fakt, że wyciszenie HPF1 powodowało spadek ekspresji genów p300/PARP1/SMARCA1-zależnych można założyć, że HPF1 jest częścią wymienionego kompleksu.

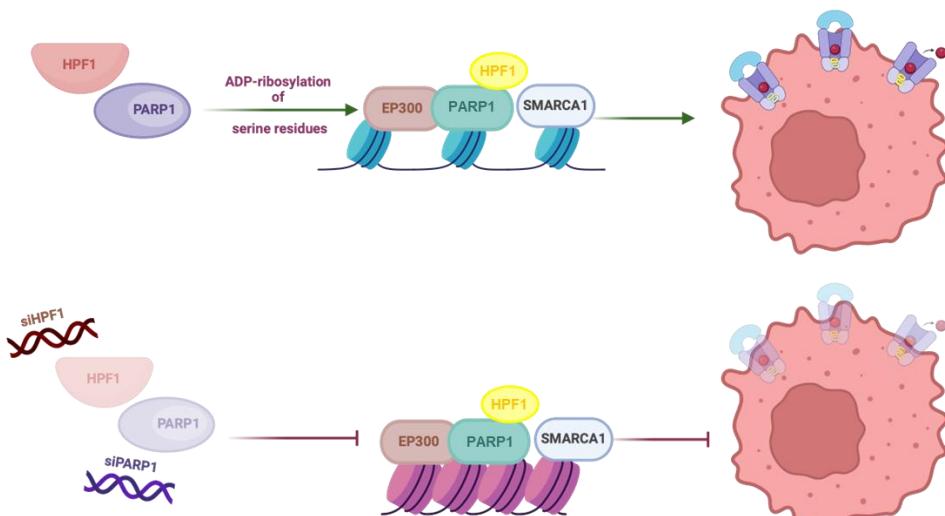


Figura 17. Proponowany schemat interakcji p300/PARP1/SMARCA1 na ekspresję transporterów ABC i oporność wielolekową komórek

10. Wnioski

Biorąc pod uwagę uzyskane w niniejszej pracy wyniki można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Transportery ABC odgrywają istotną rolę w oporności komórek nowotworowych na chemioterapeutyki
2. I-CBP112, który hamuje działanie CBP/p300, jest atrakcyjnym kandydatem do stworzenia terapii skojarzonej z niektórymi standardowo stosowanymi chemioterapeutykami, ponieważ nasila ich działanie obniżając ekspresję m.in. białek ABC także w liniach z już nabityą opornością wielolekową, jednocześnie nie wykazując bezpośredniej cytotoksyczności względem komórek prawidłowych i mając pożądany profil ADMET.
3. SMARCA1 odgrywa rolę w PARP-1/p300-zależnej ekspresji transporterów *ABCC3* i *ABCC4*, które okazały się istotne dla oporności uzyskanej po traktowaniu doksorubicyną linii potrójnie negatywnego raka piersi.

11. Literatura

1. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services [Internet]. [cytowane 13 grudzień 2024]. Dostępne na: <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>
2. Emran TB, Shahriar A, Mahmud AR, Rahman T, Abir MH, Siddiquee MohdFR, i in. Multidrug Resistance in Cancer: Understanding Molecular Mechanisms, Immunoprevention and Therapeutic Approaches. *Front Oncol.* 23 czerwiec 2022;12:891652.
3. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Res.* 1 lipiec 2001;11(7):1156–66.
4. Alam A, Locher KP. Structure and Mechanism of Human ABC Transporters. *Annu Rev Biophys.* 9 maj 2023;52(1):275–300.
5. Yu J, Ma H, He J, Wang M, Yu B, Ge S, i in. A pan-cancer analysis of the oncogenic role of ATP binding cassette subfamily E member 1 (ABCE1) in human tumors: An observational study. *Medicine.* 18 listopad 2022;101(46):e31849.
6. Jiang G, Deng W, Liu Y, Wang C. General mechanism of JQ1 in inhibiting various types of cancer. *Mol Med Report* [Internet]. 10 styczeń 2020 [cytowane 14 grudzień 2024]; Dostępne na: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2020.10927>
7. Shorstova T, Foulkes WD, Witcher M. Achieving clinical success with BET inhibitors as anti-cancer agents. *Br J Cancer.* 27 kwiecień 2021;124(9):1478–90.

8. Pang Y, Bai G, Zhao J, Wei X, Li R, Li J, i in. The BRD4 inhibitor JQ1 suppresses tumor growth by reducing c-Myc expression in endometrial cancer. *J Transl Med.* grudzień 2022;20(1):336.
9. Bagratuni T, Mavrianou N, Gavalas NG, Tzannis K, Arapinis C, Lontos M, i in. JQ1 inhibits tumour growth in combination with cisplatin and suppresses JAK/STAT signalling pathway in ovarian cancer. *European Journal of Cancer.* luty 2020;126:125–35.
10. Wang YM, Gu ML, Meng FS, Jiao WR, Zhou XX, Yao HP, i in. Histone acetyltransferase p300/CBP inhibitor C646 blocks the survival and invasion pathways of gastric cancer cell lines. *International Journal of Oncology.* grudzień 2017;51(6):1860–8.
11. Conery AR, Centore RC, Neiss A, Keller PJ, Joshi S, Spillane KL, i in. Bromodomain inhibition of the transcriptional coactivators CBP/EP300 as a therapeutic strategy to target the IRF4 network in multiple myeloma. *eLife.* 5 styczeń 2016;5:e10483.
12. Morrison-Smith CD, Knox TM, Filic I, Soroko KM, Eschle BK, Wilkens MK, i in. Combined Targeting of the BRD4–NUT–p300 Axis in NUT Midline Carcinoma by Dual Selective Bromodomain Inhibitor, NEO2734. *Molecular Cancer Therapeutics.* 1 lipiec 2020;19(7):1406–14.
13. Principe DR, Xiong R, Li Y, Pham TND, Kamath SD, Dubrovsky O, i in. XP-524 is a dual-BET/EP300 inhibitor that represses oncogenic KRAS and potentiates immune checkpoint inhibition in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 25 styczeń 2022;119(4):e2116764119.
14. 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.* 25 sierpień 2017;7(1):9483.
15. 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.* 14 wrzesień 2021;13(18):4614.
16. Strachowska M, Gronkowska K, Sobczak M, Grodzicka M, Michlewska S, Kołacz K, i in. I-CBP112 declines overexpression of ATP-binding cassette transporters and sensitized drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines to chemotherapy drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* grudzień 2023;168:115798.
17. Zhang S, Mercado-Uribe I, Liu J. Tumor stroma and differentiated cancer cells can be originated directly from polyploid giant cancer cells induced by paclitaxel. *Intl Journal of Cancer.* luty 2014;134(3):508–18.
18. Ling F, Tang Y, Li M, Li QS, Li X, Yang L, i in. Mono-ADP-ribosylation of histone 3 at arginine-117 promotes proliferation through its interaction with P300. *Oncotarget.* 22 wrzesień 2017;8(42):72773–87.

12. Streszczenie pracy doktorskiej w języku polskim

Tytuł pracy doktorskiej: „*Przełamywanie oporności wielolekowej nowotworów na poziomie genomu: opracowanie metody zapobiegającej nadekspresji transporterów ABC w komórkach nowotworowych opartej na inhibitorach enzymów remodelujących chromatynę*”

Pomimo wieloletnich badań oraz wysiłków naukowców, mających na celu rozwój nowatorskich terapii, nowotwory stanowią nadal drugą najczęstszą przyczynę zgonów w Polsce, a chemioterapia jest najczęściej stosowaną metodą leczenia. U niemal połowy pacjentek z potrójnie ujemnym rakiem piersi następuje nawrót choroby po leczeniu tego typu terapią. Zjawisko to spowodowane jest nabyciem oporności wielolekowej (z ang. multidrug resistance – MDR) w efekcie działania czynników stresowych, takich jak hipoksja, radio- oraz chemioterapia. Komórki z MDR charakteryzują się spadkiem wrażliwości na działanie cytostatyków poprzez, między innymi, nadekspresję transporterów ABC oraz polinukleację. W jednej z poprzednich prac naszego zespołu zostało wykazane, że wyindukowanie oporności na cisplatynę w linii komórkowej A549 oraz MDA-MB-231 prowadziło do pojawienia się acetylotransferazy p300 na promotorze genu *ABCC10*. Z tego względu w pierwszej części pracy opisany został wpływ inhibitora bromodomeny CBP/p300 – I-CBP112 na obniżenie ekspresji transporterów ABC w liniach bazowych oraz istotnych z punktu widzenia klinicznego, wyindukowanych liniach opornych MDA-MB-231 oraz A549. Ponadto zweryfikowany został profil bezpieczeństwa badanego związku względem linii prawidłowych oraz zdolność I-CBP112 do indukowania oraz nasilania poli(aneu)ploidii, która należy do mechanizmów oporności komórek nowotworowych. Uzupełnieniem do niniejszych eksperymentów było przygotowanie dwóch prac przeglądowych dotyczących zjawiska polinukleacji w nowotworach, a także porównania właściwości farmakokinetycznych, parametrów ADMET oraz celów pobocznych komercyjnie dostępnych inhibitorów CBP/p300 różniących się mechanizmem działania. Mając na uwadze fakt, że białko PARP1 jest koregulatorem działania CBP/p300 w drugiej części pracy skupiłam swoją uwagę na wpływie kompleksu PARP1/HPF1 na regulację ekspresji transporterów ABC, a także identyfikacji czynnika transkrypcyjnego odpowiedzialnego za PARP1-zależną transkrypcję genów *ABCC3*, *ABCC4* i *ABCC5*.

W niniejszej pracy przedstawione zostały wyniki z dwóch opublikowanych prac eksperymentalnych, które jednoznacznie wskazują na istotny wpływ inhibitora bromodomeny I-CBP112 na przełamywanie oporności wielolekowej linii bazowych oraz opornych MDA-MB-231 i A549. I-CBP112 uwrażliwia komórki poprzez obniżenie ekspresji transporterów ABC, zwiększenie akumulacji leków przeciwnowotworowych, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia IC50 wybranych cytostatyków. Co więcej, badany inhibitor bromodomeny CBP/p300 posiada pożądane

właściwości ADMET, nie wykazuje toksyczności względem linii prawidłowych, a także nie indukuje procesu polinukleacji. Udało mi się również wykazać, że I-CBP112 działa na tej samej ścieżce regulacyjnej co powszechnie stosowany inhibitor pan-ABCC, a jego działanie jest zależne od demetylazy LSD1.

W drugiej części pracy wykazałam istotną rolę białka PARP1 w regulowaniu transkrypcji genów ABC. Zastosowania inhibitorów PARP oraz wyciszeniu składowych kompleksu PARP1/HPF1 powodowało obniżenie ekspresji istotnych dla oporności genów i nasiliło akumulowanie wybranych cytostatyków w kulturach 2D oraz w sferoidach. Co istotne, sama aktywność PARP1 była większa w linii opornej na doksorubicynę, co mogło wynikać z większej tolerancji komórek opornych na działanie czynników uszkadzających DNA, a także zwiększonego poziomu modyfikacji potranslacyjnych tego białka takich jak metylacja, acetylowanie oraz fosforylacja. Etap identyfikacji czynnika transkrypcyjnego odpowiedzialnego za PARP1-zależną ekspresję transporterów ABCC3 i ABCC4 wyłonił SMARCA1 jako potencjalnego kandydata do dalszych badań. Jego istotny wpływ na wyindukowaną doksorubicyną oporność komórek został potwierdzony poprzez spadek ekspresji wybranych ABCC w komórkach z deficytem SMARCA1, któremu towarzyszył wzrost akumulowania wybranych leków przeciwnowotworowych i nasilenie ich cytotoxisyczności.

Mając na uwadze uzyskane w pierwszej części pracy wyniki mogę stwierdzić, że inhibitor p300/CBP - I-CBP112 jest atrakcyjnym kandydatem uzupełniającym standardową chemioterapię, ponieważ wpływa na zwiększenie jej skuteczności w liniach z wygenerowaną opornością wielolekową. Co więcej, nie jest toksyczny względem komórek prawidłowych, posiada pożadany profil ADMET, a także nie indukuje powstawania komórek poli(aneu)ploidalnych. PARP1 jest kofaktorem p300, działającym w regionach regulatorowych niektórych genów ABC, a mediatorem aktywności tego enzymu jest SMARCA1, który wchodzi w fizyczną interakcję z PARP1, HPF1 i p300.

13. Streszczenie pracy doktorskiej w języku angielskim

Title of the thesis: "*Overcoming multidrug resistance in cancer at the genome level: development of a method to prevent overexpression of ABC transporters in cancer cells based on inhibitors of chromatin remodeling enzymes*"

Despite years of research and scientists' efforts to develop novel therapies, cancer is still the second most common cause of death in Poland, and chemotherapy is the most widely used treatment. Nearly half of patients with triple-negative breast cancer experience a relapse after treatment with this type of therapy. This phenomenon is due to the acquisition of multidrug resistance (MDR) as a result of stress factors such as hypoxia, radio- and chemotherapy. Cells with MDR are characterized by decreased sensitivity to cytostatics through, among other things, overexpression of ABC transporters and polynucleation. In a previous work by our team, it was shown that induction of cisplatin resistance in the A549 and MDA-MB-231 cell lines led to the appearance of p300 acetyltransferase on the promoter of the *ABCC10* gene. Therefore, in the first part of the study, the effect of the CBP/p300 bromodomain inhibitor I-CBP112 on the down-regulation of ABC transporter expression in baseline and clinically relevant, induced resistance lines MDA-MB-231 and A549 was described. In addition, the safety profile of the test compound against normal lines was verified, as well as the ability of I-CBP112 to induce and enhance poly(aneu)ploidy, which is among the mechanisms of cancer cell resistance. Complementary to the present experiments, we prepared two review papers on the phenomenon of polynucleation in cancer, as well as a comparison of pharmacokinetic properties, ADMET parameters and collateral targets of commercially available CBP/p300 inhibitors differing in their mechanism of action. Considering that PARP1 protein is a correlator of CBP/p300 action, in the second part of the thesis I focused my attention on the effect of PARP1/HPF1 complex on the regulation of ABC transporter expression, as well as identification of the transcription factor responsible for PARP1-dependent transcription of *ABCC3*, *ABCC4* and *ABCC5* genes.

This paper presents results from two published experimental papers, which clearly demonstrate the significant effect of the bromodomain inhibitor I-CBP112 on breaking multidrug resistance of baselines and resistant MDA-MB-231 and A549. I-CBP112 sensitizes cells by down-regulating the expression of ABC transporters, increasing the accumulation of anticancer drugs, resulting in a lower IC₅₀ of selected cytostatics. Moreover, the tested CBP/p300 bromodomain inhibitor has desirable ADMET properties, does not show toxicity to healthy cell lines, and does not induce the process of polynucleation. I was also able to show that I-CBP112 acts on the same

regulatory pathway as the commonly used pan-ABCC inhibitor, and its action is dependent on LSD1 demethylase.

In the second part of the work, I demonstrated the essential role of PARP1 protein in regulating ABC gene transcription. Applications of PARP inhibitors and silencing of components of the PARP1/HPF1 complex resulted in decreased expression of resistance-relevant genes and enhanced accumulation of selected cytostatic agents in 2D cultures and in spheroids. Importantly, PARP1 activity itself was higher in the doxorubicin-resistant lineage, which could be due to the higher tolerance of resistant cells to DNA-damaging agents, as well as increased levels of post-translational modifications of this protein such as methylation, acetylation and phosphorylation. The stage of identifying the transcription factor responsible for PARP1-dependent expression of ABCC3 and ABCC4 transporters has identified SMARCA1 as a potential candidate for further study. Its significant effect on doxorubicin-induced cell resistance was confirmed by a decrease in the expression of selected ABCCs in SMARCA1-deficient cells, accompanied by an increase in the accumulation of selected anticancer drugs and enhanced cytotoxicity.

Considering the findings obtained in the initial section of the paper, I can conclude that the p300/CBP inhibitor I-CBP112 is an attractive candidate to complement standard chemotherapy, as it enhances its efficacy in lines with generated multidrug resistance. Moreover, it is not toxic to healthy cells, has a desirable ADMET profile, and does not induce the formation of poly(aneu)ploidy cells. PARP1 is a cofactor of p300, acting in regulatory regions of certain ABC genes, and the mediator of this enzyme's activity is SMARCA1, which physically interacts with PARP1, HPF1 and p300.

Kopie publikacji włączonych do rozprawy doktorskiej



Article

CBP/p300 Bromodomain Inhibitor—I-CBP112 Declines Transcription of the Key ABC Transporters and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapy Drugs

Magdalena Strachowska ¹, Karolina Gronkowska ¹, Sylwia Michlewska 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; magdalena.strachowska@edu.uni.lodz.pl (M.S.); karolina.gronkowska@edu.uni.lodz.pl (K.G.)

² Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland; sylwia.michlewska@biol.uni.lodz.pl

* Correspondence: agnieszka.robaszkiewicz@biol.uni.lodz.pl; Tel.: +48-42-2635-4144

Simple Summary: Despite tremendous advances in cancer treatment, chemotherapy remains the first-line choice in many tumor types. The action of numerous chemotherapy drugs is limited by the occurrence of ABC proteins in cancer cell membranes, which remove medicines from cell compartments. In this paper, we show that one of bromodomain inhibitors, namely I-CBP112, was capable of repressing genes that are responsible for multidrug resistance in all three studied cancer cell lines. CBP/p300 bromodomain inhibitor allows for the higher drug accumulation inside cells and considerably potentiated drug effects. At the molecular level, I-CBP112 caused rearrangement of chromatin at the ABC gene promoters by inducing recruitment of LSD1, which removes transcription-promoting histone marks. I-CBP112 emerges as a promising compound to overcome ABC-dependent cancer drug resistance.

Abstract: The high expression of some ATP-binding cassette (ABC) transporters is linked to multidrug resistance in cancer cells. We aimed to determine if I-CBP112, which is a CBP/p300 bromodomain inhibitor, altered the vulnerability of the MDA-MB-231 cell line to chemotherapy drugs, which are used in neoadjuvant therapy in patients with triple negative breast cancer (TNBC). MDA-MB-231 cells represent TNBC, which is negative for the expression of estrogen and progesterone receptors and HER2 protein. An I-CBP112-induced decrease in the expression of all the studied ABCs in the breast, but also in the lung (A549), and hepatic (HepG2) cancer cell lines was associated with increased accumulation of doxorubicin, daunorubicin, and methotrexate inside the cells as well as with considerable cell sensitization to a wide range of chemotherapeutics. Gene promoters repressed by I-CBP112 in MDA-MB-231 cells, such as ABCC1 and ABCC10, were characterized by enhanced nucleosome acetylation and, simultaneously, by considerably lower trimethylation in the transcription-promoting form of H3K4me3. The CBP/p300 bromodomain inhibitor induced the recruitment of LSD1 to the gene promoters. The inhibition of this demethylase in the presence of I-CBP112 prevented the repression of ABCC1 and ABCC10 and, to a considerable extent, cancer cells' sensitization to drugs. In conclusion, the CBP/p300 bromodomain inhibitor I-CBP112 can be considered as a potent anti-multidrug-resistance agent, capable of repressing key ABC transporters responsible for drug efflux in various cancer types.



Citation: 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. <https://doi.org/10.3390/cancers13184614>

Academic Editors:
Alexandre Escargueil and
Enrico Garattini

Received: 8 August 2021
Accepted: 12 September 2021
Published: 14 September 2021

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



Copyright: © 2021 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/>).

Keywords: I-CBP112; CBP/p300 bromodomain inhibitor; ATP-binding cassette transporters (ABC); lysine-specific demethylase 1A (LSD1); histone modifications; anticancer drugs

1. Introduction

Bromodomain inhibitors, having emerged as a promising class of anticancer drugs over the last decade, are now being tested in clinical trials for the treatment of various

types of cancers. These small-molecule inhibitors target bromodomains (BRDs), which are evolutionarily conserved protein–protein interaction modules characterized by a bundle of four α -helices linked to each other by loop segments of variable length [1]. This deep, largely hydrophobic pocket recognizes acetylated lysine residues on histone and, to a lesser extent, non-histone proteins. BRD-containing proteins represent a group of chromatin readers that are capable of histone recognition, further modifications, and the regulation of transcriptional machinery by the recruitment of molecular partners such as components of the transcriptional complex and positive elongation factor (P-TEFb) [2,3]. Some of these proteins act as transcription factors, such as the bromodomain and extraterminal domain (BET) family members BRD2–4 and BRDT, whereas many others serve as transcription activators, including histone acetyltransferases (EP300, GCN5, and CREBBP), methyltransferases (MLL and ASH1L), and SWI/SNF components (BRG1/SMARCA4).

In our previous reports, we showed that BRG1 and nucleosome acetylation were enriched at the promoters of some ATP-binding cassette transporters (ABC transporters), such as ABCC4, ABCC5, ABCC10, and ABCG2, in the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231. Membrane-bound ABC proteins are involved in ATP-dependent cellular transport across biological barriers. In addition to protecting cells from drugs and environmental toxins, these proteins play a role in the efflux of cholesterol and steroid hormones, vitamins, cytokines, and chemokines, as well as prostaglandins, thereby regulating intracellular processes [4]. The ABCC subgroup of this family, called multidrug-resistance proteins (MDRs), is particularly known for its involvement in cancer cell resistance to a wide range of anticancer drugs due to its low substrate specificity. However, proteins from other subfamilies, such as ABCB (ABCB1, glycoprotein-P or multidrug protein (MRP)) and ABCG (ABCG2, breast cancer resistance protein (BRCP)), also contribute to cancer irresponsiveness to chemotherapy. According to Chelamalla, 45% of cancers are resistant to standard anticancer drugs, and even initially responsive tumors develop resistance during the following cycles of chemotherapy [5], which is still leading among other anticancer approaches. For example, chemotherapy before surgery, known as neoadjuvant chemotherapy, is a frequent choice for treatment in women diagnosed with triple-negative breast cancer, since it leads to a pathologic complete response and improves disease-free survival and overall survival [6,7]. This tumor type accounts for about 10–15% of all breast tumors and does not respond to hormonal or HER2-targeted therapy, and the lack of estrogen, progesterone, and HER2 receptors limits the treatment options to a combination of surgery, radiation therapy, and chemotherapy. This has triggered intense interest in finding new medications that can treat this kind of breast cancer or improve current approaches.

Knowing that BRG1 forms a functional regulatory unit with EP300 and that acetyltransferase is responsible for the BRG1-driven transcriptional activity of some cell-cycle-dependent genes, we aimed to determine whether the specific acetyl-lysine competitive protein–protein interaction inhibitor I-CBP112, which targets the bromodomain of the two closely related and highly homologous acetyltransferases CBP/EP300, could decrease the expression of multidrug-resistance proteins in the triple-negative MDA-MD-231 breast cancer cell line and thereby enhance the toxicity of anticancer drugs. I-CBP112 was also shown to enhance nucleosome acetylation, probably by allosterically activating CBP/EP300, through bromodomain interactions [8]. The combination of I-CBP112 and A-485, targeting distinct parts of CBP/EP300—the bromodomain and histone acetyltransferase domain, respectively—arrested the proliferation of the prostate cancer cells as well as suppressed androgen-dependent and pro-oncogenic prostate genes, such as KLK3 (PSA) and c-Myc, which was followed by a strong reduction in p300 chromatin occupancy at their gene promoters [9]. In cultures of human and mouse leukemic cell lines, I-CBP112 impaired aberrant self-renewal and, interestingly, increased the sensitization of cells to the activity of the BET bromodomain inhibitor JQ1 and doxorubicin [10].

These examples indicate that I-CBP112 is capable of regulating the transcription of cancer genes and increasing cancer cells' vulnerability to, at least some, anticancer drugs. Given the above-mentioned findings, we studied the impact of the CBP/EP300 bromod-

omain inhibitor on the expression of ABC transporters, which are highly transcribed in the breast cancer cell line MDA-MB-231 and functionally linked to cancer multidrug resistance. We also assayed the possible impact of ABC-transporter modulation on the accumulation and toxicity of anticancer drugs. We tested a relatively large panel of therapeutics, which represents various mechanisms of anticancer activity, to find the most efficient combinations with I-CBP112.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

A549 and HepG2 cell lines were purchased from ATCC, whereas MDA-MB-231 from Sigma Aldrich. 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, oligonucleotides for ChIP-real-time PCR, KAPA SYBR® FAST Universal 2x, resazurin sodium salt, probenecid, daunorubucun hydrochloride, methotrexate, bleomycin sulfate (*Streptomyces verticillus*), Nunc® MicroWell™ 384 well optical bottom plates were from Sigma Aldrich (Poznan, Poland). Etoposide, doxorubicin hydrochloride, cisplatin, paclitaxel, SP2509 (iLSD1), and PBIT (iKDM5B) were from Cayman Chemical (Biokom, Janki/Warsaw, Poland). Nunc™ Lab-Tek™ chamber slides were ordered also in Biokom, Janki/Warsaw, Poland. Anti-CDK4 (sc-23896), anti-PCNA (sc-56) and anti-CCNE (sc-247) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (AMX, Lodz, Poland). The high-capacity cDNA reverse transcription kit, SuperSignal™ West Pico chemiluminescent substrate, TRI Reagent™, PageRuler™ pre-stained protein ladder (10 to 180 kDa), Pierce™ protease inhibitor tablets (EDTA-free; PIC), goat anti-mouse IgG (H + L) secondary antibody, HRP (32430), Texas red-X phalloidin, Pro-Long™ diamond antifade mountant, SlowFade™ glass soft-set antifade mountant (with DAPI), anti-MRP5 (ABCC5) polyclonal antibody (PA5102678), anti-MRP10 (ABCC10) polyclonal antibody (PA5101678), TaqMan™ Universal Master Mix II, TaqMan™ gene expression assays (FAM-MGB/20X) for ABCG2 (Hs01053790_m1), ABCC10 (Hs01056200_m1), ABCC5 (Hs00981089_m1), ABCB1 (Hs00184500_m1), ABCC1 (Hs01561483_m1), ABCC2 (Hs00960489_m1), ABCC3 (Hs00978452_m1), ABCC4 (Hs00988721_m1), GAPDH (Hs027866_24_g1), ACTB (Hs01064292_g1) were from ThermoFisher Scientific (ThermoFisher Scientific, Warsaw, Poland). Anti-ABCB1 (E1Y7B) rabbit mAb (#13342), anti-ABCC1 (D7O8N) rabbit mAb (#14685), ABCG2 (D5V2K) XP® rabbit mAb (#42078), anti-p300 (D2 × 6N) rabbit mAb (#54062), anti-ABCC4 (D2Q2O) rabbit mAb (#12705), anti-ABCC3 (D8V8J) rabbit mAb (#39909), anti-LSD1 (#2139), anti-histone H3 (#4620; ChIP grade), anti-H3K27ac (#4353), anti-H3K4me3 (#9751), normal rabbit IgG (#2729), anti-histone H3 (1B1B2; for Western blot) mouse mAb (#14269), anti-mouse IgG (H + L), F (ab')2 fragment (PE conjugate) (#59997), anti-rabbit IgG (H + L), F (ab')2 fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate) (#4412), anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (#7074) were from Cell Signaling Technologies (LabJOT, Warsaw, Poland). The FITC annexin V apoptosis detection kit with propidium iodide was purchased from BioLegend (BioCourse.pl, Katowice, Poland), ApoTox-Glo™ triplex assay was from Promega (Promega, Warsaw, Poland).

2.2. Cell Culture and Treatment with Inhibitors

A549 and HepG2 were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin (50 U/mL and 50 µg/mL, respectively) in 5% CO₂. Initially, MDA-MB-231 cells were cultured in F15 medium supplemented with 15% FBS and penicillin/streptomycin (50 U/mL and 50 µg/mL, respectively) without CO₂ equilibration. After 5 passages, the cells were adapted to grow in DMEM supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin (50 U/mL and 50 µg/mL, respectively) in 5% CO₂.

I-CBP112 was added to cells 72 h prior to analysis or treatment with anticancer drugs, which were administrated to cells for another 4–48 h (depending on the tested parameters).

2.3. Real-Time PCR

For mRNA quantification, the total RNA was extracted with TRI ReagentTM and reverse-transcribed with a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Thermofisher Scientific), and the expression of selected genes was measured with TaqManTM gene expression assays and the TaqManTM universal master mix II (Thermofisher Scientific), according to the protocol provided by the manufacturer (polymerase activation: 95 °C, 10 min; PCR cycles: denaturation at 95 °C, 15 s; annealing and extension at 60 °C, 1 min). ACTB and GAPDH (HSKG) were used for normalization, and the ratio between the studied gene and HSKG was assumed to be 1 for control (untreated) cells.

2.4. Western Blot

For protein visualization, cell lysates collected in RIPA buffer (supplemented with 1 mM PMSF, 1× protease inhibitor) were separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, and stained with primary antibodies (1:5000) at 4 °C overnight. After subsequent staining with HRP-conjugated secondary antibodies (1:10,000 for anti-rabbit and 1:500 for anti-mouse antibodies; room temperature; 2 h), the signal was developed using the SuperSignalTM west pico chemiluminescent substrate and acquired with a ChemiDoc-IT2 (UVP, Meranoco, Poznan, Poland). Histone H3 was used as the loading control. All the whole western blot figures can be found in the supplementary materials.

2.5. Confocal Microscopy

For the confocal imaging of ABC proteins, cells were seeded and treated with I-CBP112 on a NuncTM Lab-TekTM chamber slide, fixed with a 1% formaldehyde solution in PBS at room temperature for 15 min, washed 3× with PBS, and permeabilized and blocked with 1% FBS solution in PBS with 0.1% TritonX-100 at room temperature for at least 1 h. Primary antibodies (1:400) were added in 1% BSA solution in PBS with 0.1% TritonX-100 and incubated at 4 °C overnight. Secondary antibody (1:400) was added in 1% BSA solution in PBS with 0.1% TritonX-100 at room temperature for 2 h. After washing, the slides were mounted with SlowFadeTM glass soft-set antifade mountant (with DAPI). TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) with a 63×/1.40 objective (HC PL APO CS2, Leica Microsystems, Germany) was used for sample visualization. The samples were imaged with the following wavelength values for excitation and emission: 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. The fluorescence intensity was determined in arbitrary units (a.u.) with Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems, Germany). The level of baseline fluorescence was established individually for each experiment. For the visualization of drug accumulation, cells seeded on NuncTM Lab-TekTM chamber slides were treated with doxorubicin (0.5 μM), daunorubicin (0.5 μM), and methotrexate (5 μM) for 24 h. After washing the slides, anthracycline-treated cells were mounted with SlowFadeTM glass soft-set antifade mountant (with DAPI), whereas cells incubated with methotrexate were fixed with 1% formaldehyde solution in PBS at room temperature for 15 min, and actin filaments were stained with Texas red-X phalloidin (1:1000) in 1% BSA in PBS with 0.1% TritonX-100 at room temperature for 1 h. After washing with PBS, the slides were mounted with ProLongTM diamond antifade mountant.

The induction of phosphatidylserine externalization by the anticancer drugs (24 h) in I-CBP112-pretreated cells was detected by their staining with AnnexinV-FITC. After washing with PBS, AnnexinV-FITC was added to the cells in annexin binding buffer according to the manufacturer's instructions (room temperature, 30 min). After removing the residual unbound AnnexinV-FITC, the slides were mounted with SlowFadeTM glass soft-set antifade mountant (with DAPI). Subsequently, for the imaging of the samples, the confocal laser scanning microscopy platform TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) with a 63×/1.40 objective (HC PL APO CS2, Leica Microsystems, Germany) was used. The samples were imaged with wavelengths of 405 and 485 nm for emission and 430–480 and 500–550 nm

for excitation for DAPI and AnnexinV-FITC, respectively, using Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems). Autofluorescence-based quantification of drug accumulation

I-CBP112-treated and control cells were incubated with doxorubicin (0.5 μ M), daunorubicin (0.5 μ M), and methotrexate (5 μ M) at 37 °C for 4 h and washed 4× with PBS, and the drug fluorescence was measured with a fluorescence microplate reader (BioTek Synergy HTX, Biokom, Poland) at the following wavelengths: 485ex/590em nm for anthracyclines and 360ex/530em nm for methotrexate. Next, the cells were lysed by freezing, and the DNA was stained with 0.1 μ M DAPI at room temperature for 15 min. Fluorescence that corresponded to the DNA content was read at 360ex/460em nm. After subtracting the corresponding blanks, the autofluorescence of the drugs was normalized to the fluorescence of the DNA, and the ratio for control cells (not treated with I-CBP112) was assumed to be 1.

2.6. Resazurin Toxicity Assay

After incubation with I-CBP112 and drugs on Nunc® MicroWell™ 384-well optical bottom plates, cells were incubated with resazurin solution (5 μ M) in the growth medium at 37 °C for 4 h. The fluorescence that corresponded to the metabolic activity of living cells was measured with a fluorescence microplate reader (BioTek Synergy HTX, Biokom, Poland) at 530ex/590em nm. The fluorescence value for control cells was assumed to be 100%. The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated from the correlation binomial equation that describes the interdependence between log₂ of the drug concentration and the cell viability.

2.7. ApoTox-Glo™ Triplex Assay

Cells were seeded and then incubated with I-CBP112 and drugs on Nunc® MicroWell™ 384-well optical bottom plates. The live-cell and dead-cell protease, as well as caspase 3/7 activities, were measured with the ApoTox-Glo™ triplex assay from Promega according to the manufacturer's instructions as described by Ling [11] with a fluorescence microplate reader (BioTek Synergy HTX, Biokom, Poland). The ratio between the chemiluminescence of caspase3/7 to fluorescent viable cells was assumed to be 1 for the control (I-CBP112- and drug-untreated) cells. Similarly, dead-cell fluorescence, which corresponds to extracellular protease activity, was normalized to the fluorescence of viable cells, which corresponds to cytoplasmic protease activity.

2.8. Chromatin Immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitation was conducted according to a previously described protocol [12]. Fragments spanning EP300 binding sites, which were detected using TFbind, at the promoters of ABCC1 and ABCC10 were amplified using KAPA SYBR® FAST Universal 2× and the following primers: ABCC1 prom, 5'-ACTCAGCTTGGAGTCAGC-3' and 5'-CCAGGTGCAGAGAGGTTGA-3'; ABCC10 prom, 5'-CTTGTCCAAGGTCATGCAG-3', and 5'-GCCCCACGGACAAATAATG-3'. A 10% input (sheered chromatin) was used as the internal control.

2.9. RNA-Seq Analysis in Galaxy Version 19.05.dev

The following data from MDA-MB-231 cells were used for the RNA-Seq analysis: siCTRL, GSM2736169 (SRR5919378), and GSM2736170 (SRR5919379); siBRDa, GSM2736175 (SRR5919384), and GSM2736176 (SRR5919385); siBRDb, GSM2736177 (SRR5919386), and GSM2736178 (SRR5919387); DMSO, GSM2736179 (SRR5919388) and GSM2736180 (SRR5919389); and JQ1, GSM2736181 (SRR5919390), and GSM2736182 (SRR5919391) [13].

The data in FASTQ format were unified to Sanger formatting with FASTQ Groomer and then mapped to Human Genome version 19 using TopHat [14,15]. Transcripts were assembled with Cufflinks (using UCSC Known Gene as a reference annotation) and merged using Cuffmerge [16]. Differential gene expression was determined with CuffDiff using UCSC on Human:gtexGene (hg19_gtexGene) as a template. The numbers of cDNA frag-

ments for the chosen genes are reported as fragments per kilobase of transcript per million mapped reads (FPKM).

2.10. Statistical Analysis

The data in Table S1 are reported as the mean \pm standard deviation of the mean (SEM). The Student's *t*-test was used to determine statistically significant differences between two means (marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, and *** when $p < 0.001$), whereas one-way or two-way analysis of variance (ANOVA1 or ANOVA2, respectively) was conducted in GraphPad Prism 5 to compare means across several groups. ANOVA1 was followed by the Tukey post hoc test, and ANOVA2, by Bonferroni tests. Statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$, and *** when $p < 0.001$.

3. Results

3.1. I-CBP112 Augmented the Toxicity of Anticancer Drugs

First, to test the possible influence of I-CBP112 on the breast cancer cells' response to drugs, we pretreated MDA-MB-231 cells with 10 μ M bromodomain inhibitor for 48 h and tested the toxicity of selected anticancer chemotherapeutics across wide ranges of concentrations using the resazurin assay. As shown in Figure 1A and Table S1, doxorubicin and daunorubicin showed the highest and similar (IC₅₀—0.178 and 0.212, respectively) cytotoxicity in the culture of breast cancer cells. Antimicrotubule agent paclitaxel was approximately 100 \times less effective than the alkylating agent cisplatin 600 \times when compared to anthracyclines. Glycopeptide antibiotic (bleomycin) and topoisomerase 2 inhibitor (etoposide) and similarly reduced the number of living MDA-MB-231 cells to 50% at the concentration of 32.5 and 37.4 μ M, respectively. Among all the considered drugs, methotrexate turned out as the least cytotoxic with IC₅₀ ~119 μ M.

I-CBP112 considerably decreased the IC₅₀ of all of the studied drugs from 10 (methotrexate and etoposide) to over 600-fold (anthracyclines). The concentration of bleomycin, which was required to reduce by half the number of metabolically active breast cancer cells in the presence of I-CBP112, decreased ~40-fold, concentration of cisplatin declined ~85-fold, whereas paclitaxel ~222-fold. I-CBP112 alone reduced the number of viable cells in the culture to approximately 60%. This effect seemed to be caused by the disturbance of cell cycle progression, since the analysis of mitotic division markers (Figures 1B and S1) indicated reduced levels of PCNA and CDK4 but not cyclin E. This conclusion is further supported by the data in (Figures 1C and S3A) and Table S1, showing that I-CBP112 alone did not trigger the activation of caspase 3/7 activity, neither increased the activity of dead-cell protease in the cell culture media.

All of the studied drugs caused a relatively strong increase in caspase 3/7 activity at the highest concentrations (Figure 1C, Table S1) and only slight, but statistically significant, enhancement in extracellular protease activity (Figure S3A, Table S1; ANOVA2—drug concentration affected variance of the group means). CBP/EP300 inhibitor intensified caspase 3/7 activity mostly when combined with the highest tested doses of all the anticancer drugs (Figure 1C), but increased cell membrane permeability only when added prior to 0.2 μ M daunorubicin. Notably, when mixed with etoposide, methotrexate, and a low concentration of cisplatin, I-CBP112 decreased the ratio between dead-cell and live-cell fluorescence.

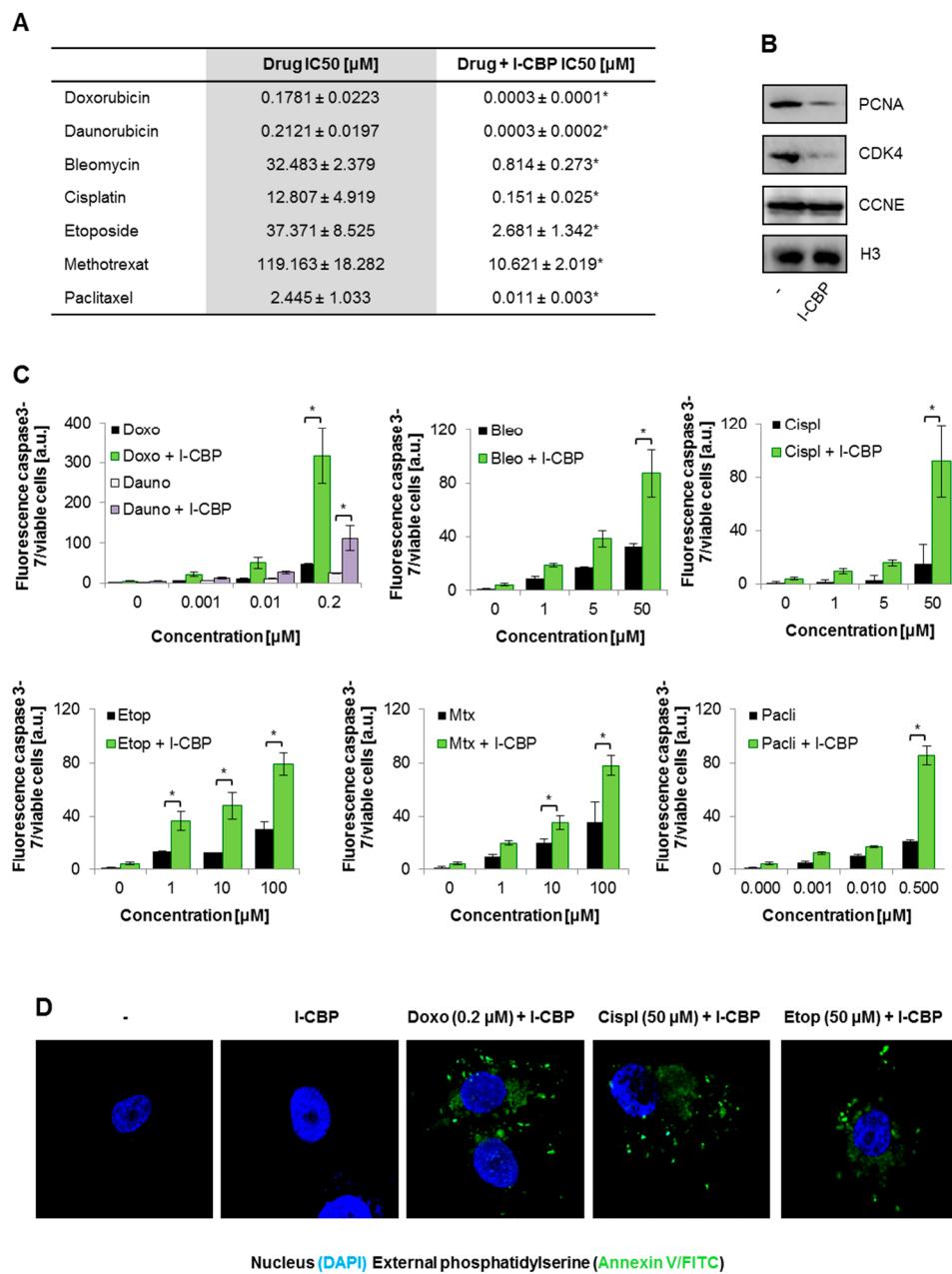


Figure 1. I-CBP inhibited proliferation and sensitized MDA-MB-231 breast cancer cells to anticancer drugs. (A) The half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀s) for the seven studied drugs were calculated from the results of the resazurin-based viability assay. I-CBP112 (10 μM) was added to cells for 72 h prior to treatment with chemotherapeutics, which were added for 48 h. The IC₅₀ was determined using the binomial equation. (B) The effect of 72 h cell incubation with I-CBP112 on proliferation was studied by visualizing the protein levels of PCNA, CDK4, and CCNE in the compound-treated and untreated cells by Western blotting. H3 was used as the loading control. (C) The ratio between caspase-3/7 cleaved substrate and live-cell protease activity was quantified to estimate the modulatory potential of I-CBP112 (10 μM; 72 h) on drug-induced apoptosis. Features of apoptosis, necrosis, and living cells were monitored 24 h after their treatment with drugs. (D) Externalization of phosphatidylserine, which marks apoptotic cells, was monitored by confocal microscopy after cell staining with FITC-conjugated annexinV (green). DNA was stained with DAPI (blue). The scheme of cell treatment was the same as in (C). All data in bars are reported as mean ± SEM. (A) The difference between two means was tested with Student's *t*-test, and statistically significant differences are marked with * when *p* < 0.05. (C) The impact of drug-induced apoptosis was tested with two-way ANOVA and the Bonferroni test. Statistically significant effects of I-CBP112 are marked with * when *p* < 0.05.

Cells treated with the combination of I-CBP112 and drugs were also stained with annexinV-FITC (Figures 1D and S2). The addition of doxorubicin (0.2 μ M), cisplatin (50 μ M), and etoposide (50 μ M) to I-CBP112-pretreated cells caused visible externalization of phosphatidylserine without visible changes in the nucleus structure (a lack of chromatin condensation or fragmentation). Importantly, the bromodomain inhibitor alone did not induce the exposure of phosphatidylserine on the outer plasma membrane, providing further evidence for a lack of direct I-CBP112 toxicity for MDA-MB-231 cancer cells.

This all may suggest that the considered epigenetic inhibitor primes MDA-MB-231 cells for apoptotic cell death in response to anticancer drugs. The selected time point (48 h after drug administration in I-CBP112) for the cell death readout captures cells in the early apoptosis.

3.2. CBP/EP300 Inhibitor Enhanced Drug Accumulation and Phenocopied the Effect of Pan-ABC Inhibitor on Drug Toxicity

As I-CBP112 increased anticancer drugs' toxicity and might have controlled the transcription of some multidrug-resistance-relevant genes that belong to the family of ABC transporters, we tested if the bromodomain inhibitor affected the intracellular levels of some drugs. We used the autofluorescence of two anthracyclines, which also showed the most striking decreases in IC₅₀ when combined with I-CBP112, and methotrexate for their visualization by confocal microscopy. As shown in Figures 2A and S2, cell incubation with I-CBP112 for 48 h substantially increased the distribution of drugs in the nuclei (doxorubicin) and cytoplasm (daunorubicin and methotrexate). The quantification of the drug levels inside cells confirmed higher levels of chemotherapeutics in the cells pretreated with I-CBP112 (Figure 2B, Table S1). Importantly, the CBP/EP300 inhibitor did not act synergistically with the pan-ABC inhibitor probenecid, whereas the individual impact of each of the two compounds on the drug accumulation was comparable. The Bonferroni post hoc test indicates a statistically significant effect of I-CBP112 on the drug accumulation only in iABC-untreated cells.

Since I-CBP112 and iABC allowed for an increased drug level inside the cells but did not strengthen the action of each other, we examined if similar interdependence could be observed in the degree of cell sensitization to anticancer drugs. Based on the resazurin toxicity assay, we estimated the IC₅₀s for particular drugs in cells pretreated with iABC alone and in combination with I-CBP112, and compared the calculated values for the control and I-CBP112-pretreated cells. As shown in Figure 2C and Table S1, probenecid augmented the drug toxicity similarly to the CBP/EP300 inhibitor. Statistical analysis with two-way ANOVA and the Bonferroni test again indicated that the effect of I-CBP112 on cell viability was only observed in the absence of iABC. These results suggest that both compounds act in the same regulatory circuit and, in this particular case, modulate cell vulnerability to chemotherapeutics by inhibiting drug efflux.

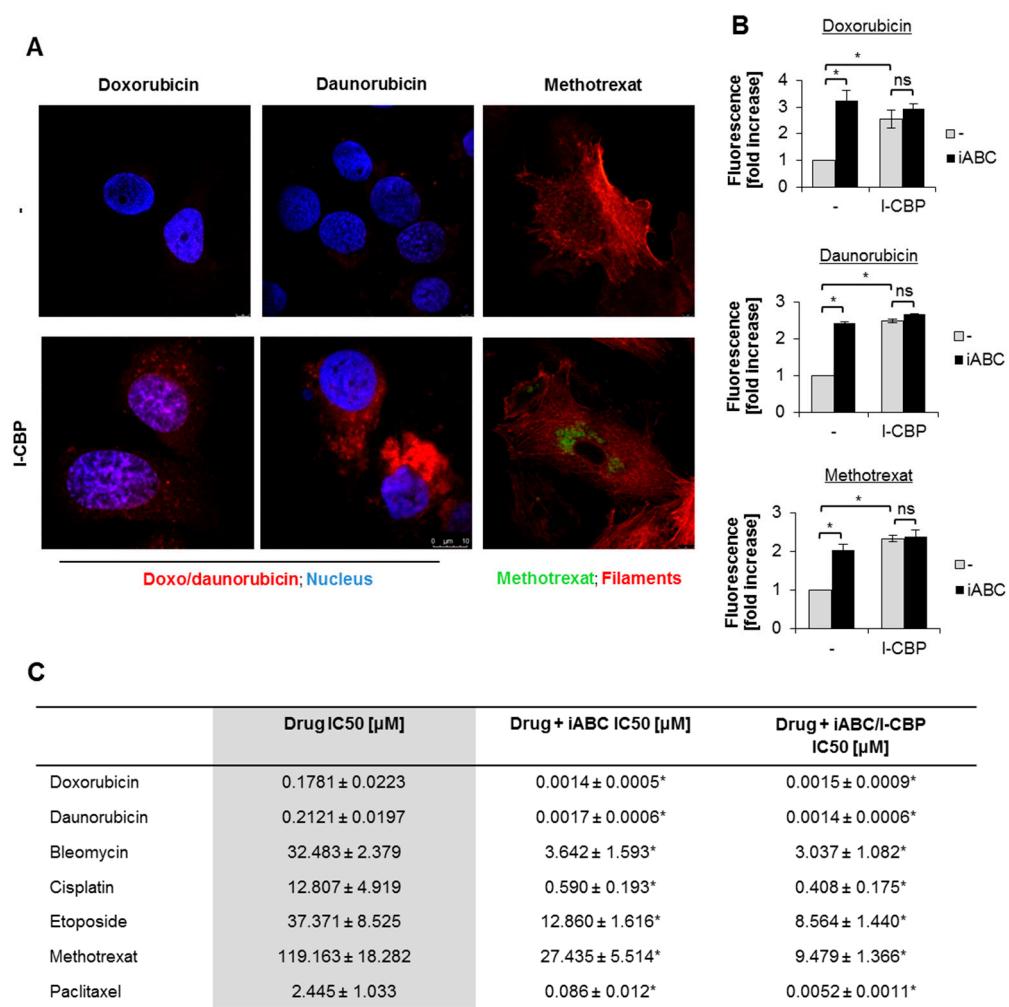


Figure 2. I-CBP increased the accumulation of some anticancer drugs and phenocopied the effect of ABC inhibitor in MDA-MB-231 breast cancer cells. (A) A confocal microscope was used to track doxorubicin, daunorubicin, and methotrexate autofluorescence in MDA-MB-231. The nuclei in anthracycline (red)-treated cells were additionally stained with DAPI (blue), whereas actin filaments were stained with phalloidin-TexasRed (red) conjugate in cells incubated with methotrexate (green). To cells, we added anthracyclines (0.5 μ M) and methotrexate (5 μ M) for 24 h. (B) The autofluorescence of cells incubated with the drugs for 4 h was measured using a fluorescence reader. iABC (probenecid; 200 μ M) was added 2 h prior to cell treatment with anticancer drugs. (C) IC50 for anticancer drug toxicity was estimated using the resazurin viability assay. iABC (probenecid; 200 μ M) was added 2 h, whereas I-CBP112 (10 μ M) was added 72 h, prior to cell treatment with anticancer drugs. Bars in the figures represent the mean \pm standard error of the mean (SEM). (B) Variability among groups was tested with two-way ANOVA and the Bonferroni test. Statistically significant effects of I-CBP112 are marked with * when $p < 0.05$. (C) Two-way ANOVA and the Bonferroni test were used to test variance among the IC50 values of control, I-CBP112-, iABC-, and iABC/I-CBP112-pretreated cells. The effect of I-CBP112 is marked with * when $p < 0.05$.

3.3. Expression of ABC Transporters Is Downregulated by I-CBP112 in MDA-MB-231

Knowing that I-CBP112 allowed for a higher drug concentration in the breast cancer cell line and phenocopied iABC in terms of drug accumulation and cell sensitization to anticancer therapeutics, and that I-CBP112 altered nucleosome acetylation, we verified if the CBP/EP300 inhibitor affected the transcription and protein levels of ABC proteins, which, according to the literature, contribute to multidrug resistance. From the list of MDR1-7, we chose those that were the most abundant in MDA-MB-231. As shown in

Figure 3A, cell incubation with I-CBP112 for 72 h led to considerable repression of ABCC1, ABCC3, ABCC4, ABCC5, and ABCC10.

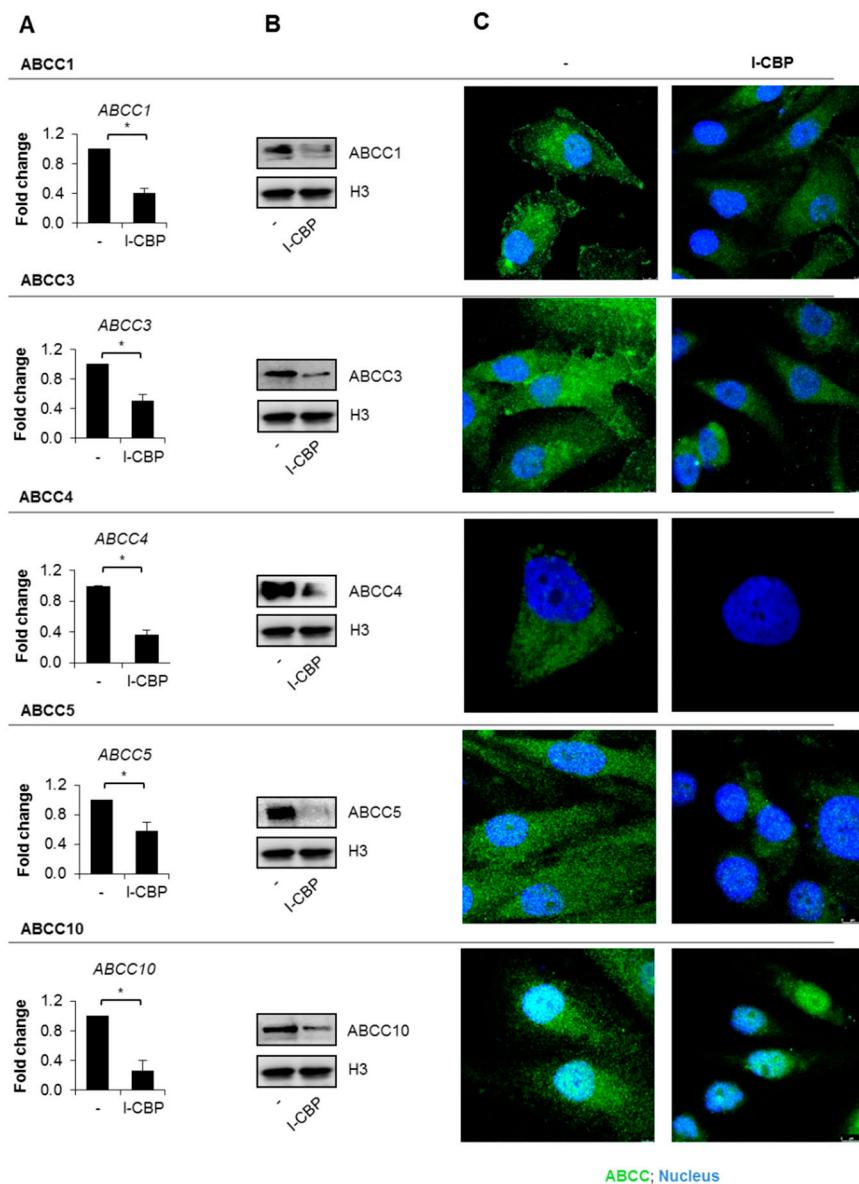


Figure 3. I-CBP 112 decreased the expression of ABCC1, ABCC3, ABCC4, ABCC5, and ABCC10 in the MDA-MB-231 cell line. **(A–C)** Cells were incubated with 10 μ M I-CBP112 for 72 h. **(A)** The mRNA levels of selected ABC transporters compared between the control and I-CBP112-treated cells by real-time PCR. ABC gene expression was normalized to the mRNA levels of ACTB and GAPDH. **(B)** The same transporters were visualized in cell lysates by Western blotting, and H3 was used as a loading control. **(C)** ABC protein level and localization were compared through confocal microscopy using AlexaFluor488-conjugated secondary antibody (green). DNA was stained with DAPI (blue). **(A)** Bars represent mean \pm standard error of the mean (SEM). The differences between 2 means were tested with Student's *t*-test and are marked with * when $p < 0.05$.

The decrease in mRNA levels was followed by a reduction in ABCC1/3/4/5/10 proteins (Figure 2B,C, Table S1). ABCC3 and ABCC4 were mostly observed in the cytoplasm, and ABCC10, in the nucleoplasm, whereas ABCC1 and ABCC5 were equally distributed across the cell (Figures 3C and S2). I-CBP112 did not considerably affect the cellular localization of ABC proteins but caused a visible decrease in the green fluorescence that

corresponded to the transporter protein level. The quantification of the green fluorescence intensity in the control and I-CBP112-treated cells is provided in Figure S3B and Table S1.

3.4. The Drug Resistance was also Decreased by I-CBP112 in Other Cell Lines

To test the cancer-cell-type specificity of I-CBP112's effects on the toxicity of drugs and their accumulation inside cells, we repeated the evaluation of certain drug-resistance parameters in two other cell lines: the non-small cell lung epithelial cancer cell line A549 and hepatocyte carcinoma line HepG2. These two cell lines differ in their profiles of MDR and glycoprotein-P transcription according to The Human Protein Atlas. The two cancer cell lines substantially differed from MDA-MB-231 and from each other in the vulnerability to anticancer drugs (Figure 4A, Table S1). Invariably, anthracyclines emerged most toxic among the considered therapeutics ($IC_{50} < 0.28 \mu M$) in A549 and HepG2 cells. Doxorubicin, daunorubicin, etoposide, and bleomycin showed similar cytotoxicity in the two cell lines, but their response to methotrexate, paclitaxel and, particularly, to cisplatin varied.

The preincubation of both cell lines with I-CBP112 for 48 h considerably affected IC_{50} values for all the tested therapeutics from 8.6-fold to 78.2-fold in the culture of A549, but only from 2.3-fold to 23.1-fold in HepG2. CBP/EP300 inhibitor potentiated most the action of cisplatin (78.2-fold decline in IC_{50}), then doxorubicin (62.7-fold), daunorubicin (53.2-fold), etoposide (28.9-fold), bleomycin (14-fold), paclitaxel (11.3-fold) and methotrexate in lung cancer cells. In hepatocytes the impact of I-CBP112 on the drug toxicity declined as follows: etoposide (23.1-fold decrease in the IC_{50} value), daunorubicin (21.4-fold), doxorubicin (11-fold), methotrexate (8.4-fold), cisplatin (6.7-fold), bleomycin (6.1-fold), and paclitaxel (2.3-fold).

In these cancer cell lines, higher concentrations of doxorubicin and methotrexate were observed in cells preincubated with I-CBP112 (Figures 4B,C and S2). In A549, the drugs were mostly localized in the cytoplasm, whereas in HepG2, doxorubicin, and methotrexate they were mostly enriched in the nuclei. A549 cells responded to the CBP/EP300 inhibitor, with the repression of ABCC1, ABCC3, ABCC5, ABCC10, and ABCG2, but not ABCC2, whereas all the considered ABCC and ABCG2 transporters were found to be decreased in HepG2 (Figure 4D,E, Table S1). The latter cell line was also characterized by a decline in ABCB1 transcription. The I-CBP112-induced transcriptional inhibition of ABC transporters was followed by a visible decline in their protein levels (exemplary confocal images of selected transporters are shown in Figures 4F,G and S2). In summary, I-CBP112 considerably inhibits the expression of genes functionally linked to drug efflux regardless of the cancer cell origin, and decreases the IC_{50} s of all the considered anticancer therapeutics, which vary in their mechanisms of cancer killing.

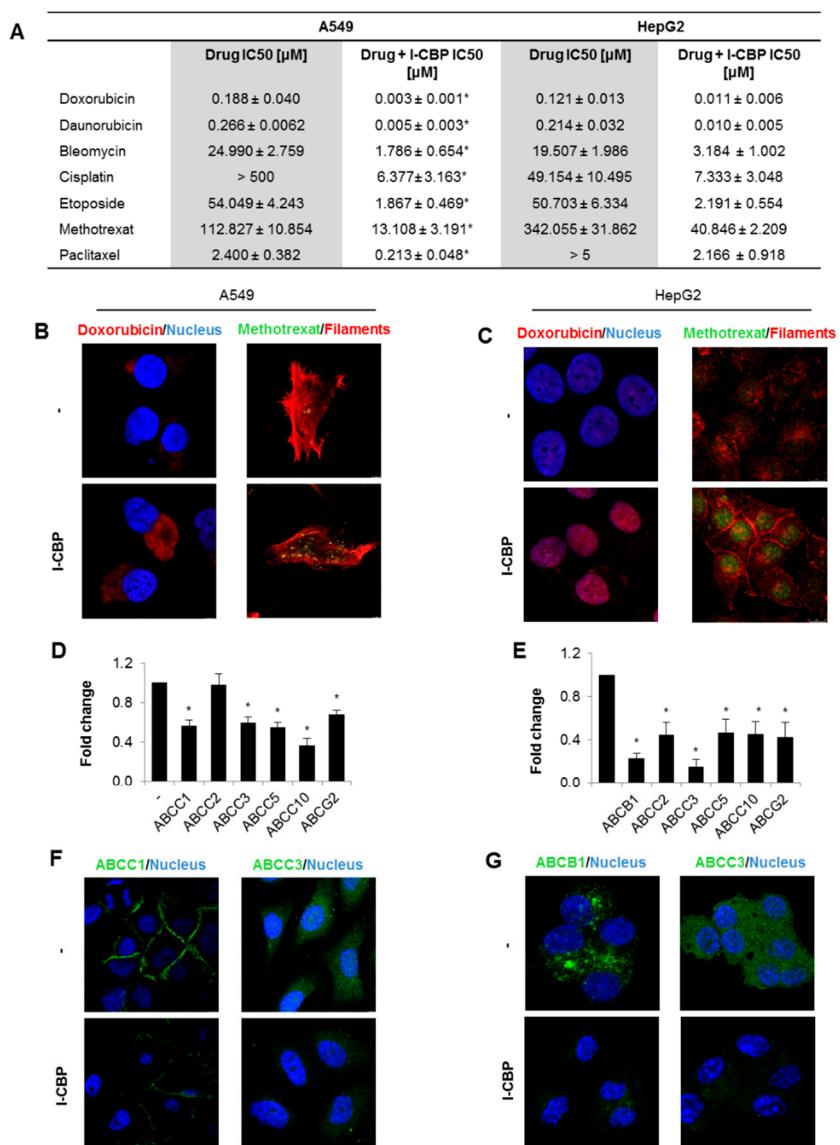


Figure 4. I-CBP112 sensitized other cancer cell types to chemotherapeutics, increased drug accumulation in cells, and reduced expression of ABC transporters. (A) IC50s were evaluated in another two cell lines—A549 lung cells and HepG2 hepatocytes—with the resazurin toxicity assay. Cells were incubated with 10 μ M I-CBP112 for 72 h prior to the administration of drugs for another 48 h. IC50 was determined from the binomial equation (Supplementary Statistics: resazurin A549 and resazurin HepG2). The autofluorescence of doxorubicin and methotrexate was imaged in control and I-CBP112 (10 μ M; 72 h)-pretreated A549 (B) and HepG2 (C) cells using a confocal microscope. Doxorubicin-treated cells (0.5 μ M; 24 h) were additionally stained with DAPI (blue, nucleus), whereas methotrexate-treated (5 μ M; 24 h) cells were additionally stained with phalloidin-Texas Red (red, actin filaments). (D,E) The impact of I-CBP112 (10 μ M; 72 h) on ABC gene expression was measured by real-time PCR in A549 (D) and HepG2 (E) cell lines. The mRNA levels of particular genes were normalized to ACTB and GAPDH and assumed to be 1 for control cells. (F,G) Example of confocal images of ABC proteins that are highly abundant in A549 (F) and HepG2 (G) cells. I-CBP112 (10 μ M) was added for 72 h. Transporters were stained in green (secondary anti-rabbit AlexaFluor488-conjugated antibody), and nuclei, in blue (DAPI). (A,D,E) bars represent the mean ± standard error of the mean (SEM). (A) IC50 values for the control and I-CBP112-treated cells were compared using Student's *t*-test, and statistically significant differences between means are marked with * when $p < 0.05$. The same analysis was used to compare relative mRNA levels in (D,E).

3.5. CBP/EP300 Inhibitor Induced Recruitment of LSD1 to the Promoters of ABCC1 and ABCC10 and Erased Trimethylation of H3K4 in MDA-MB-231

In search for the molecular mechanism responsible for the observed repression of multidrug-resistance proteins and glycoprotein-P, we first considered the possible impact of I-CBP112 bromodomain inhibitor on the function of bromodomain and extraterminal domain (BET; BRD2, BRD3, BRD4, and BRDT) family of bromodomain proteins in transcription control of the key multidrug resistance genes. BET proteins, as other bromodomain-containing proteins, interact with acetylated histones and transcription factors, hence are involved in transcriptional regulation. Therefore, we assumed that BET proteins may act as activators of some ABCs' transcription and I-CBP112 may interfere with their functional interaction with the gene promoters. We used publicly available RNA-Seq data to test the impact of the known BET inhibitor JQ1 and transient silencing of bromodomains (2-3-4) on the mRNA levels of ABC transporters in MDA-MB-231. As shown in Figure 5A, JQ1 significantly enhanced the transcription of ABCC10 but only slightly altered the mRNAs of other genes. A similar profile of changes was observed in breast cancer cells transfected with siBRD, where only the highly transcribed ABCC10 responded to BRD (2-3-4) deficiency, with further transcription enhancement (Figure 5B). BRCA1 is shown as an example of gene inhibited upon deficiency of some BET members (Figure 5B) and their activity (Figure 5A). Since the inhibition and silencing of some BET proteins resulted in the upregulation of one ABC gene, the observed repression of most of the considered ABC transporters by I-CBP112 in three different cell lines seemed to be rather mediated by a BET-independent mechanism.

As I-CBP112 was documented as capable of inhibiting CBP/EP300 interaction with chromatin and of simultaneously increasing nucleosome acetylation, we compared the extent of H3K9/14 acetylation between the control and I-CBP112-treated MDA-MB-231 cells. In addition, we also examined some other histone modifications that contribute to transcriptional regulation. The Western blot images in Figures 5C and S1. indicate the strong enrichment in H3K9/14ac that was simultaneously associated with a decline in histone methylation status. If the losses of H3K9me3 and H3K27me3 occurred along with increased H3K9/14 acetylation, which suggested that I-CBP112 favored a transcription-permissive epigenetic status, the decline in H3K4me3 was generally linked to the gene's repression. In the next step, we tested the acetylation and H3K4me3 statuses at the promoters of the highly transcribed ABCC10 and the key MDR gene—ABCC1. The alteration of the considered transcription-promoting epigenetic markers at the gene promoters phenocopied the I-CBP112-induced modifications observed with Western blotting; increased histone acetylation was followed by a decline in H3K4me3 (Figures 5D,E and S3C, Table S1). Despite enhanced nucleosome acetylation, some extrusion of EP300 and BRG1/SMARCA4 from the gene promoter was also noted, which may indicate the impact of I-CBP112 on the interaction between bromodomain-containing EP300 and DNA (Figure 5F, Table S1). The decrease in the trimethylation of H3K4 at the promoters of ABCC10 and ABCC1 prompted us to check for the occurrence of lysine-specific demethylase 1A (LSD1), which demethylates mono- and di-methylated lysines, specifically histone 3, and lysines 4 and 9 (Figures 3B and 5G, Table S1). The incubation of breast cancer cells with I-CBP112 triggered a statistically significant enrichment in LSD1 at the two gene promoters.

To verify the possible contribution of LSD1 and/or KDM5B, which removes methyl groups from trimethylated, demethylated, and monomethylated H3K4, we treated MDA-MB-231 cells with the combination of I-CBP112 and iLSD1 (0.1 μ M SP2901) or I-CBP112 and iKDM5B (5 μ M PBIT). As shown in Figure 5H,I, and Table S1, iLSD1 prevented the I-CBP112-induced repression of ABCC1 and ABCC10, whereas iKDM5B did not interfere with the studied genes' responses to the CBP/EP300 inhibitor. LSD1 silencing with siRNA resulted in the massive death of MDA-MB-231 (data not shown); therefore, further validation of the possible impact of I-CBP112-LSD1 crosstalk on gene transcription in an LSD1-deficient background was impossible. Regardless, the observed recruitment of demethylase to the gene promoters and the antagonizing effect of iLSD1 with I-CBP112

on the gene transcription suggest that I-CBP112 may repress ABC genes' transcription by triggering the enrichment of LSD1 at their promoters.

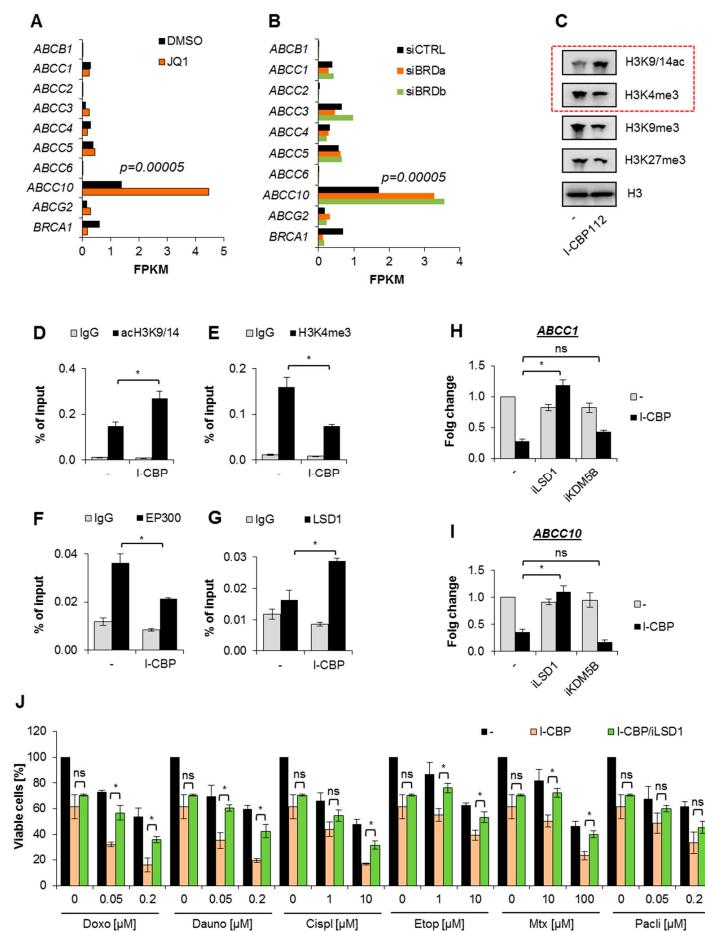


Figure 5. I-CBP112 reduced trimethylation of H3K4 and induced LSD1-mediated gene repression in MDA-MB-231 breast cancer cells. **(A,B)** The impact of BRD silencing and JQ1 (bromodomain inhibitor) on the mRNA levels of selected ABC transporters was determined by quantifying differential gene expression (using TopHat for mapping, CuffLinks for transcript assembly, and CuffDiff for quantitative transcript comparison) based on publicly available data sets. Gene expression is presented as fragments per kilobase of transcript per million mapped reads (FPKM). **(C)** The effect of I-CBP112 (10 μ M; 72 h) on some histone modifications was evaluated in cell lysates by Western blotting. Transcription-promoting markers are highlighted using red dashed rectangles. **(D–G)** Alterations in two histone modifications and in the occurrence of EP300 and LSD1 caused by I-CBP112 (10 μ M; 72 h) at the promoter of ABCC10 were assayed by ChIP-qPCR. **(H,I)** The impact of iLSD1 (SP2509; 0.1 μ M) and iKDM5B (PBIT; 2.5 μ M) on I-CBP112-induced ABCC1 and ABCC10 gene repression was estimated using real-time PCR. iLSD1 and iKDM5B were added alone or in combination with I-CBP112 (10 μ M) for 72 h. **(J)** The resazurin viability assay was used to test the effect of iLSD1 on the I-CBP112-induced increase in cell vulnerability to anticancer drugs. iLSD1 (0.1 μ M) was added to cells in combination with I-CBP112 (10 μ M) for 72 h, and the cells were then treated with two selected doses of therapeutics for another 48 h. Bars in the graph show the relevant cell viability normalized to the untreated control, which was assumed to be 100%. Bars in the figures represent the mean \pm standard error of the mean (SEM). **(D–G)** Means were compared using Student's *t*-test, and statistically significant differences are marked with * when $p < 0.05$. **(H,I)** The influence of particular factors on gene transcription was analyzed by two-way ANOVA and the Bonferroni test, and statistically significant differences in the variance are marked with * when $p < 0.05$. **(J)** Data were tested with one-way ANOVA and Tukey's post hoc test. The significant impact of iLSD1 on I-CBP112-induced increase in drug toxicity is marked with * when $p < 0.05$.

As the CBP/EP300 inhibitor reduced the viability of drug-treated cells and this effect might have occurred due to the repression of multidrug-resistance proteins, we expected that iLSD1 might, at least partially, counteract I-CBP112-enhanced drug toxicity. To verify this hypothesis, we compared the viability of MDA-MB-231 cells exposed to two concentrations of anticancer drugs, which were pretreated with a combination of I-CBP112 (10 μ M) and iLSD1 (0.1 μ M), to that of those treated with I-CBP112 (10 μ M) alone. iLSD1 considerably suppressed I-CBP112's potential to enhance the toxicity of all the studied compounds, except for paclitaxel, at the highest tested concentrations and rescued the I-CBP112-induced decline in cell viability (Figure 5J, Table S1). These findings all suggest that I-CBP112 may considerably weaken cancer cells' resistance to chemotherapeutics by repressing the transcription of key ABC transporters in an LSD1-dependent manner.

4. Discussion

Inhibitors of bromodomain extra-terminal (BET) and non-BET families appear to be promising anticancer drugs due to their cellular function and deregulation of their target proteins in different tumor types. Although several BRD inhibitors have entered clinical trials over the last decade, they have experienced significant obstacles such as a lack of partial or complete response and high efficacy in only a few specific tumor types (hematological malignancies and rare diseases such as NUT) [17]. These features have precluded their regulatory approval. For triple-negative breast cancer, the study registered under NCT02698176 aimed to target advanced solid tumors with birabresib (MK-8628) in monotherapy, but one recruited participant with TNBC did not finish the treatment because of progressive disease, and the entire trial was terminated due to the limited efficacy in other tumor types (not due to safety reasons) [18]. Therefore, no conclusion can be drawn regarding the anticancer activity of bromodomain inhibitors in patients diagnosed with TNBC. In the *in vitro* and *in vivo* MDA-MB-231 murine xenograft models, the above-mentioned birabresib showed antiproliferative activity, repressed the c-MYC protein, and synergized with the mTOR inhibitor everolimus [19]. We observed a similar effect of I-CBP112, which targets the CBP/EP300 bromodomain, on the mitotic division in a culture of MDA-MB-231, whereas a substantial reduction in c-MYC, which is considered a TNBC driver, was observed in prostate cancer [9]. Nothing is known about the *in vivo* activity of I-CBP112. Since the clinical trial with birabresib (MK-8628) did not report relatively high toxicity, I-CBP112 may be similarly or better tolerated, particularly when the toxicity profiles of BET inhibitors, which include thrombocytopenia, fatigue, and diarrhea, emerge as class effects [17].

I-CBP112, similar to birabresib and other bromodomain inhibitors, synergistically reduces the numbers of viable cells in culture when added to cultures with other anticancer drugs. This approach, administering a bromodomain inhibitor in combination with various oncology therapeutics, was also tested in clinical trials. In an active, non-recruiting phase 2 study on patients with TNBC without germline mutations of BRCA1 or BRCA2, ZEN003694 was mixed with the PARP inhibitor talazoparib, and the primary completion of the study is estimated to occur in September 2021 (NCT03901469). The safety and tolerability study of the treatment scheme comprising INCB057643 and gemcitabine, paclitaxel, rucaparib, abiraterone, ruxolitinib, or azacitidine in subjects with advanced malignancies, including breast cancers, was terminated due to safety issues (NCT02711137). When considering the joint treatment of tumors with bromodomain inhibitors and other anticancer drugs, the possible impact of the first group of compounds must be taken into account. As shown in Figure 4A,B, the deficiency in bromodomain activity may lead to the overexpression of ABC proteins, some of which are responsible for the active removal of anticancer therapeutics. In the studied MDA-MB-231 breast cancer cells, the transient silencing of BRD2/3/4 and bromodomain inhibition caused a significant increase in the mRNA of ABCC10, which is the most abundant MDR protein in this cell line. Importantly, JQ1 binds to all the bromodomains of the BET family but not to bromodomains outside the BET family. This suggests that BET family members act as anti-MDR factors, at least in the

studied triple-negative breast cancer cell line. The possible issues with the transcriptional upregulation of ABC transporters may be precluded by replacing BET inhibitors with I-CBP112. The latter compound phenocopies the anticancer activity of BET inhibitors in *in vitro* models and considerably augments the accumulation of anticancer drugs by repressing genes responsible for multidrug resistance. I-CBP112 seems to be specific for CBP/EP300, because no activity of this compound was observed for BRG1/SMARCA4 occurrence on the promoter of ABCC1 (Supplementary Table S1). Our results suggest that I-CBP112 may increase the toxicity of these therapeutics, which are actively removed from cells by ABC transporters. The anti-MDR activity of I-CBP112 seems to be cancer-type independent because the expression of ABC genes was repressed in the breast, lung, and hepatic cell lines. Moreover, this bromodomain inhibitor was potent in reducing the mRNA levels of most of the examined transporters. The aspects that must be further evaluated concern I-CBP112's toxicity and the optimal treatment scheme, which includes the time between I-CBP112 and anticancer drug administration. Since the CBP/EP300 inhibitor represses gene transcription, the expected impact on drug accumulation is delayed. The pretreatment of our three cell lines grown in a monolayer with I-CBP112 for 72 h was sufficient to substantially reduce the ABC protein levels in the cell membranes, but the variability in the exposure of the tumor cells to the drugs may alter their expected responses to I-CBP112.

The described approach to decreasing multidrug resistance and ABC transporter expression by targeting chromatin-interacting enzyme(s) is new and paves the way for the repression of drug-efflux-associated membrane proteins at the genomic level. Previous and current attempts to overcome native and acquired drug resistance have focused on the development of inhibitors of ABC proteins, mainly P-glycoprotein (ABCB1), BCRP (ABCG2), and MRP1 (ABCC1); some of these compounds show weak specificity and show the potential to inhibit more than one ABC transporter [20,21]. Some papers also describe the possible involvement of flavonoid and terpenoid derivatives as ABC transporter modulators [22]. However, none of the proposed ABC inhibitors were approved for anticancer therapy. A total of 98 small molecules that possess P-glycoprotein-inhibiting properties were approved by the FDA, with indications for non-cancer diseases [23]. Novel strategies to limit or reverse multidrug resistance include miRNA, DNA methyltransferase inhibitors (DNMTis), hypomethylating agents (HMAs), and histone deacetylase inhibitors (HDACis) [24], but HDAC inhibitors elicit divergent responses in drug-sensitive and resistant cancer cells [25]. HDAC inhibitors are usually associated with the activation of gene transcription because they prevent histone deacetylation, but numerous other HDAC non-histone HDAC targets have different impacts on gene transcription depending on their acetylation statuses. As for histones, their hyperacetylation induced by I-CBP112 was associated with decreased H3K4me3 and the recruitment of LSD1 at the promoters of ABCC1 and ABCC10 (Figure 5D,E,G and Supplementary Table S1). Since the mechanism responsible for LSD1 enrichment at the hyperacetylated promoters and the superior role of H3K4me3 declines with increased acetylation in transcription, the efficacy remains unknown, so further experiments are needed to test the possible impact of HDAC inhibitors on the transcription of genes functionally involved in multidrug resistance. There have been considerable advances in the study of cancer cells that acquire resistance as a consequence of the repeated administration of anticancer drugs because such cells are frequently characterized by the overexpression of ABC proteins, which are crucial for drug efflux. Further questions to be answered include the impact of I-CBP112 on ABC transcription and promoter acetylation, and whether I-CBP112 causes the hyperacetylation of the promoters of overexpressed genes and LSD1 recruitment. Such a model may help in finding links or discrepancies between simultaneous adverse shifts in transcription-promoting histone markers and in verifying the role of LSD1.

The recruitment of LSD1 to the promoters of highly transcribed genes such as ABCC10 is unexpected, particularly when the acetylation of the ABCC10 promoter is further enhanced by I-CBP112. LSD1 lacks a bromodomain, and the known crystal structure of the

enzyme does not indicate any protein fragment with an acetylated-histone-reader function. Conversely, LSD1 is most frequently associated with the CoREST repressor complex, which comprises HDAC1 and HDAC2; hence, LSD1 activity and the demethylation of H3K4me3 are associated with histone deacetylation. LSD1 binds DNA and anchors associated proteins or protein complexes to nucleosomal substrates via the evolutionarily conserved SWIRM domain [26,27], which closely interacts with the amine oxidase domain, forming a highly conserved cleft, and may, therefore, serve as an additional histone-tail-binding site. The SWIRM domain of human ADA2alpha was shown to colocalize with lysine-acetylated histone H3 in the cell nucleus [28]. Moreover, SWIRM-containing ADA2b is required for the efficient acetylation of histone tails by GCN5 [29]. However, nothing is known about the interaction between LSD1 and acetylated nucleosomes. A relatively recent paper describes the interdependence between the acetylation of particular amino acids in histone H3 and the deacetylase and demethylase activities of the epigenetic silencing complex CoREST [30]. The demethylase activity of methyl-Lys4 in histone H3 was strongly inhibited by H3 Lys14 acetylation, but the presence of this modification at H3 Lys18 considerably increased the K_m for LSD1-catalyzed histone demethylation. We know nothing about the selectivity of CBP/EP300 histone acetylation at particular histone residues or about its possible impact on LSD1 and CoREST's repressive activity. Another aspect that needs to be mentioned is the contribution of another demethylase in I-CBP112-induced gene repression: LSD1 can only demethylate mono- or di-methylated lysine residues on histone H3 because the trimethyl-lysine residue is not protonated [31]. This suggests that the activity of LSD1 is preceded by that of another enzyme that removes the first methyl group from trimethylated H3K4. None of the bromodomain-containing proteins are capable of the above-mentioned function [32]. However, LSD1 is as a key repressor of multidrug-resistant proteins in I-CBP112-treated MDA-MB-231 cells, since LSD1 inhibition prevents the I-CBP112-induced decline in ABCC1 and ABCC10 transcription. Since some of LSD1 inhibitors are tested in clinical trials and emerge as promising agents for anticancer approaches, the attention should be paid to their possible pro-multidrug resistance action under certain circumstances.

5. Conclusions

In summary, I-CBP112 has emerged as a promising compound for reducing the innate drug resistance in the studied cancer cells. The studied compound represses expression of ABCC1, ABCC3, ABCC4, ABCC5, and ABCC10, and increases the accumulation of some anticancer drugs. At the gene promoters of ABCC1 and ABCC10, I-CBP112 causes chromatin compaction and the removal of transcription promoting trimethylation of H3K4 by LSD1, but simultaneously intensifies nucleosome acetylation. The molecular interdependence between these two chromatin features, as well as the mechanism that allows for LSD1 recruitment to hyperacetylated promoters, remains unknown.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13184614/s1>; Figure S1 Full Western blot images; Figure S2: Full confocal images; Figure S3: Additional experimental data; Table S1: Raw experimental data and full statistical analysis.

Author Contributions: Conceptualization, A.R.; methodology, M.S., K.G., S.M. and A.R.; validation, M.S., K.G., S.M. and A.R.; formal analysis, M.S., K.G., S.M. and A.R.; investigation, M.S., K.G., S.M. and A.R.; resources, A.R.; writing—original draft preparation, A.R.; writing—review and editing, M.S., K.G., S.M. 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.

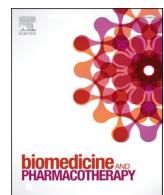
Data Availability Statement: Data is contained within the article or Supplementary Material.

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

References

1. Fujisawa, T.; Filippakopoulos, P. Functions of Bromodomain-Containing Proteins and Their Roles in Homeostasis and Cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 246–262. [CrossRef]
2. Sun, Y.; Han, J.; Wang, Z.; Li, X.; Sun, Y.; Hu, Z. Safety and Efficacy of Bromodomain and Extra-Terminal Inhibitors for the Treatment of Hematological Malignancies and Solid Tumors: A Systematic Study of Clinical Trials. *Front. Pharmacol.* **2021**, *11*, 621093. [CrossRef]
3. Zhang, F.; Ma, S. Disrupting Acetyl-Lysine Interactions: Recent Advance in the Development of BET Inhibitors. *Curr. Drug Targets* **2018**, *19*, 1148–1165. [CrossRef]
4. Bloise, E.; Ortiga-Carvalho, T.M.; Reis, F.M.; Lye, S.J.; Gibb, W.; Matthews, S.G. ATP-Binding Cassette Transporters in Reproduction: A New Frontier. *Hum. Reprod. Update* **2016**, *22*, 164–181. [CrossRef]
5. Chelamalla, R. Drug Resistance: Important Criteria for Cancer Drug Development. *Pharm. Biol. Eval.* **2017**, *4*, 127. [CrossRef]
6. Lee, J.S.; Yost, S.E.; Yuan, Y. Neoadjuvant Treatment for Triple Negative Breast Cancer: Recent Progresses and Challenges. *Cancers* **2020**, *12*, 1404. [CrossRef]
7. Gill, J.; Mishra, A.N. Effect of Neoadjuvant Chemotherapy on Disease Free Survival and over All Survival in Triple-Negative Breast Cancer Patients. *Ann. Oncol.* **2017**, *28*, v92. [CrossRef]
8. Zucconi, B.E.; Luef, B.; Xu, W.; Henry, R.A.; Nodelman, I.M.; Bowman, G.D.; Andrews, A.J.; Cole, P.A. Modulation of P300/CBP Acetylation of Nucleosomes by Bromodomain Ligand I-CBP112. *Biochemistry* **2016**, *55*, 3727–3734. [CrossRef]
9. Zucconi, B.E.; Makofske, J.L.; Meyers, D.J.; Hwang, Y.; Wu, M.; Kuroda, M.I.; Cole, P.A. Combination Targeting of the Bromodomain and Acetyltransferase Active Site of P300/CBP. *Biochemistry* **2019**, *58*, 2133–2143. [CrossRef]
10. Picaud, S.; Fedorov, O.; Thanasiopoulou, A.; Leonards, K.; Jones, K.; Meier, J.; Olzscha, H.; Monteiro, O.; Martin, S.; Philpott, M.; et al. Generation of a Selective Small Molecule Inhibitor of the CBP/P300 Bromodomain for Leukemia Therapy. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 5106–5119. [CrossRef]
11. Ling, T.; Lang, W.H.; Maier, J.; Quintana Centurion, M.; Rivas, F. Cytostatic and Cytotoxic Natural Products against Cancer Cell Models. *Molecules* **2019**, *24*, 2012. [CrossRef]
12. 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] [PubMed]
13. Zanconato, F.; Battilana, G.; Forcato, M.; Filippi, L.; Azzolin, L.; Manfrin, A.; Quaranta, E.; Di Biagio, D.; Sigismondo, G.; Guzzardo, V.; et al. Transcriptional Addiction in Cancer Cells Is Mediated by YAP/TAZ through BRD4. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 1599–1610. [CrossRef]
14. 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]
15. Blankenberg, D.; Gordon, A.; Von Kuster, G.; Coraor, N.; Taylor, J.; Nekrutenko, A.; The Galaxy Team. Manipulation of FASTQ Data with Galaxy. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 1783–1785. [CrossRef]
16. Roberts, A.; Pimentel, H.; Trapnell, C.; Pachter, L. Identification of Novel Transcripts in Annotated Genomes Using RNA-Seq. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 2325–2329. [CrossRef]
17. Mita, M.M.; Mita, A.C. Bromodomain Inhibitors a Decade Later: A Promise Unfulfilled? *Br. J. Cancer* **2020**, *123*, 1713–1714. [CrossRef]
18. A Dose Exploration Study with Birabresib (MK-8628) in Participants with Selected Advanced Solid Tumors (MK-8628-006)—Study Results—ClinicalTrials.gov. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT02698176?term=BET+inhibitor&cond=breast+cancer&draw=2&rank=2&view=results> (accessed on 24 June 2021).
19. Vázquez, R.; Riveiro, M.E.; Astorgues-Xerri, L.; Odore, E.; Rezai, K.; Erba, E.; Panini, N.; Rinaldi, A.; Kwee, I.; Beltrame, L.; et al. The Bromodomain Inhibitor OTX015 (MK-8628) Exerts Anti-Tumor Activity in Triple-Negative Breast Cancer Models as Single Agent and in Combination with Everolimus. *Oncotarget* **2017**, *8*, 7598–7613. [CrossRef]
20. Nanayakkara, A.K.; Follit, C.A.; Chen, G.; Williams, N.S.; Vogel, P.D.; Wise, J.G. Targeted Inhibitors of P-Glycoprotein Increase Chemotherapeutic-Induced Mortality of Multidrug Resistant Tumor Cells. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 967. [CrossRef]
21. Stefan, S.M.; Wiese, M. Small-Molecule Inhibitors of Multidrug Resistance-Associated Protein 1 and Related Processes: A Historic Approach and Recent Advances. *Med. Res. Rev.* **2019**, *39*, 176–264. [CrossRef]
22. Gonçalves, B.M.F.; Cardoso, D.S.P.; Ferreira, M.-J.U. Overcoming Multidrug Resistance: Flavonoid and Terpenoid Nitrogen-Containing Derivatives as ABC Transporter Modulators. *Molecules* **2020**, *25*, 3364. [CrossRef]
23. Lai, J.-I.; Tseng, Y.-J.; Chen, M.-H.; Huang, C.-Y.F.; Chang, P.M.-H. Clinical Perspective of FDA Approved Drugs with P-Glycoprotein Inhibition Activities for Potential Cancer Therapeutics. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 561936. [CrossRef]
24. Ball, B.; Zeidan, A.; Gore, S.D.; Prebet, T. Hypomethylating Agent Combination Strategies in Myelodysplastic Syndromes: Hopes and Shortcomings. *Leuk. Lymphoma* **2017**, *58*, 1022–1036. [CrossRef]
25. You, D.; Richardson, J.R.; Aleksunes, L.M. Epigenetic Regulation of Multidrug Resistance Protein 1 and Breast Cancer Resistance Protein Transporters by Histone Deacetylase Inhibition. *Drug Metab. Dispos.* **2020**, *48*, 459–480. [CrossRef]

26. Anand, R.; Marmorstein, R. Structure and Mechanism of Lysine-Specific Demethylase Enzymes. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 35425–35429. [[CrossRef](#)]
27. 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](#)]
28. Qian, C.; Zhang, Q.; Li, S.; Zeng, L.; Walsh, M.J.; Zhou, M.-M. Structure and Chromosomal DNA Binding of the SWIRM Domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 1078–1085. [[CrossRef](#)]
29. Gamper, A.M.; Kim, J.; Roeder, R.G. The STAGA Subunit ADA2b Is an Important Regulator of Human GCN5 Catalysis. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 266–280. [[CrossRef](#)]
30. Wu, M.; Hayward, D.; Kalin, J.H.; Song, Y.; Schwabe, J.W.; Cole, P.A. Lysine-14 Acetylation of Histone H3 in Chromatin Confers Resistance to the Deacetylase and Demethylase Activities of an Epigenetic Silencing Complex. *eLife* **2018**, *7*, e37231. [[CrossRef](#)]
31. 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*, 903–914e4. [[CrossRef](#)]
32. Muller, S.; Filippakopoulos, P.; Knapp, S. Bromodomains as therapeutic targets. *Expert Rev. Mol. Med.* **2011**, *13*, e29. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3177561/table/tab01/> (accessed on 24 June 2021). [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



I-CBP112 declines overexpression of ATP-binding cassette transporters and sensitized drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines to chemotherapy drugs



Magdalena Strachowska ^{a,b,*}, Karolina Gronkowska ^{a,b}, Maciej Sobczak ^{a,c}, Marika Grodzicka ^{a,b}, Sylwia Michlewska ^d, Kinga Kołacz ^{a,b,1}, Tuhin Sarkar ^{e,1}, Joanna Korszun ^{a,b,f,1}, Maksim Ionov ^{a,g,1}, Agnieszka Robaszkiewicz ^{a,**}

^a Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, Pomorska St.141/143, 90-236 Łódź, Poland

^b Bio-Med-Chem Doctoral School of the University of Łódź and Łódź Institutes of the Polish Academy of Sciences, University of Łódź, Banacha St. 12/16, 90-237 Łódź, Poland

^c Department of Internal Diseases, Diabetology and Clinical Pharmacology, Medical University of Łódź, Pomorska St. 251, 92-213 Łódź, Poland

^d Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, Banacha St. 12/16, 90-237 Łódź, Poland

^e Department of Microbiology, University of Kalyani, West Bengal 741245, India

^f Laboratory of Molecular Oncology and Innovative Therapies, Military Institute of Medicine - National Research Institute, Szaserow St. 128, 04-349 Warsaw, Poland

^g Faculty of Medicine, Collegium Medicum, Mazovian Academy in Płock, 2 Dąbrowskiego Sq, 09-402, Płock, Poland

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Keywords:

CREB-binding protein/Histone acetyltransferase p300 (CBP/EP300)
bromodomain inhibitor
Multi-drug resistance (MDR)
ATP-binding cassette transporters (ABC)
Triple-negative breast cancer
Non-small cell lung cancer

Despite extensive efforts and ongoing progress in personalized anticancer approaches, chemotherapy remains the first line or the only treatment for some tumors that may develop resistance to chemotherapeutics in time due to inter alia overexpression of ATP-binding cassette transporters. Using clinically-relevant resistant models of triple negative breast cancer (MDA-MB-231; TNBC) as well as non-small cell lung cancer (A549; NSCLC), we tested the efficacy of I-CBP112 – CBP/EP300 bromodomain inhibitor to overcome drug resistance by declining ABC gene transcription. I-CBP112 significantly reduced *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC5* and *ABCG2* in all resistant lines, as well as *ABCC10* in TNBC and *ABCC4* in paclitaxel-resistant NSCLC, thereby increasing intracellular drug accumulation and cytotoxicity in 2D and 3D cultures. This was phenocopied only by the joint effect of ABC inhibitors such as tariquidar (*ABCB1* – P-glycoprotein and *ABCG2*) and MK-571 (*ABCC*), whereas single inhibition of *ABCB1*/*ABCG2* or *ABCC* proteins did not affect drug accumulation, thereby implying the need of simultaneous deficiency in activity of majority of drug pumps for enhanced drug retention. I-CBP112 failed to directly inhibit activity of *ABCB1*, *ABCG2* and *ABCC* subfamily members at the same time. Importantly, I-CBP112 treated cancer cells polarized human macrophages into proinflammatory phenotypes. Moreover, I-CBP112 remained non-toxic to primary cell lines, nor did it enhance anticancer drug toxicity to blood-immune cells. In

List of abbreviations: ABC, ATP-binding; ADMET, Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity; AhR, aryl hydrocarbon receptor; AMES, test *Salmonella typhimurium* reverse mutation assay; BBB, blood-brain barrier; BCRP, breast cancer resistance protein; BET, Bromodomain and extraterminal domain; BJ, human foreskin fibroblasts; BRD, bromodomain; CAT, Catalase; CBP/EP300, CREB-binding protein/Histone acetyltransferase p300; CD, cluster of differentiation; CYP, Cytochrome P450 family; DMSO, Dimethyl sulfoxide; EZH2, Enhancer of zeste homolog 2; GF-AFC, Cell permeable glycylphenylalanyl-amino-fluorouramin; HBEC, human bronchial epithelial cells; HDAC, Histone deacetylase; HepG2, human hepatocarcinoma; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; hERG, the human Ether-à-go-go-Related Gene; IL, Interleukin; iNOS, inducible nitric oxide synthase; LSD1, Lysine specific histone demethylase 1; MCP1, Monocyte Chemoattractant Protein-1; MDR, multidrug resistance; miRNAs, microRNA; MRPI, multidrug resistance protein 1; NFkB, Nuclear factor kappa B; NSCLC, non-small cell lung cancer; OCT2, Organic Cation Transporter 2; PCR, Polymerase chain reaction; PD-L, programmed-death-ligand; PRMT5, Protein arginine methyltransferase 5; PXR, pregnane X receptor; SEM, standard error of the mean; TAMs, tumor-associated macrophages; TGF, Transforming growth factor; TME, tumor microenvironment; TNBC, triple negative breast cancer; TNF α , Tumor necrosis factor alpha.

* Corresponding author at: Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, Pomorska St.141/143, 90-236 Łódź, Poland.

** Corresponding author.

E-mail addresses: magdalena.strachowska@edu.uni.lodz.pl (M. Strachowska), agnieszka.robaszkiewicz@biol.uni.lodz.pl (A. Robaszkiewicz).

¹ Equal contribution

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115798>

Received 26 July 2023; Received in revised form 15 October 2023; Accepted 26 October 2023

Available online 31 October 2023

0753-3322/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

silico assay of ADMET properties confirmed the desired pharmacokinetic features of I-CBP112. The results suggest that the CBP/p300 inhibitor is a promising co-adjuvant to chemotherapy in drug-resistant cancer phenotypes, capable of decreasing ABC transporter expression.

1. Introduction

Despite the remarkable increase in cancer patient recovery since the first chemotherapy success of Hertz and Li in 1956, the 5-year relative survival was estimated at 66% according to 2022 statistics [1,2]. Due to limited access to precision medicine and personalized treatment approaches, as well as late diagnosis, chemotherapy often remains the only alternative for anticancer intervention. For example, patients diagnosed with triple-negative breast cancer (TNBC) that lacks progesterone, estrogen and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) represents up to 20% of all breast tumors, and are treated with doxorubicin, paclitaxel, 5-fluorouracil or carboplatin as adjuvant and neoadjuvant chemotherapy, as also for metastatic cancers. The American Cancer Society recommends cisplatin, paclitaxel, gemcitabine, etoposide or docetaxel in combination (or not) with radiotherapy and immunotherapy for non-small cell lung cancer (stage I-IV) (NSCLC) that accounts for up to 85% of all lung tumors, being the second most common cancer in human beings [3]. However, successive cycles of chemotherapy lead to development of multidrug resistance (MDR), which is responsible for the therapy failing in 90% of cases [4]. The acquired defense mechanisms include changes in the tumor microenvironment (TME), which involves exosomes transporting specific miRNAs for intercellular communication and tumor-associated macrophages (TAMs), enhanced DNA repair ability, upgraded metabolism processes of xenobiotics, and overexpression of ABC proteins [4,5]. This group of membrane transporters, which comprises ABCA-ABCG subfamilies, regulates cellular levels of hormones, vitamins, ions and nutrients, as well as the release of cyclins and chemokines in normal cells; however, their high abundance is linked to poor chemotherapeutic efficacy since they make use of ATP to remove xenobiotics, such as wide range of anticancer drugs outside cells or sequester them in intracellular organelles, thereby limiting their cytotoxicity. The most frequently referred ABC transporters associated with MDR include ABCB1 (P-gp, MDR1), ABCC1 (MRP1) and ABCG2 (breast cancer resistance protein; BCRP); however, to date, ~12 ABC transporters that share substrate specificity have been linked to the lack of cancer sensitivity to drugs. For example, anthracyclines such as doxorubicin are transported across membranes by P-glycoprotein (ABCB1), MRP1 (ABCC1) and BCRP (ABCG2), paclitaxel by P-glycoprotein (ABCB1), MRP7 (ABCC10) and BCRP (ABCG2), platinum compounds such as cisplatin by MRP2 (ABCC2) and MRP4 (ABCC4), whereas nucleobase analog 5-fluorouracil by MRP5 (ABCC5) [6–15].

The induction of particular ABC genes varies among cancers and therapeutics, and the common pathway or transcription regulating mechanisms has not been disclosed. For example, overexpression of P-glycoprotein and BCRP confers resistance of breast cancer cell lines to docetaxel, doxorubicin and paclitaxel, whereas cisplatin or paclitaxel induced transcription of *ABCC2* and *ABCC10*, respectively, in non-small cell lung cancer [16–18]. In Melguizo et al. [19] paclitaxel increased expression of P-glycoprotein, whereas carboplatin increased *ABCC3*. Importantly, an elevated level of ABCB1 in etoposide-treated small cell lung cancer was functionally reversed by its inhibitors - tariquidar and elacridar - which also restored cell sensitivity to the anticancer agent. Therefore, 3 generations of P-glycoprotein inhibitors were developed aimed at improving the efficacy of standard chemotherapy. Due to toxicity following the required high doses of 1st generation inhibitors (Cyclosporin A, Quinine, Verapamil), pharmacokinetic interactions of second-generation inhibitors (Bricoridar, Valspodar, R-enantiomer of Verapamil) that reduced the metabolism of anticancer drugs, and increased toxicity of anticancer drugs by representatives of third-generation inhibitors (Tariquidar, Elacridar, Laniquidar,

Zosuquidar), none of the ABC inhibitors has been approved for cancer treatment [20–22].

In our previous study by Sobczak et al. [23], we provided mechanistic evidence of the role of acetyltransferase EP300 in acquiring cisplatin resistance by NSCLC and triple negative breast cancer cell lines. Upon cisplatin induction, EP300 was recruited in a p53-dependent manner to gene promoter such as *ABCC10* - which were deprived of CoREST complex, thereby acetylated nucleosomes and enhanced their transcription. Since EP300 also remains bound to the gene promoters in resistant phenotypes, we raised the hypothesis that inhibition of this acetyltransferase with CBP/EP300 bromodomain inhibitor – I-CBP112 may overcome the gained ABCC-driven cancer resistance to cisplatin and other drugs and sensitize cells to therapeutics. I-CBP112 inhibitor belongs to potent and selective CBP/p300 bromodomain inhibitors, with IC₅₀ values of 170 nM for CBP and 625 nM for EP300. I-CBP112 interacts with conserved asparagine N1168 in CBP and forms hydrogen bond with this residue and a carbonyl group that branches off from the oxazepine ring of I-CBP112 mimics an acetyl-lysine structure [24]. This compound enhances acetylation of H4K5 mediated by CBP as well as H3K18 and H3K23 by CBP- and p300 [25]. In our other paper, we successfully applied I-CBP112 to repress ABCC genes by triggering LSD1 recruitment to their promoters and the subsequent reduction of transcription promoting H3K4 trimethylation in breast, lung and hepatic cancer cell lines [26]. This was followed by considerable decline in the IC₅₀ values of anthracyclines, bleomycin, cisplatin and paclitaxel. Similarly, this compound increased the cytotoxicity of the BET bromodomain inhibitor, JQ1, and doxorubicin in myeloid leukemia cells, hence providing opportunities for possible new combinatorial treatment of leukemia [24]. CBP/EP300 inhibitors targeting the acetyltransferase activity and the acetyl-lysine-binding bromodomain of CBP/EP300 were also shown to inhibit androgen receptor signaling and tumor growth in prostate cancer, but may also be applicable for treating breast and other hormone-dependent cancers [26].

Using clinically-relevant models of doxorubicin- and paclitaxel-resistant triple negative breast cancer (MDA-MB-231), as well as cisplatin- and paclitaxel-resistant NSCLC (A549), which are characterized by induced overexpression of ABC transporters, we tested whether I-CBP112 could overcome acquired drug resistance and produce synergism with standard chemotherapy agents. We hypothesized that overexpression of ABC transporters is linked to recruitment of EP300 to their promoters and, therefore, I-CBP112 may act as a potent repressor of ABC genes that prevents an active drug efflux or internalization in cellular organelles. We took into consideration also possible direct impact of I-CBP112 on ABC protein activity, therefore we compared the efficacy of I-CBP112 and ABC inhibitors, tariquidar – ABCB1/ABCG2 and MK-571 – ABCC, in the increasing accumulation of anthracyclines and paclitaxel Oregon-Green within cells, as well as their impact on the cytotoxicity of the tested drugs. Finally, we tested some aspects of I-CBP112 safety on primary blood and other cells, as well as pharmacokinetic features in the *in silico* study.

2. Material and methods

2.1. Material

MDA-MB-231 cell line was obtained from Sigma Aldrich, HepG2 and primary cell lines were purchased from ATCC, monocytes and lymphocytes were isolated from buffy coats of healthy donors, which were acquired from the Blood Donor Center in Lodz, Poland.

DMEM High Glucose w/ L-Glutamine w/ Sodium Pyruvate, fetal

bovine serum (FBS) and antibiotics (penicillin and streptomycin), Lymphosep were purchased from BioWest (CytoGen, Zgierz, Poland).

Leibovitz's L-15 Medium, albumin from human serum, Triton X-100, DAPI, resazurin sodium salt, propidium iodide, daunorubicin hydrochloride, methotrexate, bleomycin sulfate (*Streptomyces verticillus*), I-CBP112, Nunc® MicroWell™ 384 well optical bottom plates were from Sigma Aldrich (Poznan, Poland).

Etoposide, doxorubicin hydrochloride, cisplatin, paclitaxel, 5-fluorouracil, I-CBP112, SP2509 (iLSD1), Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide were obtained from Cayman Chemical (Biokom, Janki/Warsaw, Poland).

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate, TRI Reagent™, PageRuler™ Pre-stained Protein Ladder (10–180 kDa), Pierce™ Protease Inhibitor Tablets (EDTA-free; PIC), PMSF Protease Inhibitor, RNase, ProLong™ Diamond Antifade Mountant, SlowFade™ Glass Soft-set Antifade Mountant (with DAPI), Paclitaxel, Oregon Green™ 488 Conjugate (Oregon Green™ 488 Taxol, Flutax-2 – P22310), anti-MRP5 (ABCC5) Polyclonal Antibody (Thermo Fisher Scientific Cat# PA5-102678, RRID:AB_2852074), anti-MRP10 (ABCC10) Polyclonal Antibody (Thermo Fisher Scientific Cat# PA5-23652, RRID:AB_2541152), Taq-Man™ Universal Master Mix II, TaqMan™ Gene Expression Assays (FAM-MGB/20X) for ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCC10, ABCG2, GAPDH, HPRT, CD14 antibody Alexa Fluor™ 488 (Thermo Fisher Scientific Cat# 53-0149-42, RRID:AB_2744748), CD4 antibody Alexa Fluor™ 488 (Thermo Fisher Scientific Cat# 53-0041-82, RRID:AB_469893), CD8 antibody Alexa Fluor™ 647 (Thermo Fisher Scientific Cat# MHCD0821, RRID:AB_10372065), Thermo Scientific™ Nunc™ Polycarbonate Cell Culture Inserts in Multi-Well Plates, Dynabeads™ Protein G, UltraPure™ Phenol:Chloroform: Isoamyl Alcohol (25:24:1, v/v), PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix for qPCR were from Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, Warsaw, Poland). Anti-ABCB1 (E1Y7B) Rabbit mAb (CST Cat# 13342, RRID:AB_2631176), anti-ABCC1 (D7O8N) Rabbit mAb (CST Cat# 14685, RRID:AB_2798572), ABCG2 (D5V2K) XP® Rabbit mAb (CST Cat# 42078, RRID:AB_2799211), anti-ABCC4 (D2Q2O) Rabbit mAb (CST Cat# 12705, RRID:AB_2797999), anti-ABCC3 (D8V8J) Rabbit mAb (CST Cat# 39909, RRID:AB_2799164), anti-Histone H3 (1B1B2; for Western Blot) Mouse mAb (CST Cat# 14269, RRID:AB_2756816), anti-EP300 (CST D2X6N - Rabbit mAb #54062, RRID:AB_2799450), anti-H3K4me3 (CST C42D8 - Rabbit mAb #9751, RRID:AB_2616028), anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody (CST Cat# 7074, RRID:AB_2099233), Dynabeads Protein G were from Cell Signaling Technologies (LabJOT, Warsaw, Poland). ApoTox-Glo™ Triplex Assay from Promega (Promega, Warsaw, Poland). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) from PeproTech (London, UK). RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail or RosetteSep™ Human Total Lymphocyte Enrichment Cocktail were purchased from StemCell Technologies. BIOFLOAT™ 96-well U-bottom Plate from faCellitate (Mannheim, Germany). FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit from BioLegend (Bio-course, Katowice, Poland).

2.2. Methods

2.2.1. Cell culture and induction of cisplatin, doxorubicin and paclitaxel resistance

After thawing MDA-MB-231 cell line was cultured in F15 medium supplemented with 15% FBS, penicillin/streptomycin (50 U/ml and 50 µg/ml, respectively) without CO₂ equilibration. The adaptation of cells to proliferation in DMEM with 10% FBS, penicillin/streptomycin (50 U/ml and 50 µg/ml, respectively) in 5% CO₂ was started after 5 passages and accomplished within 2 weeks.

A549 cells were treated with 10 µM cisplatin or 0.05 µM paclitaxel, whereas MDA-MB-231 were treated with 1 µM doxorubicin and 0.05 µM paclitaxel for 48 h every 4 weeks for a total number of 6 cycles. The treatment scheme and drug concentrations were chosen to fit the

therapeutic range and approaches, which give the following drug concentration in blood (doxorubicin 2–4 µM, paclitaxel 0.05 µM – 1 µM, cisplatin 2.5 – 10 µM) [27–29]. The drugs were washed out after 48 h and cells were cultured in the growth medium till another drug dose.

Drug-resistant and non-resistant cell lines were cultured under the same conditions.

Cells were incubated with I-CBP112 at a concentration of 2.5 µM for 72 h in all experiments, except flow cytometry estimation of I-CBP112 direct impact on ABC activity, where cell preincubation with CBP/p300 inhibitor was shortened to 2 h and followed by the treatment with anticancer drugs.

2.2.2. Isolation of monocytes and lymphocytes

50 ml of blood buffy coats obtained from the Regional Centre for Blood Donation and Haemotherapy in Lodz was mixed with 50 µl of antibodies for monocyte or lymphocyte isolation (RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail or RosetteSep™ Human Total Lymphocyte Enrichment Cocktail). After 20 min of incubation, the blood was diluted 1:1 with dilution buffer (PBS + 2% FBS + 1 mM EDTA) and loaded onto a density gradient medium Lymphosep in the ratio of 2:1. After centrifugation (1200 g/ 20 min/ RT/ no deceleration), cell pellet was washed with dilution buffer (300 g/ 10 min/ RT/ slow deceleration). If necessary due to contamination with erythrocytes, cells were separated again on Lymphosep. The pellet was suspended in warm RPMI 1640 medium and cells were seeded into 12-well plates at 2 ml/well.

2.2.3. Characterization of human monocytes and lymphocytes

Monocytes and lymphocytes were washed twice with PBS solution with 1% albumin, then added with 5 µl of fluorescently labeled antibody (CD14 antibody Alexa Fluor™ 488; CD4 antibody Alexa Fluor™ 488 and CD8 antibody Alexa Fluor™ 647 - respectively) and incubated at room temperature for 30 min. IgG conjugated with Alexa Fluor 488 served as a control for monocytes, whereas two IgG control with Alexa Fluor 488 and PE was prepared for lymphocytes. After incubation, the cells were washed twice with PBS solution supplemented with 1% albumin, then fixed in 0.5% formaldehyde in PBS and washed again twice with PBS. Measurement was performed by flow cytometry (LSR® II Becton Dickinson – University of Lodz), and the results were analyzed using FlowJo™ v10.8 Software (BD Life Sciences; RRID:SCR_008520) (Supplementary fig. S3O, S3P).

2.2.4. Haemolysis assay

After centrifugation of whole blood (3500 rpm/ 10 min/ 4 °C) and removal of plasma, erythrocytes were washed 3 times with cold PBS. I-CBP112 at the final concentration of 2.5 µM (or corresponding volume of DMSO) was added to cells at a haematocrit of 50% and cells were incubated at 37 °C for 24 h. After dilution 1:1 with PBS and centrifugation (3 000 rpm/ 10 min/ 4 °C), the supernatant was read on 96-well plate on Jasco V-650 spectrophotometer at λ = 535 nm. Erythrocytes treated for 30 min with 10% triton served as a positive control (100% haemolysis), whereas with DMSO as a negative control.

Haemolysis was calculated according the formula given below:

$$\text{Haemolysis [\%]} = \frac{\text{A sample}}{\text{A control}} \times 100 / \text{A control}$$

2.2.5. Reverse transcription and real-time PCR

Total RNA was extracted using TRI Reagent™. The concentration of RNA was then quantified using Quantus™ Fluorometer. The reverse transcription was performed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (25 °C → 10 min, 36 °C → 120 min, 95 °C → 5 min, 4 °C → ∞) according to the manufacturer's protocol (Thermo Fisher Scientific). The level of expression of selected ABC genes was measured using TaqMan™ Gene Expression Assays and TaqMan™ Universal Master Mix II (Thermofisher Scientific) according to the protocol

provided by the manufacturer (polymerase activation: 95 °C, 10 min; PCR cycles: denaturation - 95 °C, 15 s; annealing - 60 °C, 1 min).

Housekeeping genes (HSKG; *TBP* and *GAPDH*) were used to normalize the obtained mRNA level. The fold change between the examined gene and particular HSKG was assumed as 1 for control cells and the average was calculated.

2.2.6. Chromatin Immunoprecipitation

Cells were seeded at a density of 5 million cells per culture dish and fixed with a 1% formaldehyde solution after an experiment-appropriate incubation time. Chromatin was isolated and sheared using a Bandelin Sonoplus homogenizer (HD 2070). Cell lysates together with magnetic beads (Dynabeads™ Protein G) and antibodies were incubated on a rotator at 4 °C; 10% of the cell lysate was taken as Input before adding the antibody-conjugated beads. After overnight incubation, the immunoprecipitated chromatin was washed and decrosslinked overnight at 65 °C. DNA was isolated using UltraPure™ Phenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol (25:24:1, v/v) and then analyzed using qPCR. The following primer pairs were used: *ABCB1* promoter Forward: 5'CCAATCAG CCTCACACAGA 3', Reverse: 5'GATTCAAGCTGATGCGCGTT 3'; *ABCC2* promoter Forward: 5' AGGTCAAGGCTGCAATGAAT 3", Reverse: 5'CTG TCATCGACCCAACCTT 3'; *ABCC10* promoter Forward: 5' CTTGTCCAA GGTATGCAGC 3', Reverse: 5'GCCAACGGACAATAATGC 3'; *CAT* exon 10 Forward: 5'TGCTCCAAATTACTACCCCAAC 3', Reverse: 5' TGTGAATCTCCGCACTTCTC 3'.

In the wild-type and resistant cell lines immunoprecipitated fragment encompassing the EP300 binding site in the *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCC10* promoters was immunoprecipitated using PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix for qPCR, according to the protocol provided by the manufacturer (polymerase activation: 95 °C, 2 min; PCR cycles: denaturation - 95 °C, 15 s; annealing - 58 °C, 15 s; extension - 72 °C, 45 s). Master Mix was supplemented with 0.1% DMSO. The internal control was Input (10% of the initial lysate). *Catalase (CAT) exon 10* was used to confirm EP300 enrichment.

For H3K4me3 quantification, resistant lines were incubated for 72 h with 2.5 μM I-CBP112 or without. Immunoprecipitated fragments encompassing H3K4me3 in the *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCC10* promoters were analyzed by real-time PCR meotda using PowerUp™ Master Mix (conditions were described above). Input was the internal control, and *exon 10 CAT* was used to validate enrichment of H3K4me3.

2.2.7. Western blot

The protein expression of selected ABC transporters was compared between samples by western blot. Cells were lysed with RIPA buffer containing 1 mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) and 1x Protease Inhibitor Cocktail (PIC), and sample equalization was carried out based on dsDNA content, which was measured using Quantus™ Fluorometer. Lysates were separated by SDS-PAGE electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane. The blocking step was carried out in a 5% albumin solution in PBS with 0.1% Tween 20. After an overnight incubation at 4°C with the primary antibody, secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) was added for 2 h incubation at room temperature. SuperSignal™ West Pico PLUS chemiluminescent substrate was used to visualize the proteins of interest.

Histone H3 served as a control for equal protein concentrations in each sample.

2.2.8. Resazurin toxicity assay

Cells were seeded at a density of 5 000 cells per well into 384-well Nunc® MicroWell™ optical-bottom plates and, on the next day, treated with I-CBP112 (2.5 μM) for 72 h. Anticancer drugs were added to cells preincubated with I-CBP112 for another 48 h. Resazurin at the final concentration of 5 μM was incubated with cells at 37 °C for 4 h. The fluorescence intensity (excitation – 530 nm, emission 590 nm) that corresponds to cell metabolic activity was measured with BioTek Synergy HTX fluorescence microplate reader.

2.2.9. ApoTox-Glo Assay

The toxicity and viability markers of blood-derived monocytes and lymphocytes were examined using ApoTox-Glo™ Triplex Assay from Promega, and cell treatment scheme followed the protocol for resazurin assay. For viability and cell death, cells were incubated with GF-AFC and bis-AAF-R110, respectively for 30 min and cell absorbance/fluorescence was measured at 400 nm ex/505 nm em (Cell viability) and 485 nm ex/ 520 nm (Cell cytotoxicity). Membrane permeability (bis-AAF-R110 fluorescence) was normalized to relative number of viable cells (GF-AFC fluorescence).

Caspase 3/7 activity in I-CBP112-treated cells was measured in primary fibroblasts. Apoptosis was quantified after incubation with luminogetic caspase-3/7 substrate, which was added to cells for 30 min and luminescence was read [30].

2.2.10. Confocal microscopy

Cells were seeded onto Nunc™ Lab-Tek™ chamber slide at a density of 10,000 cells per well for visualization of ABC proteins and monitoring of fluorescent drug accumulation inside cells.

To visualize ABC proteins, cells were washed with PBS and then fixed in 1% formaldehyde in PBS during a 15-minute incubation at room temperature, permeabilized and blocked in 1% FBS solution in PBS with 0.1% Triton X-100 at room temperature for 1 h. Primary antibody was incubated with the cells at a ratio of 1:400 in a 1% BSA in PBS with 0.1% Triton X-100 overnight at 4 °C. After washing with PBS, a secondary antibody conjugated to fluorescent probe (Alexa Fluor) was added, also in a ratio of 1:400, in 1% BSA solution in PBS with 0.1% TritonX-100 at room temperature for 2 hr. After washing with PBS slides were sealed with SlowFade™ Glass Soft-set Antifade Mountant (with DAPI).

Drug accumulation was measured after 72 h incubation with I-CBP112 and additional 24 h cell incubation with autofluorescent anthracyclines (doxorubicin and daunorubicin), and paclitaxel labeled with Oregon Green 488. Cells were washed three times with PBS, then slide was sealed with SlowFade™ Glass Soft-set Antifade Mountant (with DAPI).

Paclitaxel Oregon Green 488 is poorly cytotoxic and has low transmembrane permeability, suggesting that it is an faultless candidate for studies which involve cellular transport, including ABC transporter confocal microscopy studies [31].

2.2.11. Drug accumulation analysis by flow cytometry

Cells were seeded into a 6-well plate at a density of 1 million cells per well. After 72 h incubation of cells with 2.5 μM I-CBP112, two anthracyclines (doxorubicin and daunorubicin) and paclitaxel-Oregon Green 488 at a concentration of 0.1 μM were added to the culture for another 4 h. Cells were trypsinized and washed with PBS were fixed in 0.5% formaldehyde in PBS at room temperature for 15 min, transferred to fresh PBS and fluorescence intensity was measured by flow cytometer (LSR® II Becton Dickinson) at excitation 470 nm and emission 595 nm for anthracyclines, and excitation 496 nm and emission 524 nm for paclitaxel. Distribution of cell intensity was analyzed using FlowJo™ v10.8 Software (BD Life Sciences; RRID:SCR_008520). The analyzed cell population was discriminated based on FSC-A and SSC-A parameters. Intensity of cell fluorescence was visualized on a histogram and the shift in fluorescence distribution indicated the alteration in drug distribution. For quantification the average of fluorescence intensity in every sample was used. In addition, the possible joint impact of I-CBP112 on ABCB1, ABCG2 and ABCC protein activity was tested by exposing cells to I-CBP112 for 2 h, and after removal of CBP/EP300 inhibitor cells was treated with anticancer drugs as described above.

In parallel, the efficacy of direct ABC inhibitors (MK-571–25 μM and tariquidar - 1 μM) added separately or as mixture to cells for 2 h prior to anticancer drugs on drug accumulation were tested.

2.2.12. Protein-ligand docking

The prediction on the binding sites and affinity of I-CBP112,

Tariquidar, MK-571, Reversan (another ABCC1/MRP1 inhibitor), doxorubicin, ATP and ABCB1, ABCC1, ABCG2 and CYSLTR1 (cysteinyl leukotriene receptor 1) were computed in CB-Dock2 [32,33]. For ABCB1 (7a65.pdb), ABCG2 (7neq.pdb) and CYSLTR1 (6rz4.pdb) protein structure was downloaded from Protein Data Bank (RCSB PDB), first two proteins were spited into corresponding chains with PDB Tools: SplitChain and chain A was taken for further analysis. ABCC1 was downloaded from AlphaFold Protein Structure Database [34,35]. Hydrogen was added to all proteins with PDB Tools: AddHydrogen. Drug structure for docking was downloaded from PubChem: Tariquidar – PubChem CID: 148201, MK-571 – PubChem CID: 5281888, I-CBP112 – PubChem CID: 90488984, Doxorubicin – PubChem CID: 31703, ATP – PubChem CID: 5957.

2.2.13. Spheroid formation, treatment, drug accumulation and analysis of apoptosis

Paclitaxel-resistant A549 and doxorubicin-resistant MDA-MB-231 cell lines were seeded at a density of 20,000 cells per well into BIO-FLOAT™ 96-well U-bottom Plate. After 2 weeks of spheroid formation 3D cultures were treated with I-CBP112 (2.5 μ M) for 72 h and with doxorubicin (0.1 μ M) for another 48 h. The entire treatment was repeated after one week with the same conditions.

The 3D cultures were washed 3 times with PBS, suspended in Annexin V binding buffer and added with FITC -labeled Annexin V (ratio of 100:5) according to manufacturer instruction (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit; BioLegend). After a 30-minute incubation at room temperature in the dark, cells were washed three times with PBS. Subsequently, spheroids were fixed with 4% formaldehyde solution in PBS at room temperature in the dark for 30 min. DNA was stained with 1 μ M DAPI.

The confocal laser scanning microscopy platform TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) with the objective 10x/0.40 DRY (Leica Microsystems, Germany) and TCS LSI confocal microscope with the objective 5x/0.17 (Leica Microsystems, Germany) were applied for imaging. Samples were imaged with the following wavelength values of excitation and emission: 405 and 430 – 480 nm for DAPI, 495 and 530–595 nm for Annexin V-FITC, and 480 and 590–650 nm for doxorubicin. Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems, Germany) was used to determine the fluorescence mean and the average spheroid volume.

2.2.14. Macrophages polarization

Human blood-derived monocytes were differentiated with 10 ng/ml GM-CSF for 7 days as described in Pietrzak et al. [36], then incubated with 2.5 μ M I-CBP112 for 72 h, collected and lysed in Trizol, and RNA was isolated for gene expression analysis of pro- (M1) and anti-inflammatory (M2) markers.

3. Results

3.1. I-CBP112 decreases overexpression of key multidrug resistance-associated ABC transporters in MDA-MB-231 and A549 cell lines exposed to anticancer agents

The resistant cell lines were generated based on treatment regimens for specific cancers using actual chemotherapy recommendations. Taking into account these chemotherapy strategies and the pairs of clinically relevant cancer drugs, we generated doxorubicin- and paclitaxel-resistant MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells, as well as cisplatin- and paclitaxel-resistant A549 non-small cell lung cancer cell lines. All resistant MDA-MB-231 phenotypes were characterized by reduced sensitivity to paclitaxel, doxorubicin, daunorubicin and etoposide (Fig. 1A, Supplementary fig. S3D) and resistant A549 to paclitaxel, daunorubicin, cisplatin and etoposide (Fig. 1A, Supplementary fig. S3E). Resistant phenotypes showed sensitivity only to 5-fluorouracil (Supplementary fig. S3D, S3E). As an example, we also compared

apoptosis induction between paclitaxel-resistant and non-resistant A549 cells. The activity of caspase 3/7 that plays a key role in programmed cell death was lower in the resistant phenotype treated with drugs having different mechanisms of action (Fig. 1B). This was further confirmed by confocal microscopy and staining of cleaved caspase 3/7. The bright green fluorescence that corresponded to the level of the assayed antigen was only seen in the culture of non-resistant cells exposed to paclitaxel (Fig. 1C; Supplementary fig. S1A, S1B).

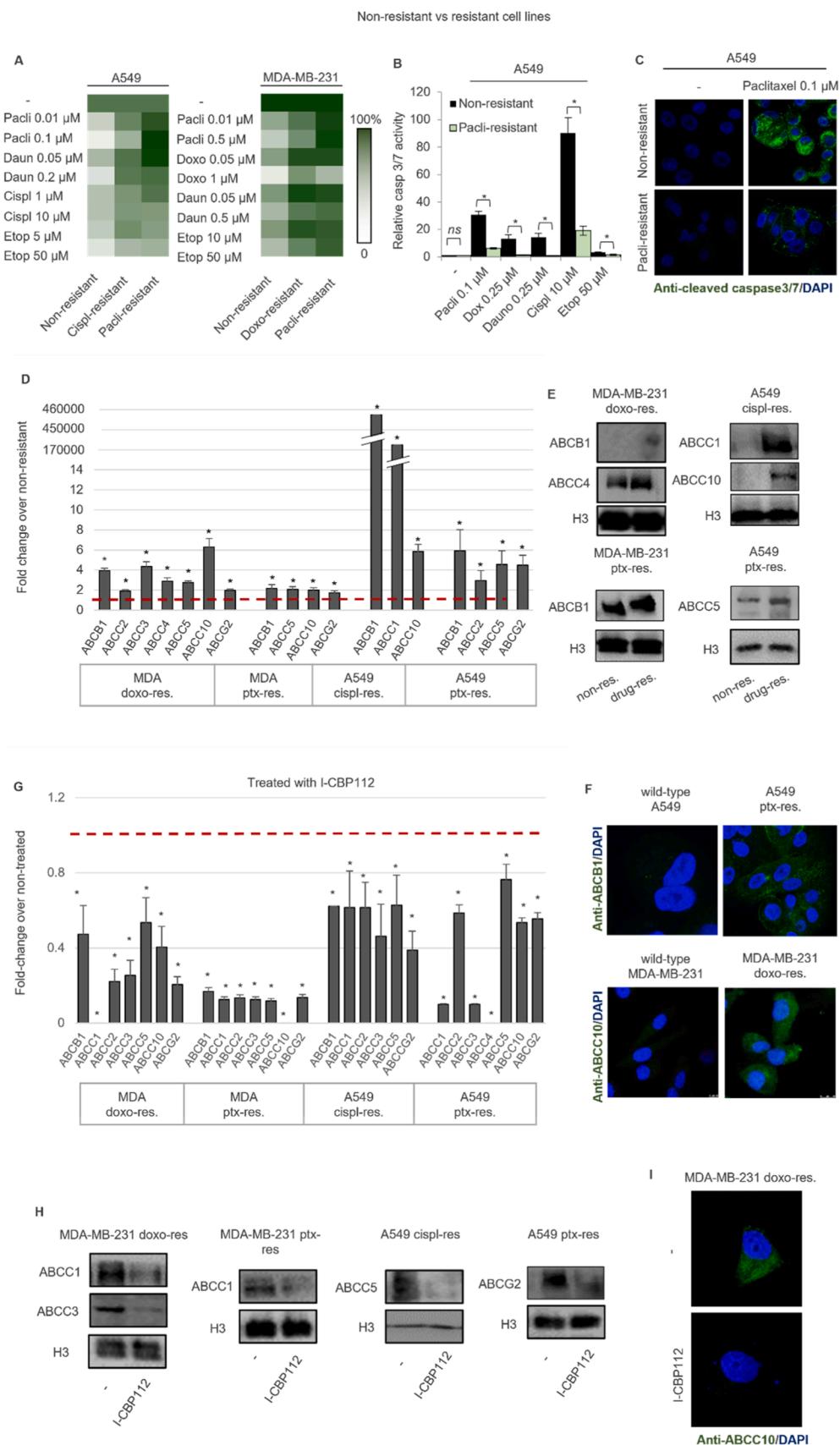
All the resistant cell lines developed featured overexpression of at least 3 ABC transporters (Fig. 1D). Transcription of all the studied genes, except ABCC1, was enhanced in doxorubicin-resistant MDA-MB-231, whereas resistance to paclitaxel was associated with an increase in the mRNA level of ABCB1, ABCC5, ABCC10 and ABCG2 (Fig. 1D, Supplementary table). The repeated administration of the microtubule stabilizer led to overexpression of ABCB1, ABCC2, ABCC5 and ABCG2 in the A549 cell line, but cisplatin caused strong activation of ABCB1, ABCC1 and moderate ABCC10. The greater abundance of exemplary ABCB1 and ABCC proteins in particular cell line pairs was confirmed by Western blot (Fig. 1E; Supplementary fig. 2) and confocal microscopy (Fig. 1F; Supplementary fig. S1C, S1D). Notably, overexpression of ABC transporters in paclitaxel-resistant cell lines was associated with the recruitment of EP300 to their promoters thereby suggesting the possible contribution of EP300 in transcription control of these genes (Supplementary fig. S3A).

Bearing in mind the previously reported involvement of EP300 in ABC gene transcription in cancer cells, and that I-CBP112 considerably represses transcription of ABC transporters, thereby sensitizing basal MDA-MB-231 and A549 cell lines to various therapeutics, we measured whether the selected CBP/p300 bromodomain inhibitor similarly impacts transcription of ABC genes in both cell types that had acquired multidrug resistance. Fig. 1G shows that cell incubation with I-CBP112 for 72 h considerably repressed all genes examined in doxorubicin- and paclitaxel-resistant MDA-MB-231. Similarly, in cisplatin-resistant A549, all examined genes were decreased, except ABCC10 (Fig. 1G; Supplementary table). Treatment with I-CBP112 decreased transcription of ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCC10 and ABCG2, but ABCB1 in A549 paclitaxel-resistant cell line. The I-CBP112-induced decrease in the level of ABC proteins was also confirmed by Western blot (Fig. 1H; Supplementary fig. 2) and confocal microscopy (Fig. 1I; Supplementary fig. S1E). To test if I-CBP112 represses some ABC genes in drug-resistant cell lines in LSD1-dependent fashion, which we previously described in non-resistant cells [26], we carried out ChIP-qPCR on trimethylated histone H3K4 and measured the impact of LSD1 inhibitor (SP2509) on I-CBP112-induced transcriptional suppression. First, we took into consideration promoters of exemplary genes, which are overexpressed in doxorubicin-resistant MDA-MB-231 and paclitaxel-resistant A549. As shown in Supplementary fig. S3B CBP/EP300 inhibitor substantially declined the level of H4K3me3 at the considered promoters. It indicates that the possible functional impact of I-CBP112 on chromatin remodeling by LSD1. This was confirmed by results shown in Supplementary fig. S3C, where LSD1 inhibition prior to cell treatment with I-CBP112 considerably decreased repressive impact of CBP/EP300 inhibitor on the gene transcription.

For analysis of normality, the Kolmogorov-Smirnov test was chosen. The difference between two samples was checked with the Mann-Whitney test in datasets with non-Gaussian distribution (Fig. 1B; Fig. 1D; Fig. 1G), whereas the unpaired t-test was chosen for data that passed normality test (Fig. 1B; Fig. 1G). One-way ANOVA followed by Tukey's test (Fig. 1A) and two-way ANOVA (Fig. 1A) were performed for multiple comparison of samples with normal distribution. Samples are marked with “*” when $P < 0.05$, otherwise are marked “ns”.

3.2. I-CBP112 increases drug concentration in drug-resistant cancer cells

Since we found substantial I-CBP112-induced repression of some ABC transporters that are overexpressed in drug-resistant phenotypes,



(caption on next page)

Fig. 1. I-CBP112 suppresses ABC genes, which are overexpressed in drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines. (A) The acquisition of drug resistance in MDA-MB-231 and A549 cell lines was determined by comparing their viability in response to two concentrations of selected drugs, which were added to cell culture for 48 h. Drug toxicity was quantified by resazurin assay, and the fluorescence of untreated cells was assumed as 100%. (B) Caspase 3/7 activity was measured using Apo-Tox Glo assay in non-resistant and paclitaxel-resistant A549 cells. Data on bar-graph indicate caspase activity normalized to cell viability measured in (A). (C) The cleavage of caspase 3/7 was visualized by immunostaining followed by confocal microscopy. DNA was stained with DAPI, whereas the protein was stained with anti-cleaved caspase 3/7 primary and then, AlexaFluor 488-conjugated secondary antibodies. (D) The transcription of selected ABCB, ABCC and ABCG genes in MDA-MB-231 and A549 cell lines was quantified by real-time PCR using TaqMan probes. The average mRNA level of each gene was normalized to housekeeping genes (GAPDH, HPRT), and the gene transcription in basal cell lines was assumed as 1. Overexpression of some ABC transporters was confirmed by western blot (E) and confocal microscopy (F). In (E) histone H3 served as a loading control. In (F) cellular levels of ABCB1 and ABCC10 were compared by immunostaining combined with confocal microscopy. Proteins were stained in green (AlexaFluor 488-conjugated secondary antibody), whereas nucleus in blue (DAPI). The impact of 72 h cell incubation with I-CBP112 (2.5 μM) on mRNA (G) and protein (H) level of selected ABC transporters was quantified by real-time PCR and visualized by western blot, respectively. Gene transcripts were normalized to housekeeping genes (GAPDH, HPRT), and untreated control was assumed as 1. In (H) histone H3 served as a loading control. The example in (I) shows I-CBP112-induced decline in green fluorescence (AlexaFluor 488-conjugated secondary antibody) that corresponds to ABCC10 abundance in doxorubicin resistant MDA-MB-231. 2.5 μM bromodomain inhibitor was added for 72 h. DNA was counterstained with DAPI.

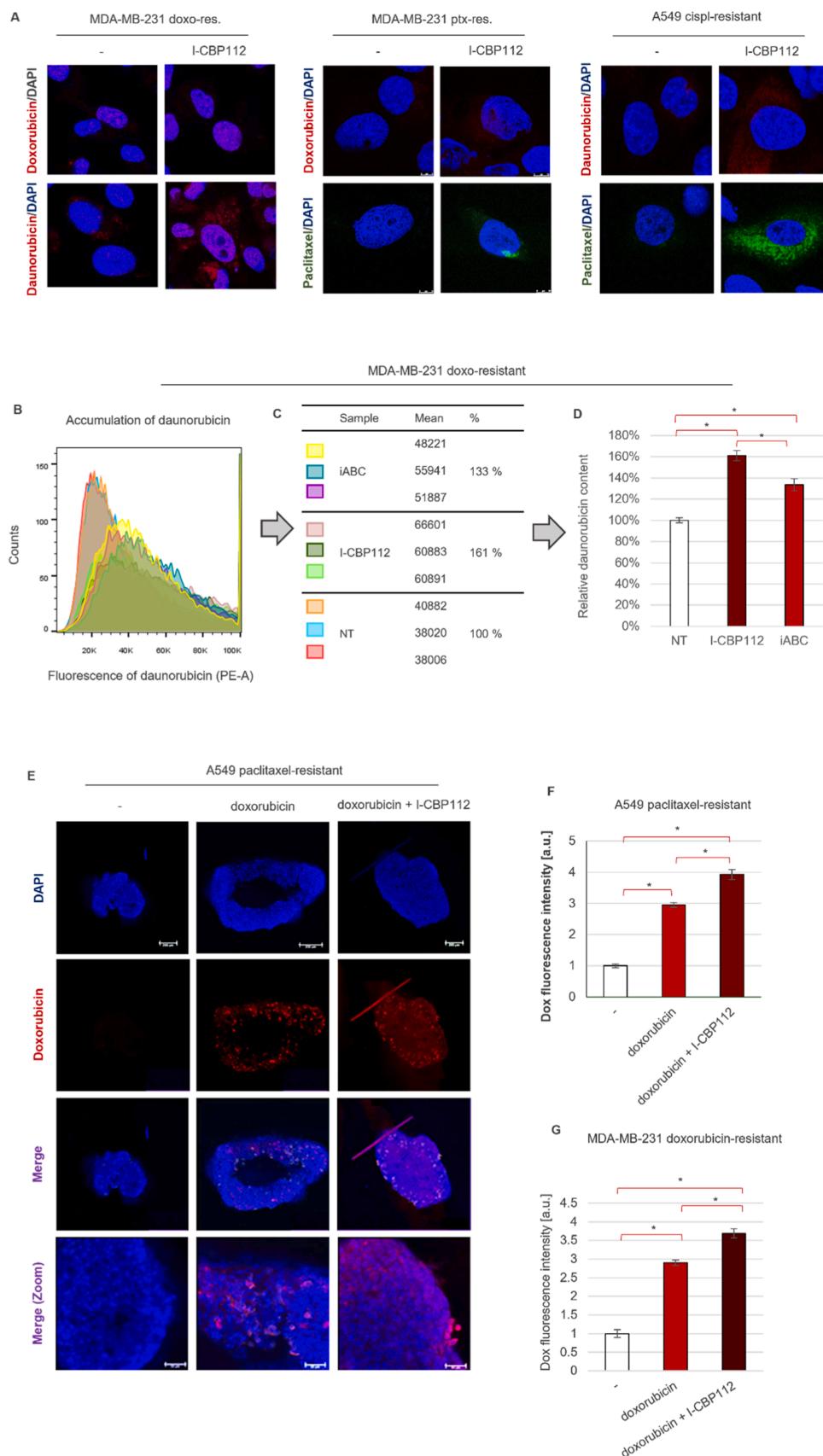
we hypothesized that this compound might affect drug accumulation by cells. To test this, we considered 2 anthracyclines – doxorubicin and daunorubicin - due to their autofluorescent capacity, as well as Oregon Green 488-conjugated paclitaxel, and monitored the fluorescence of cells exposed to the drug alone or in combination with I-CBP112. Pre-incubation of cells with CBP/EP300 bromodomain inhibitor for 72 h considerably increased the drug level within resistant phenotypes, as evidenced by confocal microscopy (Fig. 2A and Supplementary fig. S1F, S1G, S1H, S1I). As long as paclitaxel-oregon green was retained only in the cytoplasm, I-CBP112 considerably enhanced the abundance of both anthracyclines, as also in the nuclei.

To quantify the level of drugs inside cells as well as to compare the impact of I-CBP112 and combination of potent ABC inhibitors (tariquidar – ABCB1/ABCG2 and MK-571 - iABC) on the intracellular drug level in the MDA-MB-231 cells non-resistant and resistant to doxorubicin as well as A549 non-resistant and resistant to cisplatin and paclitaxel, we made use of flow cytometry to read the fluorescence of each cell separately. Fig. 2B shows that iABC and, even more so, I-CBP112, raised the distribution of cell fluorescence to higher levels, thereby indicating a higher concentration of the influxed daunorubicin in the population of doxorubicin-resistant MDA-MB-231. This indicates a similarity between iABC and I-CBP112 in their potency to increase the mean fluorescence value of these cells exposed to daunorubicin (Fig. 2C) and hence drug concentration inside cells. Consistently, I-CBP112 caused higher retention of all three tested drugs in resistant phenotypes, which are characterized by overexpression of some ABC transporters, when compared with their non-resistant counterparts (Supplementary fig. S3F, S3G, S3H). With only one exception, combination of two ABC inhibitors that simultaneously decrease activity of ABCB1, ABCG2 and some ABCC subfamily members, emerged more potent in drug retention than I-CBP112 added to cells for 72 h. However, when added to cell separately Tariquidar and MK-571 failed to prevent drug efflux from drug-resistant cells (Supplementary fig. S3J). MK-571 alone increased fluorescence of only doxorubicin-resistant MDA-MB-231 cells exposed to Daunorubicin up to 120%. This suggests that simultaneous inhibition of numerous ABC transporters can be necessary to improve accumulation of chemotherapeutics in drug-resistant cancer cells, which overexpress several ABC transporters. Furthermore, upon Tariquidar- or MK-571-induced deficiency in activity of some transporters their role is taken over by other ABC family members without considerable impairment in the drug efflux efficacy.

While considering the possible direct impact of I-CBP112 on ABC protein activity, we first compared the docking sites and affinity of doxorubicin, I-CBP112 and the known inhibitors of ABC proteins such as Tariquidar, MK-571 or Reversan to ABCB1, ABCG2 and ABCC1. As shown in Supplementary fig. S4 A-H and Supplementary table 1 I-CBP112 matched almost perfectly to amino acid residues in the pocket C1 and C2 of ABCG2, which interact with anthracycline and Tariquidar. In the pocket C2 it bound opposing phenyl rings of F439 as same as Tariquidar, but also topotecan and mitoxantron that are reported as ABCG2 substrates [37]. In ABCB1, CBP/EP300 inhibitor shared 9 amino

acid residues in common with doxorubicin in pocket C1, but the interaction profile with Tariquidar varied. In the pocket C2, interacted with 12 amino acid residues, which were shared jointly by doxorubicin and tariquidar. Analysis of pharmacokinetic properties (ADME) of I-CBP112 indicated that this compound may act as a substrate and inhibitor of P-glycoprotein. I-CBP112 similarly to MK-571, Reversan and doxorubicin bound with the highest affinity to C2 pocket of ABCC1 and interacted with prevailing number of amino acids that were in common with MK-571 and anthracycline. None of the considered ABCC inhibitors neither I-CBP112 matched ATP binding sites in C1 pocket. Knowing that ABCC1 transports leucotriene C(4) (LTC(4)) across membrane and that MK-571 acts as antagonist of leukotriene LTD4 receptor - CysLT1R, we also compared the interaction of I-CBP112 and MK-571 with C1 pocket of CysLT1R. Surprisingly, the two chemical compounds bound to different parts of C1 pocket and only MK-571 interacted with the key ligand binding amino acids described previously by Luginina et al. for other two CysLT1R antagonists [38]. This all suggest the possible inhibitory effect of I-CBP112 on drug active efflux by ABCC1. Since the above-described predictions have never been confirmed experimentally, we tested the drug accumulation in cells exposed relatively short to CBP/EP300 inhibitor (2 h) prior to drug administration, so we followed the treatment scheme for iABC inhibitors (Supplementary fig. S3J). We assumed that I-CBP112-induced decline in drug accumulation will corroborate its direct inhibitory activity to at least subset of ABC proteins overexpressed in drug-resistant phenotypes. However, no impact of I-CBP112 was found in any of the tested cell lines and any of anti-cancer drugs. The lack of fluorescence increase of MDA-MB-231 cells resistant to paclitaxel, where ABCB1, ABCG2, ABCC5 and ABCC10 is only slightly increased and inhibition of ABCB1 and ABCG2 may not be efficiently compensated by ABCC5 and ABCC10, and of A549 cell resistant to cisplatin, which overexpress primarily ABCB1 and ABCC1, suggest that I-CBP112 may not act as an effective ABCB1, ABCG2 and ABCC1 inhibitor in vitro, or it inhibits only some of ABC transporters, hence its impact on drug efflux cannot be observed. If the latter hypothesis is correct this would further confirm the need of simultaneous deficiency of numerous ABC transporters to achieve the desired drug retention inside cells.

Considering that the tested bromodomain inhibitor increases the accumulation of selected drugs in adherent 2D cultures, we tested its influence on drug penetration into 3D spheroid cultures, which, in some aspects, resemble the conditions in solid tumors. Advantage was taken of the autofluorescent properties of redlight emitting doxorubicin, which can be monitored simultaneously with green light emitting probes such as Annexin V-FITC, used to compare pro-apoptotic activity of doxorubicin alone and in combination with CBP/EP300 bromodomain inhibitor. Anthracycline at 0.1 μM penetrated spheroids and accumulated strongly in single cells or cell clusters (Fig. 2E), leaving some drug-free areas, or at least with reduced anthracycline concentration. In contrast, I-CBP112 caused a nearly equal distribution of doxorubicin inside spheroids regardless of their depth, but the brightest spots were nevertheless seen in the external parts of the 3D culture. This suggests that I-



(caption on next page)

Fig. 2. CBP/EP300 bromodomain inhibitor increases drug accumulation in drug-resistant breast and non-small cell lung cancer cell lines. (A) Exemplary confocal microscopy images show intracellular localization of anthracyclines (red) and green-conjugated paclitaxel (green) in basal and drug resistant MDA-MB-231 and A549 cells treated and untreated with 2.5 μ M I-CBP112 for 72 h. DNA was stained with DAPI. (B) Histogram shows distribution of daunorubicin fluorescence intensity quantified by flow cytometry. Each sample was tested in three biological replicates. Cells were exposed to 0.1 μ M anthracycline for 24 h, as well as to 2.5 μ M I-CBP112 for 72 h and combination of Tariquidar – 1 μ M; Probenecid – 100 μ M; MK-571 – 25 μ M for 2 h prior to drug administration to cell culture. (C) Mean value of cell fluorescence and fold change with respect to cells exposed to drug alone is indicated in table for each biological replicate separately and listed in the table. (D) The mean fluorescence of I-CBP112 and iABC pretreated cells, which was read with flow cytometry and corresponds to daunorubicin concentration inside cells, was normalized to mean fluorescence of cell exposed to drug alone (-) that was assumed as 100%. The following ABC inhibitors were compared with 2.5 μ M I-CBP112: Tariquidar – 1 μ M; Probenecid – 100 μ M; MK-571 – 25 μ M. (E) Exemplary images of 3D culture of paclitaxel-resistant A549 cells exposed to two series of I-CBP112 (2.5 μ M, 72 h prior to drug) and doxorubicin (48 h) treatment with a weekly interval. Doxorubicin is marked in red, DNA with blue (DAPI). (F and G) Bars present mean intensity of red fluorescence that was quantified in acquired pictures of spheroid sections using Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems, Germany). (F) shows data for paclitaxel resistant A549 cells, whereas (G) for doxorubicin-resistant MDA-MB-231. Results are shown as mean \pm SEM. Normal data distribution was checked with e Shapiro-Wilk, and for multiple sample comparison one-way ANOVA followed by Tukey's test were performed. Samples are marked with “*” when $P < 0.05$.

CBP112 allows doxorubicin to permeate the inner layers, where it then spreads across cells. Quantification of red fluorescence intensity confirmed that I-CBP112 increased the concentration of doxorubicin inside spheroids of both drug-resistant cancer cell lines (Fig. 2F and G).

3.3. Combination of drugs with I-CBP112 increases their cytotoxicity in cultures of drug-resistant cell lines

Knowing that pretreatment of cells with I-CBP112 increases drug accumulation in resistant phenotypes, attributed, at least in part to repression of ABC gene expression, we determined whether this compound can reverse or reduce acquired multidrug resistance to resistance-inducing compounds. As examples, we used doxorubicin-resistant MDA-MB-231 cells and paclitaxel-resistant A549 cells, comparing viability and the level of the cleaved caspase 3/7 between cells exposed to doxorubicin or paclitaxel alone and in their combination with I-CBP112 (Fig. 3A-D). Doxorubicin reduced cell metabolic activity in a dose-dependent manner, leading to survival of only ~22% at 5 μ M (Fig. 3A). At 0.05 μ M, anthracycline induced considerable apoptosis, as visualized by the raised caspase 3/7 levels (Fig. 4B). Cell viability decreased only with a paclitaxel concentration up to 0.2 μ M, which caused ~52% reduction in metabolically active cells (Fig. 3C). The survival curve flattened above this dose, and no further increase in paclitaxel toxicity was seen. Similarly, 0.1 μ M paclitaxel triggered caspase 3/7 cleavage, suggesting enrichment of apoptotic cells in taxan-treated culture (Fig. 3D).

I-CBP112 increased drug-induced decrease in cell viability over a wide range of anthracycline concentration (from 0.001 to 1 μ M) and in a narrower range of taxan concentration (from 0.001 to 0.05 μ M). Importantly, this increase in drug concentration was associated with the gradual decrease in I-CBP112's efficacy to potentiate drug cytotoxicity and was dissipated at lower doses of paclitaxel. This suggests that I-CBP112 may reduce drug doses that would be necessary to achieve the expected or desired anticancer efficacy.

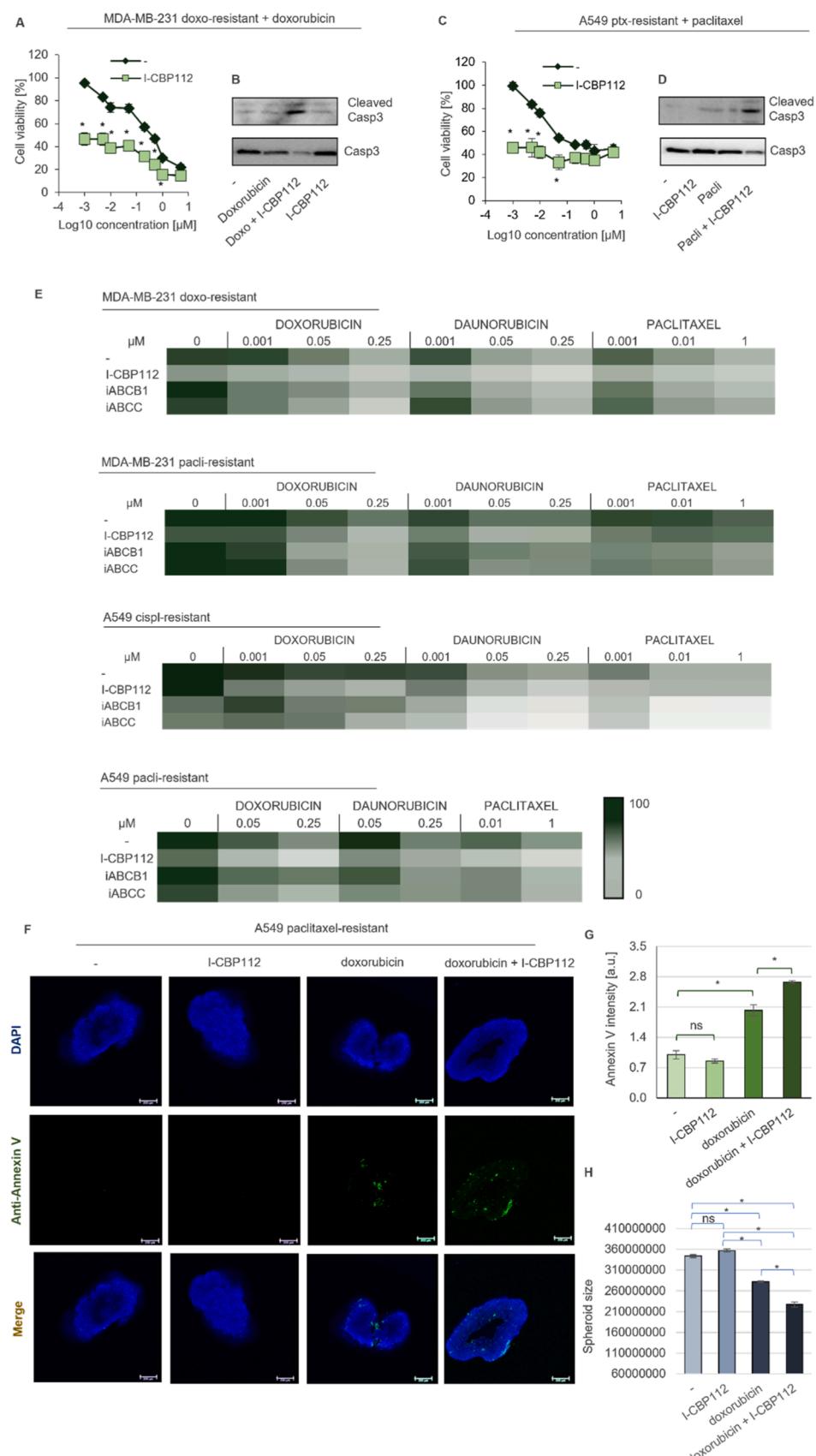
I-CBP112 alone at 2.5 μ M reduced the number of metabolically active cells in 3 out of the 4 of the cell lines. This suggests that CBP/EP300 inhibitor interferes with prosurvival pathways in some cancer phenotypes and that I-CBP112-potentiated drug toxicity likely involves other aspects than ABC repression alone. The lack of any I-CBP112 impact on resazurin metabolism was only observed in cisplatin-resistant A549 cells (Fig. 3E), which proved sensitive to both ABC inhibitors: Tariquidar reduced cell viability to ~67%, whereas MK-571 to ~61%. A slight, but statistically significant, decline was also found in paclitaxel-resistant A549 cells exposed to iABCC. CBP/EP300 bromodomain inhibitor potentiated cytotoxicity of both anthracyclines over the whole concentration range (0.001 – 0.25 μ M) in all resistant phenotypes, with one exception, which was the highest dose of daunorubicin in MDA-MB-231 cells resistant to doxorubicin (57.7 ± 3 vs 21.9 ± 4.2 ; a Bonferroni post-test gave $p > 0.05$). Pretreatment of both paclitaxel-resistant cell lines with ABCC inhibitor (MK-571) phenocopied the effect of I-CBP112 on anthracycline toxicity, whereas considerable discrepancies occurred

in comparing ABCB1/ABCG2 inhibitor – Tariquidar and I-CBP112 in NSCLC. Only at the lowest anthracycline concentration iABC1/ABCG2 proved less potent than CBP/EP300 inhibitor in doxorubicin-resistant MDA-M-231.

Substantial intensification of the paclitaxel effect by I-CBP112 varied among the cell types; in terms of drug doses it was widest in paclitaxel-resistant A549 cells ($p < 0.05$ for all concentrations), moderate in MDA-MB-231 resistant to doxorubicin (Bonferroni post-test $p < 0.05$ for 0.001 and 0.01 μ M), and narrowest in paclitaxel-resistant MDA-MB-231 and cisplatin-resistant A549 cells, which showed higher sensitivity only to the lowest concentration of the taxan combination with I-CBP112 compared with taxan alone. The beneficial influence of ABC inhibitors on paclitaxel toxicity was seen in both paclitaxel and A549 cisplatin-resistant cell lines. I-CBP112 was more potent than iABC only in A549 cells resistant to paclitaxel, and only at a moderate concentration of this drug. Neither iABC1/ABCG2 nor iABCC affected paclitaxel-induced death of MDA-MB-231 resistant to doxorubicin.

In summary, I-CBP112 can be considered as a drug-synthesizing agent since it potentiated the cytotoxicity of all examined compounds, although in strictly defined settings, which included drug-resistant phenotype and concentration of chemotherapeutics. Under certain conditions, it also surpassed the anti-multidrug resistance efficacy of ABC inhibitors.

Considering that the tested CBP/p300 bromodomain inhibitor enhances the cytotoxicity of chemotherapeutics in monolayer culture of paclitaxel- and doxorubicin-resistant cell lines, thereby indicating its potential to overcome or limit the gained resistance, as well as having confirmed its positive impact on spheroid penetration by doxorubicin, we determined whether this compound might also potentiate considerably the induction of apoptosis in 3D cultures. The combination of doxorubicin with I-CBP112 was followed by the higher number of Annexin V-positive cells inside spheroids compared to doxorubicin alone (Fig. 3F). The combinatorial cell treatment led to a similar distribution of the green fluorescence across the internal part of spheroids, with some brighter spots in the outer regions, hence imitating the distribution of doxorubicin (Fig. 2E). This may also suggest that the concentration of anthracycline, which permeates deeper spheroid regions due to I-CBP112-induced deficiency of ABC expression, is sufficient to initiate programmed cell death. This was also confirmed by quantification of Annexin V signal, which indicated that I-CBP112 potentiates cytotoxicity of doxorubicin in paclitaxel-resistant A549 (Fig. 3G, Supplementary table) and doxorubicin-resistant MDA-MB-231 (Supplementary fig. S3N, Supplementary table). Moreover, comparison of spheroid size (Fig. 3H, Supplementary table) by confocal laser scanning microscopy showed considerable potentiation of doxorubicin-induced spheroid shrinkage by I-CBP112, thereby further confirming the efficacy of this drug-inhibitor combination.



(caption on next page)

Fig. 3. Drug combination with I-CBP112 enhances its cytotoxicity in drug resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines. In (A) and (C) toxicity of resistance-inducing drug was compared with toxicity of drug combination with I-CBP112 by resazurin assay. As previously, 2.5 μ M I-CBP112 was added for 72 h prior to drug. Data show mean \pm SEM. Two-way ANOVA was used to test the impact of I-CBP112 on drug cytotoxicity, whereas the difference between the effect of drug alone vs combination of drug and I-CBP112 was analyzed with Bonferroni posttests. In (B) and (D) the impact of I-CBP112 on caspase 3/7 cleavage caused by doxorubicin or paclitaxel, respectively, was visualized by western blot. Histone H3 served as the loading control. Heat-maps in (E) present cell viability measured by resazurin assay, where the intensification of drug cytotoxicity was compared between 2.5 μ M I-CBP112, 1 μ M ABCB1/ABCG2 inhibitor - Tariquidar and 25 μ M ABCC inhibitor - MK-571. Cells were incubated with drugs for 48 h, whereas CBP/EP300 bromodomain inhibitor was added for 72 h and iABC for 2 h prior to chemotherapeutics. Viability of untreated cells was assumed as 100%. (F) Differences in Annexin V fluorescence, which corresponds to the number of apoptotic cells, were visualized in 3D cultures of paclitaxel-resistant A549 cells exposed to I-CBP112, doxorubicin and doxorubicin combination with I-CBP112. Spheroids were exposed to two cycles of CBP/EP300 bromodomain inhibitor (2.5 μ M, 72 h prior to drug) and anthracycline (0.1 μ M, 48 h) in one week interval. Green fluorescence indicates Annexin V-positive cells (apoptotic), whereas DNA was stained in blue (DAPI). (G) Bars present mean intensity of green fluorescence that was quantified in acquired pictures of spheroid sections using Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems, Germany). (H) The size of spheroids was measured with Leica Application Suite X. Data are presented as mean \pm SEM. Results are shown as mean \pm SEM. Normal data distribution was checked with The Shapiro-Wilk test. For multiple sample comparison one-way ANOVA followed by Tukey's test were performed. Samples are marked with “*” when $P < 0.05$, otherwise are marked “ns”.

3.4. Lack of toxicity to normal cells and *in silico* estimation of I-CBP112 pharmacokinetics indicates promising features of I-CBP112 as a future drug candidate

Bearing in mind that I-CBP112 potentiates cytotoxicity of chemotherapeutics to drug resistant and non-resistant cancer cell lines, we tested the direct impact of I-CBP112 on primary and normal cells, as well as estimating its ADMET properties *in silico*. First, we checked the polarization mode of human monocyte-derived macrophages (MO), since these phagocytes play a crucial role during progression of cancer. Fig. 4A shows that I-CBP112 markedly elevated transcription of some pro-inflammatory mediators, such as *IL12A* and *iNOS*, while simultaneously dramatically repressing anti-inflammatory cytokines, including *TGF β 1*, *TGF β 2* and *IL10*. This suggests that CBP/EP300 bromodomain inhibitor favors anti-, rather than pro-tumoral polarization of macrophages. In cultures of blood CD14 + monocytes and CD4 + lymphocytes I-CBP112 showed no direct toxicity (Fig. 4B; Supplementary fig. S3K, Supplementary table), neither did it enhance drug toxicity towards these cells (with single exceptions) (Supplementary fig. S3L). The relative number of viable and dead cells was mostly comparable between cells incubated with drug-I-CBP112 combination and drug alone. Erythrocyte membrane integrity also remained unchanged after 24 h incubation with CBP/EP300 bromodomain inhibitor (Fig. 4C). Analysis of the viability of the human liver carcinoma cell line, HepG2, suggested the safety of I-CBP112 at concentrations of 2.5 μ M towards hepatocytes (Fig. 4D). Similarly, in cultures of human bronchial epithelial cells (HBEC), the tested compound did not reduce cell viability (Fig. 4E), whereas the slight decrease in metabolic activity of human foreskin fibroblasts (BJ) was not associated with increased caspase 3/7 activity (Fig. 4F; Supplementary fig. S3M; Supplementary table), thereby indicating its safety regarding the functioning of non-malignant cells.

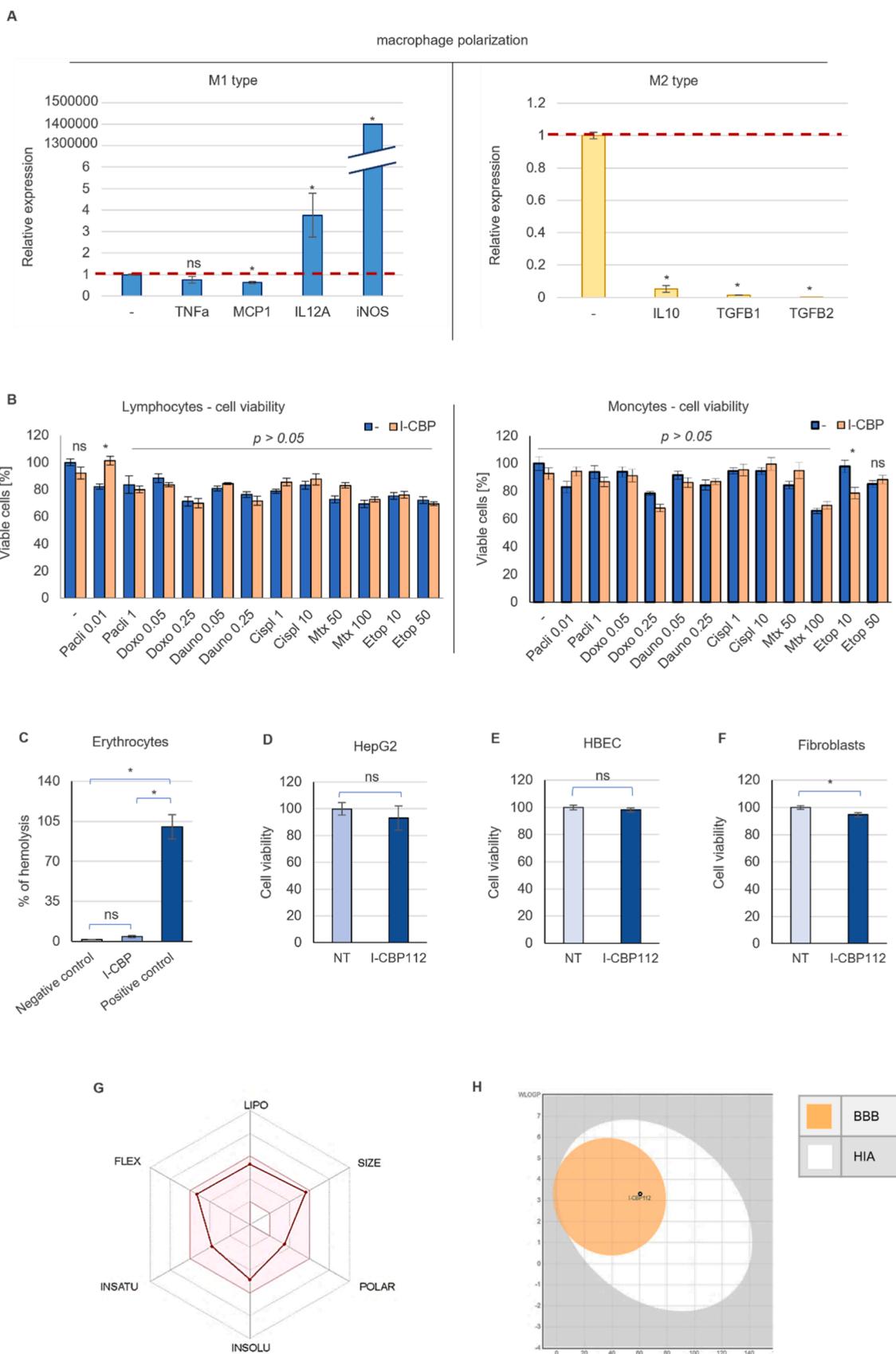
In the *in silico* ADMET assay, which measures the pharmacokinetic properties of the compound before further implementation to clinical trials, we tested absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity of I-CBP112 according to Lipinski's rule of five as well as its bioavailability (Table 1; Fig. 4G and H). CBP/EP300 bromodomain inhibitor had good water solubility, intake capacity (skin and Caco2 permeability) and relatively high intestinal absorption (Table 1). This compound fulfills the desired physicochemical space in the red colored zone of the bioavailability radar, which indicates good oral bioavailability and drug-likeness properties (Fig. 4G). These features include lipophilicity: XLOGP3 between –0.7 and +5.0, size: MW between 150 and 500 g/mol, polarity: TPSA between 20 and 130 Å², solubility: log S < 6, saturation: fraction of carbons in the sp³ hybridization not < 0.25 and flexibility: no more than 9 rotatable bonds. The BOILED-Egg model (Brain or Intestinal Estimated permeation method) predicts the gastrointestinal (GI) absorption and bloodbrain barrier (BBB) permeation of the compound (Fig. 4H). Estimation of I-CBP112 metabolism indicates CYP3A4-dependent conversion and possible elimination by hepatic and renal organic cation transporter 2 (OCT2) (Table 1). The toxicity profile indicated the lack of toxicity in the AMES test, lack of hepatotoxicity,

hERG potassium channel inhibition and skin sensitization (Table 1). The predicted Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL) indicates relatively high dose of 76.74 mg/kg_bw/day, whereas maximum tolerated dose in humans is assumed as 6.31 mg/kg/day. Administration intraperitoneally in mice at the dose of 3 mg/kg yielded moderate systemic exposure of the compound with a mean Cmax of 590 ng/ml [1.26 \pm 0.74 μ mol/L ($n = 3$)], whereas intravenous administration at the dose of 1.2 mg/kg revealed high blood clearance and moderate volume distribution [24].

This compound emerged as a good candidate for clinical trials due to the chemical and physical properties being orally bioavailable, as well as lack of substantial toxicity towards primary and non-malignant cells.

4. Discussion

Cancer drug resistance induced by chemotherapy has been assigned to numerous intracellular mechanisms and microenvironmental factors. For over 50 years one line of research on the acquisition of cell resistance to structurally unrelated drugs focuses on membrane ABC transporters since their overexpression in response to chemotherapeutics has been documented in *in vitro* and *in vivo* studies. Currently explanations for the increased ABC abundance include 2 opposing routes: nuclear receptors sensing by the respective compound, which leads to transcription activation, or Darwinian selection of sub-clones intrinsically overexpressing drug transporters [39]. The contribution of the first or second, or the mixture of both scenarios, may depend on the dose of the chemotherapeutics. In our model of acquired drug resistance to doxorubicin, cisplatin and paclitaxel, we used the dose equivalent of IC50, hence transcriptional induction is very probable. Paclitaxel or cisplatin increased ABCB1 expression and PXR-mediated transcription through the ABCB1 promoter in ovarian cancer cells [40], whereas doxorubicin did not significantly affect PXR-mediated induction of P-gp in breast cancer cells (MCF-7), and the resistance seen was assigned to transient activation of the NF κ B pathway [41]. Our approach to generate drug resistant phenotypes led to considerable overexpression of ABCB1 and ABCC10 in all cell lines, whereas ABCC1 was markedly increased only in response to cisplatin in the A549 cell line. This suggests a certain selectivity in ABCC1 transcriptional activation. Expression of other ABCC subfamily members varied among cell lines and resistance-inducing drugs. Interestingly, expression of our previously described ABCC3 gene, characterized by the occurrence of promoter-bound COREST repressive complex in A549 cells and lack of response to cisplatin, also did not change after cell exposure to paclitaxel, but increased in response to doxorubicin in MDA-MB-231 cells. Anthracycline resistant phenotype was featured by overexpression of the widest range of ABCC transporters, thereby indicating the induction of numerous chemopreventing signaling pathways, which lead to chromatin remodeling. A recent study on doxorubicin-resistant MCF7 (MCF7-DR) cells indicated 11,686 increased chromatin-accessible regions associated with regulation of cell cycle, regulation of the actin cytoskeleton, signaling pathways of MAPK, PI3K/Akt and Hippo, as well as strong downregulation of factors, such as HDAC2, EZH2, PRMT5 that



(caption on next page)

Fig. 4. The evaluation safety and *in silico* pharmacokinetics suggests beneficial features of I-CBP112 for further implementation in clinical settings. (A) The mRNA level of macrophage polarization markers *MCP1*, *TNF α* , *IL12A*, *iNOS*, *TGF β 1*, *TGF β 2* and *IL10* was quantified by real-time PCR. Data in bars represent mean value of gene transcription normalized to housekeeping genes (GAPDH, HPRT) \pm SEM, and the gene transcription in untreated cells was assumed as 1. (B) The impact of 72 h preincubation of human blood-derived monocytes and lymphocytes with 2.5 μ M I-CBP112 on cytotoxicity of chemotherapeutics added for 24 h was measured with the ApoTox-Glo GF-AFC substrate. (C) The impact of 24 h incubation of freshly isolated human red blood cells with 2.5 μ M I-CBP112 on their hemolysis was quantified by spectrophotometric measurement of relative hemoglobin release. DMSO was used as a negative control, whereas erythrocytes lysed with 10% TritonX100 served as positive control. (D, E, F) For hepatotoxicity study and estimation of direct toxicity to primary cells, 2.5 μ M I-CBP112 was added to the culture of HepG2 (human hepatocarcinoma; D), human bronchial epithelial cells (HBEC; E) and normal foreskin fibroblasts (BJ; F) for 72 h and cell viability was measured with resazurin assay. Metabolic activity of I-CBP112 untreated cells was assumed as 100%. (G) The localization of I-CBP112 in the red zone of bioavailability radar of six desired features confirms its drug-likeness. The pink area represents the optimal range for six considered properties. (H) The BOILED-Egg model (Brain or Intestinal Estimated permeation method) predicts the passive gastrointestinal absorption (HIA; white region) and blood-brain barrier (BBB) permeation (yellow region) of the studied compound. Bars in (A) – (F) present mean \pm SEM. For analysis of normality, the Kolmogorov-Smirnov test was chosen. The difference between two samples was checked with the Mann-Whitney test in datasets with non-Gaussian distribution (Fig. 4A), whereas the unpaired t-test was chosen for data that passed normality test (Fig. 4A; Fig. 4C-4 F). D'Agostino & Pearson normality test followed by Bonferroni posttests were performed for multiple comparisons (Fig. 4B).

Table 1

ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity) properties of I-CBP112. ADMET properties were tested *in silico* using SwissADME and pkCSM online tools. Expected versus observed features of I-CBP112 are shown in table.

ADMET Properties of I-CBP112			
		Expected Results	Observed Results
Drug likeness	Violation of Lipinski	No	No
	Bioavailability score	0.55–0.85	0.55
Absorption	Water solubility	log K _p > -2.5	-4.914
	Caco2 permeability	log Papp > 0.90	1.241
	Intestinal absorption (human)	Above 30%	94.626
	Skin permeability	Log K _p > -2.5	-2.827
Metabolism	CYP2D6 substrate	No	No
	CYP3A4 substrate	No	Yes
	CYP1A2 inhibitor	No	No
	CYP2C19 inhibitor	No	No
	CYP2C9 inhibitor	No	No
Excretion	Total Clearance	Higher is good	0.671
	Renal OCT2 substrate	Yes	Yes
Toxicity	AMES toxicity	No	No
	Hepatotoxicity	No	No
	hERG I inhibitors	No	No
	Skin Sensitisation	No	No
Additional information	IC50	CBP - 170 nM EP300 - 625 nM	
	Max. tolerated dose (human) (log mg/kg/day)	0.8 mg/kg	
	Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL) (mg/kg_bw/day)	76.736	

contribute to gene silencing [42].

Our previous study described EP300 as transcription co-activator of ABCC genes, which are overexpressed in cisplatin-resistant A549 and MDA-MB-231 cells [23]. This protein belongs to a group of histone acetyltransferases characterized by the presence of a bromodomain, which recognizes acetylated histones and recruit components of the machinery needed to regulate gene transcription. A bit different types of compounds - Bromodomain and Extra-Terminal motif (BET) inhibitors - are promising targets for anti-cancer therapies due to repression of numerous oncogenes [43,44]. For example, JQ1 decreases the transcription of c-Myc, which is responsible for the development of many cancer types, including myeloma and ovarian cancer [45,46]. A study by Bagratuni et al. [47] proved evidence on the beneficial effects of JQ1 in combination with cisplatin, which sensitized cells to alkylating drug and significantly suppressed the proliferation of platinum-resistant ovarian cancer cells. We observed a similar effect when combining CBP/EP300 bromodomain inhibitor with a wide range of anticancer drugs. I-CBP112 substantially declined the IC50 values of chemotherapeutics, as well as transcription of ABC genes, such as *ABCC1*, *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC5* and *ABCC10*, thereby increasing drug concentration inside A549,

MDA-MB-231 and HepG2 cells [26]. Moreover, I-CBP112 proved potent in enhancing chemotherapeutic drug toxicity in cultures of drug resistant A549 and MDA-MB-231 cells. As expected, it decreased EP300-dependent overexpression of *ABCC10* in cisplatin-resistant NSCLC, but also other *ABC* genes that were transcriptionally activated in response to multiple doses of chemotherapeutics. Importantly, CBP/EP300 repressed *ABC* genes regardless of the drug, which was used for the induction of multidrug resistance, but was most efficient in cultures of paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer. This also suggests that EP300 may be responsible for the overexpression of *ABC* genes and, at least partially, for multidrug resistance in some drug resistant phenotypes. This hypothesis is further supported by the fact that this enzyme has been documented as a transcriptional cofactor of PXR, AhR and NF κ B, as well as numerous other transcription factors involved in response to cytotoxic agents [48–51].

The enzymatic activity of *ABC* transporters prompted an intense search for toxicity-free and effective *ABC* protein inhibitors that could be used in combination with standard chemotherapeutic anticancer drugs to augment their therapeutic efficacy. Three generations of ABCB1, ABCG2 and ABCC subfamily inhibitors have been developed, the most frequently referred examples being: Verapamil - a first-generation ABCB1 and ABCC1 inhibitor, Cyclosporin A - ABCB1, ABCC1 and ABCG2 also first-generation inhibitor, Ko143 - a non-specific ABCG2 inhibitor of second generation, Tariquidar and Elacridar belonging to the third generation of ABCB1 and ABCG2 inhibitors [22]. However, the adverse events of potentially life-threatening severity, high toxicity to healthy cells, drug-drug interactions and the lack of prolongation of the overall survival of patients has led to termination of many clinical trials. The high mutation rate of *ABC* transporters and possible alteration in their inhibitor selectivity further limit the possible clinical application of *ABC* inhibitors. Furthermore, our study provided evidence on the need of simultaneous inhibition of several *ABC* transporters simultaneously to achieve considerable increase in drug accumulation in drug-resistant cancer phenotypes, which in our cells were characterized by overexpression of more than one *ABC* gene functionally involved to multidrug resistance. Hence, inhibition of *ABC* transcription seems to overcome at least some of the aforementioned problems. The potency of CBP/EP300 bromodomain inhibitor in repression of *ABC* gene transcription has been experimentally confirmed in all the cell lines with the gained multidrug resistance. Moreover, I-CBP112 may have a potency to directly inhibit, at least some, of *ABC* proteins even further potentiating its impact on *ABC*-dependent drug efflux from cells, but such an activity must be first confirmed experimentally. Furthermore, the efficacy of I-CBP112 to potentiate cytotoxicity of a wide range of structurally unrelated chemotherapeutics reached, even surpassed, the activity of *ABC* inhibitors under certain conditions. Importantly, this compound remained non-toxic to primary cell lines or blood-derived cells that were tested, neither did it considerably impact the viability of monocytes and lymphocytes exposed to chemotherapeutics. The promising ADMET profile and confirmed lack of direct hepatotoxicity in HepG2 cells suggests I-CBP112 might be a candidate for further testing in animal and

preclinical models. In particular, this is when other bromodomain (BRD) and extra-terminal domain (BET) inhibitors have been tested in clinical trials. Some examples include the following BRD inhibitors: Birabresib (NCT01713582), PLX51107 (NCT04022785) and BET inhibitors: FT-1101 (NCT02543879), ZEN003694 (NCT02711956, NCT02705469), CPI-0610 (NCT01949883, NCT02157636). Future clinical trials including the use of dual BET and CBP/p300 Inhibitor - NEO2734 (NCT05488548) have also been planned [52].

One more possible beneficial feature of I-CBP112 is direct pro-inflammatory polarization of macrophages and strong repression of anti-inflammatory factors, since the subset of M2-polarized macrophages (commonly named tumor-associated macrophages, TAMs), contributes to many pro-tumorigenic outcomes. These include regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis, further immune suppression, induction of hypoxia, favoring tumor cell proliferation and metastases [53], as well as resistance to anti-cancer therapies, such as immune checkpoint blockade (ICB) by inducing expression of high levels of PD-L2, but not PD-L1, in cancer cells to escape anti-PD-1 targeted therapies [54]. Targeting TAM repolarization to the M1 pro-inflammatory phenotype has been considered as a new strategy for cancer therapy. Therefore, simultaneous polarization of infiltrating macrophages to the pro-inflammatory phenotype, or ideally repolarization M2 phagocytes already residing in tumor microenvironment, followed by cancer cell sensitization to chemotherapeutics, appears an advantageous scenario in anticancer strategies. Further study is needed to provide rational evidence on the possible impact of I-CBP112 on macrophage polarization profiles in the presence of a tumor and, particularly, chemotherapy-treated cancer cells.

In summary, I-CBP112 may provide some advantage over ABC inhibitors in combination with standard chemotherapeutics for at least 3 reasons: (a) it represses ABC expression at the (epi)genomic level and decreases the occurrence of transporters in cellular membranes, (b) it remains non-toxic to a wide range of primary and blood-derived cells, and has a favorable pharmacokinetic profile, and (c) it directly polarizes M0 macrophages into anti-tumor pro-inflammatory phenotype while simultaneously strongly repressing M2 markers.

Conclusions

The proposed therapeutic approach, which includes the combination of doxorubicin, daunorubicin or paclitaxel with I-CBP112, provides potential for overcoming multidrug resistance in tumors. Further studies are needed to test any possible beneficial impact of CBP/EP300 inhibitor on cytotoxicity of other drugs and on other cancer types.

CRediT authorship contribution statement

Magdalena Strachowska: Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft Preparation, Writing – review & editing, Visualization. **Agnieszka Robaszkiewicz:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing – original draft preparation, Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Karolina Gronkowska:** Formal analysis, Investigation. **Maciej Sobczak:** Formal analysis, Investigation. **Marika Grodzicka:** Formal analysis, Investigation. **Sylwia Michlewska:** Formal analysis, Visualization. **Kinga Kołacz:** Investigation. **Tuhin Sarkar:** Data Curation. **Joanna Korszun:** Investigation. **Maksim Ionov:** Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

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

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.bioph.2023.115798.

References

- [1] American Cancer Society, Cancer Facts & Figures 2022. (<https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2022.html>) (Accessed January 27, 2023).
- [2] R. Hertz, M.C. Li, D.B. Spencer, Effect of methotrexate therapy upon choriocarcinoma and chorioadenoma, Proc. Soc. Exp. Biol. Med 93 (1956) 361–366, <https://doi.org/10.3181/00379727-93-22757>.
- [3] American Cancer Society, Information and Resources about for Cancer: Breast, Colon, Lung, Prostate, Skin. (<https://www.cancer.org/>) (Accessed 27 January 2023).
- [4] K. Bukowski, M. Kciuk, R. Kontek, Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy, IJMS 21 (2020) 3233, <https://doi.org/10.3390/ijms21093233>.
- [5] X. Wang, H. Zhang, X. Chen, Drug resistance and combating drug resistance in cancer, CDR (2019), <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.10>.
- [6] S.G. Creemers, P.M. van Koetsveld, W.W. De Herder, F. Dogan, G.J.H. Franssen, R. A. Feelders, L.J. Hofland, MDR1 inhibition increases sensitivity to doxorubicin and etoposide in adrenocortical cancer, Endocr. -Relat. Cancer 26 (2019) 367–378, <https://doi.org/10.1530/ERC-18-0500>.
- [7] W. Yin, D. Xiang, T. Wang, Y. Zhang, C.V. Pham, S. Zhou, G. Jiang, Y. Hou, Y. Zhu, Y. Han, L. Qiao, P.H.-L. Tran, W. Duan, The inhibition of ABCB1/MDR1 or ABCG2/BCRP enables doxorubicin to eliminate liver cancer stem cells, Sci. Rep. 11 (2021), 10791, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89931-9>.
- [8] T.S. Lima, L.O. Souza, D. Iglesias-Gato, J. Elversang, F.S. Jørgensen, T. Kallunki, M. A. Røder, K. Brasso, J.M.A. Moreira, Itraconazole reverts abcb1-mediated docetaxel resistance in prostate cancer, Front. Pharmacol. 13 (2022), 869461, <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.869461>.
- [9] Z. Duan, K.A. Brakora, M.V. Seiden, Inhibition of ABCB1 (MDR1) and ABCB4 (MDR3) expression by small interfering RNA and reversal of paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells, Mol. Cancer Ther. (2004).
- [10] M.B. Duz, O.F. Karatas, Differential expression of ABCB1, ABCG2, and KLF4 as putative indicators for paclitaxel resistance in human epithelial type 2 cells, Mol. Biol. Rep. 48 (2021) 1393–1400, <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06167-6>.
- [11] H. Xiao, Y. Zheng, L. Ma, L. Tian, Q. Sun, Clinically-relevant abc transporter for anti-cancer drug resistance, Front. Pharmacol. 12 (2021), 648407, <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.648407>.
- [12] Y. Chen, H. Zhou, S. Yang, D. Su, Increased ABCG2 expression predicts cisplatin resistance in non-small cell lung cancer, Cell Biochem Funct. 39 (2021) 277–286, <https://doi.org/10.1002/cbf.3577>.
- [13] J.A. Sprowl, V. Gregorc, C. Lazzari, R.H. Mathijssen, W.J. Loos, A. Sparreboom, Associations between ABCC2 polymorphisms and cisplatin disposition and efficacy, Clin. Pharm. Ther. 91 (2012) 1022–1026, <https://doi.org/10.1038/clpt.2011.330>.
- [14] M. Kato, Y. Tsurudome, T. Kanemitsu, S. Yasukochi, Y. Kanado, T. Ogino, N. Matsunaga, S. Koyanagi, S. Ohdo, Diurnal expression of MRP4 in bone marrow cells underlies the dosing-time dependent changes in the oxaliplatin-induced myelotoxicity, Sci. Rep. 10 (2020), 13484, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70321-6>.
- [15] S. Pratt, R.L. Shepard, R.A. Kandasamy, P.A. Johnston, W. Perry, A.H. Dantzig, The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites, Mol. Cancer Ther. 4 (2005) 855–863, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-04-0291>.
- [16] B. Guo, D.J. Villeneuve, S.L. Hembrough, A.F. Kirwan, D.E. Blais, M. Bonin, A. M. Parisenti, Cross-resistance studies of isogenic drug-resistant breast tumor cell lines support recent clinical evidence suggesting that sensitivity to paclitaxel may be strongly compromised by prior doxorubicin exposure, Breast Cancer Res Treat. 85 (2004) 31–51, <https://doi.org/10.1023/B:BREA.0000021046.29834.12>.
- [17] A.M. Calcagno, J.M. Fostel, K.K.W. To, C.D. Salcido, S.E. Martin, K.J. Chewning, C.-P. Wu, L. Varticovski, S.E. Bates, N.J. Caplen, S.V. Ambudkar, Single-step doxorubicin-selected cancer cells overexpress the ABCG2 drug transporter through epigenetic changes, Br. J. Cancer 98 (2008) 1515–1524, <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604334>.
- [18] A.M. Calcagno, S.V. Ambudkar, Molecular mechanisms of drug resistance in single-step and multi-step drug-selected cancer cells, in: J. Zhou (Ed.), Multi-Drug Resistance in Cancer, Humana Press, Totowa, NJ, 2010, pp. 77–93, <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-416-5>.
- [19] M. Omori, R. Noro, M. Seike, K. Matsuda, M. Hirao, A. Fukuzumi, N. Takano, A. Miyanaga, A. Gemma, Inhibitors of ABCB1 and ABCG2 overcame resistance to topoisomerase inhibitors in small cell lung cancer, Thorac. Cancer 13 (2022) 2142–2151, <https://doi.org/10.1111/1759-7714.14527>.
- [20] J.-I. Lai, Y.-J. Tseng, M.-H. Chen, C.-Y.F. Huang, P.M.-H. Chang, Clinical perspective of FDA approved drugs with P-glycoprotein inhibition activities for

- potential cancer therapeutics, *Front. Oncol.* 10 (2020), 561936, <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.561936>.
- [21] G. Szakacs, J.K. Paterson, J.A. Ludwig, C. Booth-Genthe, M.M. Gottesman, Targeting multidrug resistance in cancer, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 219–234, <https://doi.org/10.1038/nrd1984>.
- [22] A. Tamaki, C. Ierano, G. Szakacs, R.W. Robey, S.E. Bates, The controversial role of ABC transporters in clinical oncology, *Essays Biochem.* 50 (2011) 209–232, <https://doi.org/10.1042/bse0500209>.
- [23] M. Sobczak, M. Strachowska, K. Gronkowska, A. Robaszkiewicz, Activation of ABCC genes by cisplatin depends on the CoREST occurrence at their promoters in A549 and MDA-MB-231 cell lines, *Cancers* 14 (2022) 894, <https://doi.org/10.3390/cancers14040894>.
- [24] S. Picaud, O. Fedorov, A. Thanasopoulou, K. Leonards, K. Jones, J. Meier, H. Olzscha, O. Monteiro, S. Martin, M. Philpott, A. Tumber, P. Filippakopoulos, C. Yapp, C. Wells, K.H. Che, A. Bannister, S. Robson, U. Kumar, N. Parr, K. Lee, D. Lugo, P. Jeffrey, S. Taylor, M.L. Vecellio, C. Bountra, P.E. Brennan, A. O'Mahony, S. Velichko, S. Müller, D. Hay, D.L. Daniels, M. Urh, N.B. La Thangue, T. Kouzarides, R. Prinjha, J. Schwaller, S. Knapp, Generation of a selective small molecule inhibitor of the CBP/p300 bromodomain for leukemia therapy, *Cancer Res.* 75 (2015) 5106–5119, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0236>.
- [25] B.E. Zucconi, B. Luef, W. Xu, R.A. Henry, I.M. Nodelman, G.D. Bowman, A. J. Andrews, P.A. Cole, Modulation of p300/CBP acetylation of nucleosomes by bromodomain ligand I-CBP112, *Biochemistry* 55 (2016) 3727–3734, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00480>.
- [26] M. Strachowska, K. Gronkowska, S. Michlewska, A. Robaszkiewicz, CBP/p300 Bromodomain inhibitor—I-CBP112 declines transcription of the key abc transporters and sensitizes cancer cells to chemotherapy drugs, *Cancers* 13 (2021) 4614, <https://doi.org/10.3390/cancers13184614>.
- [27] M.D. Wild, U.K. Walle, T. Walle, Extensive and saturable accumulation of paclitaxel by the human platelet, *Chemother. Pharm.* 36 (1995) 41–44, <https://doi.org/10.1007/BF00685730>.
- [28] J. Zhu, Y. Zheng, H. Zhang, J. Zhu, H. Sun, Low concentration of chloroquine enhanced efficacy of cisplatin in the treatment of human ovarian cancer dependent on autophagy, *Am. J. Transl. Res.* 9 (2017) 4046–4058. PMID: 28979680; PMCID: PMC5622249.
- [29] Electronic Medicines Compendium, Doxorubicin Solution for Injection - Summary of Product Characteristics (SmPC) - (emc). (<https://www.medicines.org.uk/emc/product/6184/smpc#gref>) (Accessed December 30, 2022).
- [30] Promega, ApoTox-GloTM Triplex Assay Protocol. (<https://pl.promega.com/en/resources/protocols/technical-manuals/101/apotox-glo-triplex-assay-protocol/>) (Accessed November 21, 2022).
- [31] M.M. Lee, Z. Gao, B.R. Peterson, Synthesis of a fluorescent analogue of paclitaxel that selectively binds microtubules and sensitively detects efflux by p-glycoprotein, *Angew. Chem. Int. Ed.* 56 (2017) 6927–6931, <https://doi.org/10.1002/anie.201703298>.
- [32] Y. Liu, X. Yang, J. Gan, S. Chen, Z.-X. Xiao, Y. Cao, CB-Dock2: improved protein-ligand blind docking by integrating cavity detection, docking and homologous template fitting, *Nucleic Acids Res.* 50 (2022) W159–W164, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac394>.
- [33] X. Yang, Y. Liu, J. Gan, Z.-X. Xiao, Y. Cao, FitDock: protein-ligand docking by template fitting, *Brief. Bioinforma.* 23 (2022), bbac087, <https://doi.org/10.1093/bbacommon/bbac087>.
- [34] K. Tunyasuvunakool, J. Adler, Z. Wu, T. Green, M. Zielinski, A. Žídek, A. Bridgland, A. Cowie, C. Meyer, A. Laydon, S. Velankar, G.J. Kleywegt, A. Bateman, R. Evans, A. Pritzel, M. Figurnov, O. Ronneberger, R. Bates, S.A.A. Kohl, A. Potapenko, A. J. Ballard, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, E. Clancy, D. Reiman, S. Petersen, A.W. Senior, K. Kavukcuoglu, E. Birney, P. Kohli, J. Jumper, D. Hassabis, Highly accurate protein structure prediction for the human proteome, *Nature* 596 (2021) 590–596, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03828-1>.
- [35] M. Varadi, S. Anyango, M. Deshpande, S. Nair, C. Natassia, G. Yordanova, D. Yuan, O. Stroe, G. Wood, A. Laydon, A. Žídek, T. Green, K. Tunyasuvunakool, S. Petersen, J. Jumper, E. Clancy, R. Green, A. Vora, M. Lutfi, M. Figurnov, A. Cowie, N. Hobbs, P. Kohli, G. Kleywegt, E. Birney, D. Hassabis, S. Velankar, AlphaFold protein structure database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models, *Nucleic Acids Res.* 50 (2022) D439–D444, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>.
- [36] J. Pietrzak, T. Płoszaj, Ł. Pułaski, A. Robaszkiewicz, EP300-HDAC1-SWI/SNF functional unit defines transcription of some DNA repair enzymes during differentiation of human macrophages, *Biochim. Et. Biophys. Acta (BBA) - Gene Regul. Mech.* 1862 (2019) 198–208, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.10.019>.
- [37] J. Kowal, D. Ni, S.M. Jackson, I. Manolaridis, H. Stahlberg, K.P. Locher, Structural basis of drug recognition by the multidrug transporter ABCG2, *J. Mol. Biol.* 433 (2021), 166980, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166980>.
- [38] A. Luginina, A. Gusach, E. Marin, A. Mishin, R. Brouillette, P. Popov, A. Shiriaeva, É. Besserer-Offroy, J.-M. Longpré, E. Lyapina, A. Ishchenko, N. Patel, V. Polovinkin, N. Safranova, A. Bogorodskiy, E. Edelweiss, H. Hu, U. Weierstall, W. Liu, A. Batyuk, V. Gordeliy, G.W. Han, P. Sarret, V. Katrich, V. Borshchevskiy, V. Cherezov, Structure-based mechanism of cysteinyl leukotriene receptor inhibition by antiasthmatic drugs, *Sci. Adv.* 5 (2019), eaax2518, <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax2518>.
- [39] D. Theile, P. Wizgal, Acquired ABC-transporter overexpression in cancer cells: transcriptional induction or Darwinian selection? *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharm.* 394 (2021) 1621–1632, <https://doi.org/10.1007/s00210-021-02112-3>.
- [40] H. Masuyama, K. Nakamura, E. Nobumoto, Y. Hiramatsu, Inhibition of pregnane X receptor pathway contributes to the cell growth inhibition and apoptosis of anticancer agents in ovarian cancer cells, *Int. J. Oncol.* 49 (2016) 1211–1220, <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3611>.
- [41] F. Xu, F. Wang, T. Yang, Y. Sheng, T. Zhong, Y. Chen, Differential drug resistance acquisition to doxorubicin and paclitaxel in breast cancer cells, *Cancer Cell Int* 14 (2014), 538, <https://doi.org/10.1186/s12935-014-0142-4>.
- [42] X. Wang, J. Yan, B. Shen, G. Wei, Integrated chromatin accessibility and transcriptome landscapes of doxorubicin-resistant breast cancer cells, *Front. Cell Dev. Biol.* 9 (2021), 708066, <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.708066>.
- [43] H.-Y. Sun, S.-T. Du, Y.-Y. Li, G.-T. Deng, F.-R. Zeng, Bromodomains and extra-terminal inhibitors emerge as potential therapeutic avenues for gastrointestinal cancers, *WJGO* 14 (2022) 75–89, <https://doi.org/10.4251/wjgo.v14.i1.75>.
- [44] T. Shorstova, W.D. Foulkes, M. Witcher, Achieving clinical success with BET inhibitors as anti-cancer agents, *Br. J. Cancer* 124 (2021) 1478–1490, <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01321-0>.
- [45] P. Filippakopoulos, J. Qi, S. Picaud, Y. Shen, W.B. Smith, O. Fedorov, E.M. Morse, T. Keates, T.T. Hickman, I. Felletar, M. Philpott, S. Munro, M.R. McKeown, Y. Wang, A.L. Christie, N. West, M.J. Cameron, B. Schwartz, T.D. Heightman, N. La Thangue, C.A. French, O. Wiest, A.L. Kung, S. Knapp, J.E. Bradner, Selective inhibition of BET bromodomains, *Nature* 468 (2010) 1067–1073, <https://doi.org/10.1038/nature09504>.
- [46] H. Qiu, A.L. Jackson, J.E. Kilgore, Y. Zhong, L.L.-Y. Chan, P.A. Gehrig, C. Zhou, V. L. Bae-Jump, JQ1 suppresses tumor growth through downregulating LDHA in ovarian cancer, *Oncotarget* 6 (2015) 6915–6930, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3126>.
- [47] T. Bagratuni, N. Mavrianou, N.G. Gavalas, K. Tzannis, C. Arapinis, M. Liantos, M. I. Christodoulou, N. Thomakos, D. Haidopoulos, A. Rodolakis, E. Kastritis, A. Scorilas, M.A. Dimopoulos, A. Bamias, JQ1 inhibits tumour growth in combination with cisplatin and suppresses JAK/STAT signalling pathway in ovarian cancer, *Eur. J. Cancer* 126 (2020) 125–135, <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.11.017>.
- [48] L. Yan, Y. Wang, J. Liu, Y. Nie, X. Zhong, Q. Kan, L. Zhang, Alterations of histone modifications contribute to pregnane x receptor-mediated induction of CYP3A4 by rifampicin, *Mol. Pharm.* 92 (2017) 113–123, <https://doi.org/10.1124/mol.117.108225>.
- [49] S.P. Mukherjee, M. Behar, H.A. Birnbaum, A. Hoffmann, P.E. Wright, G. Ghosh, Analysis of the RelA:CBP/p300 interaction reveals its involvement in NF-κB-driven transcription, *PLoS Biol.* 11 (2013), e1001647, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001647>.
- [50] Y. Zhou, I.N. Bastian, M.D. Long, M. Dow, W. Li, T. Liu, R.K. Ngu, L. Antonucci, J. Y. Huang, Q.T. Phung, X. Zhao, S. Banerjee, X.-J. Lin, H. Wang, B. Dang, S. Choi, D. Karin, H. Su, M.H. Ellisman, C. Jamieson, M. Bosenberg, Z. Cheng, J. Haybaeck, L. Kenner, K.M. Fisch, R. Bourgon, G. Hernandez, J.R. Lill, S. Liu, H. Carter, I. Mellman, M. Karin, S. Shalapour, Activation of NF-κB and p300/CBP potentiates cancer chemoimmunotherapy through induction of MHC-I antigen presentation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118 (2021), e2025840118, <https://doi.org/10.1073/pnas.2025840118>.
- [51] A. Kobayashi, K. Numayama-Tsuruta, K. Sogawa, Y. Fujii-Kuriyama, CBP/p300 functions as a possible transcriptional coactivator of ah receptor nuclear translocator (Arnt), *J. Biochem.* 122 (1997) 703–710, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021812>.
- [52] Clinical Trials, Home - ClinicalTrials.gov. (<https://clinicaltrials.gov/>) (Accessed February 19, 2023).
- [53] A.J. Boutlier, S.F. Elsawa, Macrophage polarization states in the tumor microenvironment, *IJMS* 22 (2021) 6995, <https://doi.org/10.3390/ijms22136995>.
- [54] J. Gao, Y. Liang, L. Wang, Shaping polarization of tumor-associated macrophages in cancer immunotherapy, *Front. Immunol.* 13 (2022), 888713, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.888713>.



Characteristics of anticancer activity of CBP/p300 inhibitors – Features of their classes, intracellular targets and future perspectives of their application in cancer treatment



Magdalena Strachowska ^{a,b,1}, Agnieszka Robaszkiewicz ^{a,c,*}

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

^b University of Lodz, Bio-Med-Chem Doctoral School of the University of Lodz and Lodz Institutes of the Polish Academy of Sciences, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland

^c Johns Hopkins University School of Medicine, Institute of Fundamental and Basic Research, 600 5th Street South, Saint Petersburg FL33701, United States of America

ARTICLE INFO

Available online 22 March 2024

Associate editor: Beverly Teicher

Keywords:

CREB-binding protein/histone acetyltransferase p300 (CBP/p300) bromodomain inhibitors CREB-binding protein/p300 histone acetyltransferase (HAT) inhibitors Dual inhibitors of CREB-binding protein/histone acetyltransferase p300 (CBP/p300) Off-target prediction Molecular docking Absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET)

ABSTRACT

Due to the contribution of highly homologous acetyltransferases CBP and p300 to transcription elevation of oncogenes and other cancer promoting factors, these enzymes emerge as possible epigenetic targets of anticancer therapy. Extensive efforts in search for small molecule inhibitors led to development of compounds targeting histone acetyltransferase catalytic domain or chromatin-interacting bromodomain of CBP/p300, as well as dual BET and CBP/p300 inhibitors. The promising anticancer efficacy in *in vitro* and mice models led CCS1477 and NEO2734 to clinical trials. However, none of the described inhibitors is perfectly specific to CBP/p300 since they share similarity of a key functional domains with other enzymes, which are critically associated with cancer progression and their antagonists demonstrate remarkable clinical efficacy in cancer therapy. Therefore, we revise the possible and clinically relevant off-targets of CBP/p300 inhibitors that can be blocked simultaneously with CBP/p300 thereby improving the anticancer potential of CBP/p300 inhibitors and pharmacokinetic predicting data such as absorption, distribution, metabolism, excretion (ADME) and toxicity.

© 2024 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Abbreviations: 5-HT6R, serotonin type 6 receptor; ABC, ATP-binding cassette; ABL, Abelson murine leukemia viral oncogene homolog; ADMET, absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity; ALK, anaplastic lymphoma kinase; AML, Acute myeloid leukemia; ATF2, cyclic AMP-dependent transcription factor; BACE, β-site APP cleaving enzyme; Bax, Bcl-2-associated X protein; Bcl-2, B-cell lymphoma 2; BCRP, breast cancer resistance protein; BD, bromodomain; BET, Bromodomain and Extra-Terminal motif; BRAF, v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; BRG1, Brahma related gene 1; CBP, (CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein) binding protein (CREBBP/KAT3A)); CCNA1, Cyclin-A1; CCND1, Cyclin D1; CCR2, C-C chemokine receptor type 2; CDK1, Cyclin-dependent kinase 1; CDK2, Cyclin-dependent kinase 2; CH, cysteine and histidine rich regions; c-Met, mesenchymal–epithelial transition factor; CML, chronic myeloid leukemia; CoA, coenzyme A; cSCC, Cutaneous squamous cell carcinoma; CTP, cytosine triphosphate; CXCL1, C-X-C Motif Chemokine Ligand 1; CYP, Cytochrome P450; DHODH, dihydroorotate dehydrogenase; dUMP, deoxyuridine monophosphate; EDG-3, Endothelial cell differentiation gene-3; EGFR, epidermal growth factor receptor; EMT, epithelial–mesenchymal transition; ERK2, extracellular signal-regulated kinase 2; FDA, Food and Drug Administration; FGFR, fibroblast growth factor receptors; FOXP3, forkhead box protein 3; GATA-4, GATA Binding Protein 4; GCN5, General control non-depressible 5; HAT, histone acetyltransferase; HERG, The human Ether-à-go-go-Related Gene; HSP, heat-shock protein; iPSCs, Induced pluripotent stem cells; IRF, Interferon regulatory factor; JAK-STAT, Janus kinase/signal transducers and activators of transcription; KIF5B, kinesin family member 5B; KIX, CREB binding domain; KRAS, Kirsten rat sarcoma virus; LOAEL, Lowest-observed-adverse-effect level; LXR α , Liver X Receptor Alpha; LXR β , Liver X Receptor Beta; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; MDM2, murine double minute 2; MDS, myelodysplastic syndromes; MMP, Matrix Metalloproteinase; MNK, MAPK-interacting serine/threonine kinase; MRTD, maximum recommended tolerated dose; mTOR, Mammalian target of rapamycin; NMC, NUT midline carcinoma; NUT, Nuclear protein in testis; p300, adenovirus E1A-associated 300-kD protein/KAT3B; PAR-1, Protease Activated Receptor 1; PARP, Poly (ADP-ribose) polymerase; PC, Prostate cancer; PCAF, p300/CBP Associated Factor; PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; PFK-2/FBPase-2, Phosphofructokinase-2 (6-phosphofructo-2-kinase, PFK-2)/fructose bisphosphatase-2 (FBPase-2); PHD, Plant Homeodomain; PI3K, Phosphoinositide 3-kinases; PPI, Protein-protein interactions; PTEN, Phosphatase and tensin homolog; QP, glutamine- and proline-rich domain; RAF, Rapidly Accelerated Fibrosarcoma; RET, rearranged during transfection; RID, receptor interaction domain; RING, Really Interesting New Gene; RSK, p90 ribosomal S6 kinase; S1PR3, Sphingosine-1-phosphate receptor 3; SGLT1, Sodium/GLucose coTransporter 1; SID, steroid receptor co-activator-1 interaction domain; SMILES, Simplified Molecular Input Line Entry System; SMYD2, SET and MYND domain-containing protein 2; SPOP, Speckle-type POZ (pox virus and zinc finger protein) protein; SUMO, Small Ubiquitin-like Modifier; SWI/SNF, SWItch/Sucrose Non-Fermentable; TAM, tumor-associated macrophages; TBP, TATA binding protein; TP53, Tumor protein P53; tPSA, topological polar surface area; VEGFR, Vascular Endothelial Growth Factor; WlogP, water partition coefficient.

* Corresponding author at: Department of General Biophysics, Pomorska St. 141/143, 90-236 Lodz, Poland.

E-mail addresses: magdalena.strachowska@edu.uni.lodz.pl (M. Strachowska), agnieszka.robaszkiewicz@biol.uni.lodz.pl, arobasz1@jh.edu (A. Robaszkiewicz).

¹ Postal address: Department of General Biophysics, Pomorska St. 141/143, 90-236 Lodz, Poland.

Contents

1. Introduction	2
2. Structure of CBP/p300 and its biological role	2
3. Classification of CBP/p300 inhibitors	3
4. CBP/p300-mediated anticancer properties and possible off-targets	3
5. Tolerated doses and pharmacokinetic features	10
6. Perspectives of chemotherapeutic potential of CBP/p300 inhibitor off-targets	11
7. Conclusions / summary	15
CRediT authorship contribution statement	15
Declaration of competing interest	15
Acknowledgments	15
References	15

1. Introduction

Reversible addition of acetyl groups to lysine residues of non-histone and histone proteins plays an important role in intracellular signaling cascades and gene transcription regulation. It affects a myriad of physiological processes including phase separation, autophagy, mitosis, differentiation and cellular memory (Shvedunova & Akhtar, 2022). The insertion of this post-translational modification is catalyzed by histone double-substrate acetyltransferases, such as paralogous CBP (cAMP responsive element binding protein) binding protein (CREBBP/KAT3A) and p300 (adenovirus E1A-associated 300 kDa protein/KAT3B), which have overlapping regulatory roles in untransformed cells and mediate the transfer of acetyl group from acetyl CoA (Coenzyme A) to a substrate protein (Shvedunova & Akhtar, 2022). Activity of these enzymes has been linked with numerous diseases, ranging from inflammatory and neurological disorders, to cancer where CBP/p300-dependent acetylation of H3K27 at the enhancers is required for growth of hematological cancers and neuroblastoma cells (Chen et al., 2022; Durbin et al., 2022; Raisner et al., 2018). Interestingly, the study of somatic cell reprogramming and induction of pluripotent stem cells (iPSCs) showed distinct functions for different CBP/p300 coactivator domains in reprogramming (Ebrahimi et al., 2019). Rapid progress in the search for small molecular weight inhibitors of CBP/p300 with the potency for clinical application, categorized, identified and developed compounds into three groups, dependent on the functional domain being targeted. Similarity of CBP/p300 targeted domains to other proteins leads to documented interaction with distinct acetyltransferases and bromodomains. Furthermore, the available target prediction tools for bioactive small molecules and protein-ligand binding profilers suggest even broader interactome of these compounds, which includes enzymes involved in cancer progression. Despite accumulating evidence on their anticancer activity provided by *in vitro* and *in vivo* studies, an information on their pharmacokinetic and pharmacological characteristics, as well as the toxicity profile remains scarce. Therefore, in this review we summarize the three groups of the inventoried acetyltransferase inhibitors and their direct CBP/p300-mediated anticancer properties reported in the literature. We collate their features with known and predicted toxicities and crucial pharmacokinetic parameters. Moreover, we list their most probable off-targets based on 2/3D similarity and protein-ligand probabilistic estimation as well as possible non-CBP/p300-dependent beneficial effect in anticancer approaches in light of the FDA-approved drugs or compounds tested in ongoing clinical trials.

2. Structure of CBP/p300 and its biological role

2.1. Structure of CBP/p300

CREBBP (CBP) and E1A binding protein (EP300/p300) act as transcription co-activators, by creating multiple signal transduction and

recruiting gene-specific transcription factors (Hay et al., 2014). Their intrinsic histone acetyltransferase and transcription promoting activities were initially linked with the formation of complexes with the TATA binding protein (TBP) and activators such as p53, nuclear hormone receptors and the SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) chromatin remodeling complex (Dallas et al., 1998). In addition to regulation of gene transcription by recognizing and acetylating lysine residues on histone proteins, these two enzymes modify >75 other non-histone proteins, modulating their activity and function (Fauquier et al., 2018; Maksimosa et al., 2014). Despite their different chromosomal localizations (16p13.3 (*Gene Symbol Report | HUGO Gene Nomenclature Committee - a*) vs 22q13.2 (*Gene Symbol Report | HUGO Gene Nomenclature Committee - b*) for CBP and p300, respectively), both enzymes have very high structural homology (Fig. 1), comprising of 2 transactivation domains at opposite protein ends and a lysine acetyltransferase domain crucial for their activity. The crystal structure of the catalytic core of human p300 revealed the functional interaction between the bromodomain, HAT domain and CH2 region, which spans the discontinuous Plant Homeodomain (PHD) domain interrupted by a Really Interesting New Gene (RING) domain (Delvecchio et al., 2013), adopting an assembled configuration with the RING domain positioned over the HAT substrate-binding pocket. The latter's negatively charged groove composed of Ser1396, Tyr1397, Thr1357, and Asp1625 is comprised of a central β-sheet and α-helices, allowing for the transfer of an acetyl group from acetyl-CoA to protein lysine residues. The key amino acid residues found within the active site of the HAT p300 domain and involved in direct interaction with acetyl-CoA, Lysyl-CoA32 and some CBP/p300 inhibitors include Phe1374, Leu1398, Ser1400, Arg1410, Thr1411, Tyr1414, His1415, Leu1418, Trp1436, Pro1440, Gln1455, Phe1458, Leu1463, Trp1466 and Tyr1467 (Patel et al., 2020).

Acetylated protein lysines are recognized and bound by an acetyl-lysine-specific CBP/p300 bromodomain (Ong et al., 2020). Structurally, the CBP/p300 bromodomain forms the so-called "BRD fold" of the left-hand bundle of 4 helices (αZ, αA, αB and αC). The hydrophobic pocket, which consists of αZ-αA and αB-αC loops and Tyr1125, Tyr1167 and Asn1168 amino acids recognizes acetylated lysine (Sanchez & Zhou, 2010). The Acetyl-lysine binding acts as a pivotal mechanism for regulating protein-protein interactions in histone-directed chromatin remodeling and gene transcription. Both the HAT catalytic domain and bromodomain of CBP/P300 emerged as targets for small molecule inhibitors.

2.2. CBP/p300 in diseases

Due to the CBP/p300-mediated acetylation of proteins involved in different cellular processes, alteration of activity is associated with certain pathological conditions. For example, p300-dependent acetylation of H3K27 acts on enhancers of genes responsible for the development of chronic inflammation and affects the onset of inflammatory bowel disease (Yu et al., 2021). Hemi-deficiency of p300 leads to impaired

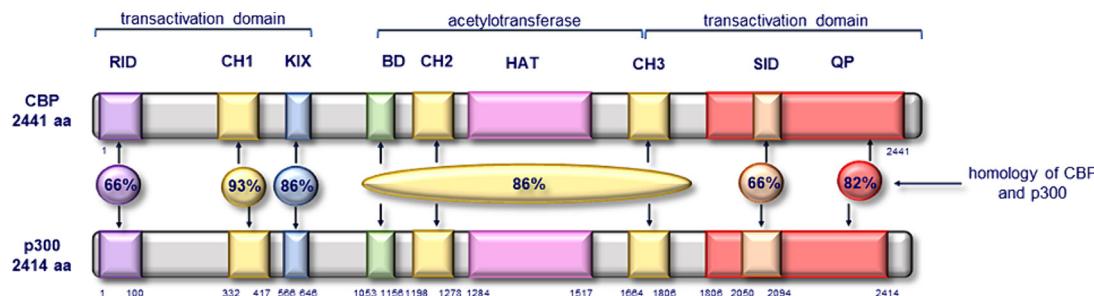


Fig. 1. Structure and homology of CBP and p300.

Functional regions of lysine acetyltransferases comprise receptor interaction domain (RID), three cysteine and histidine rich regions (CH1–3), binding site of CREB (KIX), bromodomain (BD), histone acetyltransferase domain (HAT), steroid receptor co-activator-1 interaction domain (SID) and glutamine- and proline-rich domain (QP) (Freedman et al., 2002; Karamouzis et al., 2007).

blood vessel formation, resulting in the development of Rubinstein-Taybi syndrome (Dutto et al., 2020; López et al., 2018; Park et al., 2021). Overexpression of p300 increases acetylation of the transcription factor GATA Binding Protein 4 (GATA-4), resulting in myocardial cell hypertrophy, contractile dysfunction and consequently the development of cardiovascular disease (Chelladurai et al., 2021; Yanazume et al., 2003). Additionally, changes in the function of the p300 protein can lead to the development of Menke-Hennekam syndrome (Sima et al., 2022), diabetic nephropathy (Gong et al., 2022; Tziastoudi et al., 2022) and pulmonary fibrosis (J. Tao et al., 2018).

In cancer, p300 is involved in proliferation, cell differentiation, DNA damage repair and regulation of oncogene pathways such as MYC and interferon regulatory factor 4 (IRF4) (Garcia-Carpizo et al., 2018). Alterations and inactivating mutations in the p300 are associated with malignancies and with the development of lymphoma, leukemia, bladder, lung, breast and stomach cancers. R1627W mutation, which limits the binding capacity of the enzyme, downregulates transactivating activity of p300 at the promoters of p21 and p16, thereby promoting malignant transformation, development and further cancer progression in bladder cells T24 and TCC-SUP (Luo et al., 2023). Ring et al. (Ring et al., 2020) documented inhibition of growth and suppressed metastatic nature of TNBC tumors in mice bearing p300 knock-out cell xenografts when compared to wild types (MDA-MB-231EP300KD). Furthermore, p300 is often altered in triple-negative breast cancer and the most frequent missense mutation include Glycine211Serine (37.2% of patients) and Glutamine2223Proline (34.5% of patients) (Bemanian et al., 2018). Importantly, upon DNA damage p300 acts as co-factor of the nuclear transcription factor p53, which controls transcription of many genes associated with *inter alia* induction of cell cycle arrest and apoptosis, and which is frequently mutated in cancers (Mujtaba et al., 2004; Ozaki & Nakagawara, 2011). The involvement of CBP/p300 to numerous intracellular processes and pathways, which facilitate malignant transformation and cancer cell proliferation, made these two acetyltransferases the promising targets for anticancer therapies and led to development of three classes of their inhibitors.

3. Classification of CBP/p300 inhibitors

CBP/p300 inhibitors are divided into three groups with regard to their mechanism of action and target site in enzyme structures (Fig. 2). The first group is represented by catalytic inhibitors, which compete for the Lys-CoA binding pocket with a target peptide and acetyl coenzyme A. These include the bi-substrate inhibitors, that mimic the two histone acetyltransferase substrates: the cofactor and a peptide resembling the lysine substrate, which are connected by a linker (Wapenaar & Dekker, 2016). Due to their peptidic nature and size, these compounds are characterized by weak metabolic stability and lack of cell permeability, limiting their applications in cellular systems. Natural compounds such as garcinol, curcumin and anacardic acid,

were also shown to reduce histone acetyltransferase activity, but they lack specificity and redox modulating potential, thus their anticancer properties cannot be assigned only to the targeting of CBP/p300. Virtual and high-throughput screening followed by biochemical and cellular tests has led to the identification of cell permeable and synthetic inhibitors of p300 – A-485, C646 and L002.

The well predicted druggability of most bromodomains led to the development of the second group of CBP/p300 inhibitors that interact with acetyl-lysine binding sites, thereby preventing or limiting interactions between enzyme and chromatin. Biochemically, acetyl-lysine mimetic moiety and small molecules that interacting with the “LPF shelf” (Leu1109, Pro1110, Phe1111) and Arg1173, a highly conserved asparagine residue (Asn1168 in CBP), or a phenolic hydroxyl group of a conserved tyrosine (Tyr1125 in CBP), that interferes with the formation of hydrogen bonds between the acetyl carbonyl of the peptide and the “reader” domain, have been developed. Mainly these include derivatives of 3,5-dimethylisoxazole (SGC-CBP30), benzoxazepine (I-CBP112), benzodiazepinone (CPI-637), benzodiazole (PF-CBP1), pyridine (UMB298) and pyrazolopiperidine (GNE-272 and GNE-781) (Xiang et al., 2022). The key amino acid residues found within the active site of the HAT p300 domain are Arg1410, Gln1455, His1415, Leu1398, Leu1418, Leu1463, Phe1374, Phe1458, Pro1440, Ser1400, Thr1411, Trp1436, Trp1466, Tyr1414 and Tyr1467.

Limited activity of the Bromodomain and Extra-Terminal motif (BET) protein inhibitors as a single therapeutic agent, identified multiple mechanisms of resistance, severe hematological adverse events and lack approval of any specific CBP/p300 inhibitor for clinical use, the synergistic effect of a combination of BETi and CBP/p300 inhibitors in acute myeloid leukemia AML cell lines provided a rationale for targeting both epigenetic readers and prompted the synthesis of dual and selective inhibitors of CBP/p300 and the BET bromodomain (van Gils et al., 2021). This third group of CBP/p300 inhibitors is represented by the synthetic and chemically distinct molecules: NEO1132, NEO2734 and XP-524.

4. CBP/p300-mediated anticancer properties and possible off-targets

In addition to pharmacokinetics and drug-likeness, the current attitude to initial evaluation of new compound assumes the interaction with off-targets during drug development. It makes use of *in silico* tests such as SwissTargetPrediction, 2023, followed by molecular docking and *in vitro* assays as starting point for safe and effective therapeutic management of drugs in animal preclinical models and in clinics.

The beneficial effects of CBP/p300 inhibitors in antitumor mono- and in particular, combined chemotherapy, can be determined by their efficacy in interfering with CBP/p300-mediated pathways that promote tumor growth and metastases. Some of these compounds have experimentally proven affinity to other bromodomain family members and histone acetyltransferases, as well as predicted affinity to kinases,

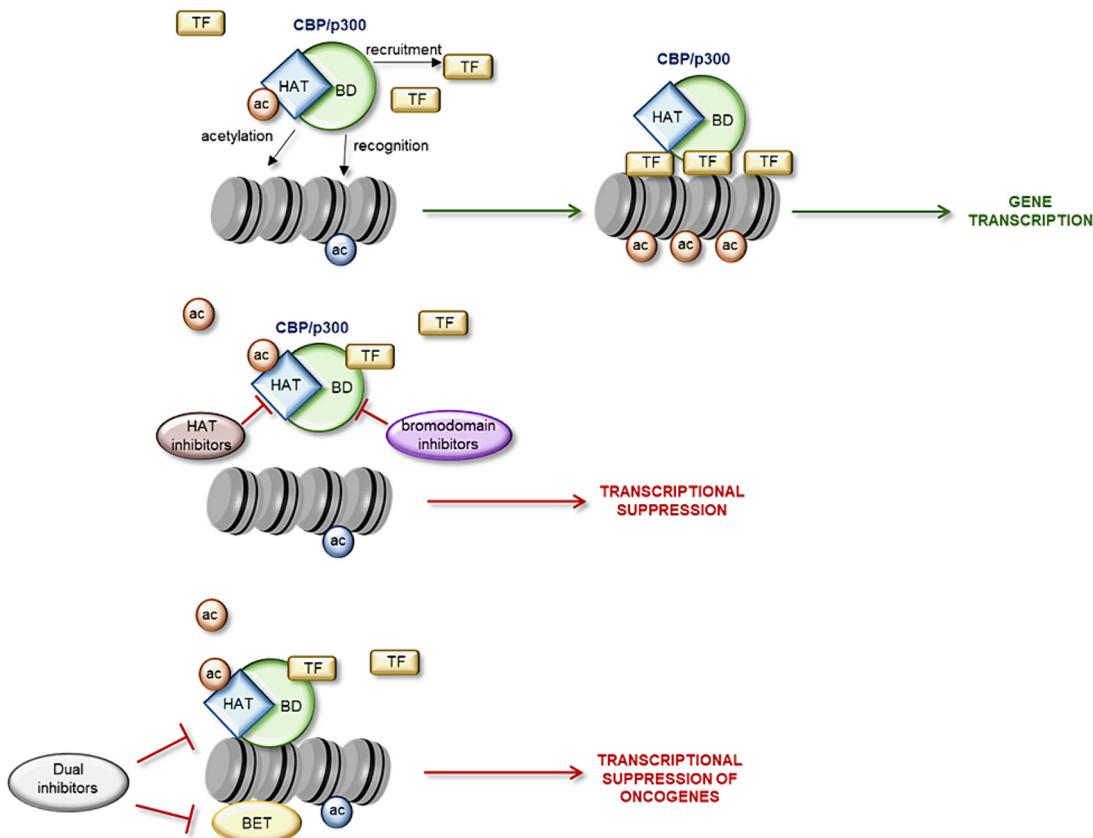


Fig. 2. Three modes of actions of CBP/p300 inhibitors.

Proposed models of action of bromodomain, HAT domain, and dual inhibitors. CBP/p300 inhibitors suppress oncogene expression by inhibiting the acetylation level of H3K27, as well as by the recruitment of transcription factors.

methyltransferases, membrane and nuclear receptors that control a wide range of cellular processes (Tables 1–3). Interaction of CBP/p300 inhibitors with off-targets may additionally modulate cancer progression, particularly during combined therapies, since some of these enzymes are functionally linked to multidrug resistance, with cytochromes which contribute to drug metabolism, components of DNA repair machineries, signal receptors and transducers.

4.1. CBP/p300 catalytic domain inhibitors

4.1.1. A-485

A-485 was reported as the selective and potent inhibitor targeting the HAT domain of the CBP and p300 with the IC₅₀ value at 9.8 nM for p300 and 2.6 nM for CBP (Lasko et al., 2017). It competes with acetyl-CoA for the CBP/p300 active site. The selectivity of A-485 towards CBP/p300 is likely due to the presence of the L1 loop, which other HATs do not possess. Moreover, each of the superposition domains of the other types of HATs that were examined were unable to form strong structural bonds because of their interference with A-485. In addition, Lasko et al. (Lasko et al., 2017) performed an activity assay for inhibition and an AlphaLISA-based peptide substrate binding assay, which concordantly suggested that A-485 is a competitive catalytic inhibitor of acetyl-CoA CBP/p300. The lipophilic pocket formed by Trp1466, Thr1411 and Pro1458, and a large hydrophobic pocket formed by Val1401, His1451 and Pro1440 were identified near the 1,1,1-trifluoroisopropyl moiety and indenyl group, respectively. A-485 served as a foundation for molecular design of new spirocyclic chromane derivatives exemplified by B16-P2, which was characterized by improved antiproliferative efficacy in the culture of human prostate carcinoma and

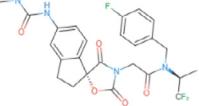
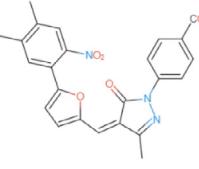
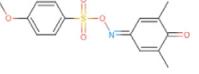
in 22Rv1 xenograft model, likely due to additional hydrogen bond formed between the chromane oxygen of B16 and Arg1462 of p300.

According to a study of Zhang et al. (B. Zhang et al., 2020), the combination of TRAIL with A-485 increased the efficacy of TRAIL-induced proliferation arrest and apoptosis in two NSCLC cell lines, particularly with induced resistance to EGFR-TKIs, hence reduced cell viability. Also in a 3D model, administration of A-484 and TRAIL intensified apoptotic cells death and caused more spheroid disassembly when compared to single treatment with either A-485 or TRAIL. A-485 showed antiproliferative activity in castration-resistant androgen receptor-positive tumor lines in prostate cancer (Feng et al., 2021), hematologic malignancies (Lasko et al., 2017), anaplastic large cell lymphoma (ALCL) and classical Hodgkin lymphoma (HL) (Wei et al., 2022). In addition, recent studies reported potential application of this compound in the treatment of psoriasis, a chronic inflammatory skin disease, by augmenting production of inflammatory cytokines and stimulating immune response (J. Kim et al., 2023).

The experimentally documented proteins, which interacted with A-485 include dopamine and serotonin transporters, which were bound by the compounds at 10 μM, and Polo-like kinase 3 (IC₅₀ = 2.7 μM) (Lasko et al., 2017). According to SwissTargetPrediction, 2023 kinases emerge as primary off-targets and are represented by, for example, Macrophage colony stimulating factor receptor (M-CSF), Nerve growth factor receptor Trk-A (NGF → TrkA), Neurotrophic receptor tyrosine kinase 2 (NTRK2), Kinesin-1 heavy chain/Tyrosine-protein kinase receptor RET (KIF5B/RET), which receive signals from the extracellular environment and transmit it down to intracellular mediators (Table 1). CSF-1R and KIF5B-RET were reported to play a role in cancer initiation and progression.

Table 1

Summary of CBP/p300 catalytic domain inhibitors.

Name	Molecule structure, SMILES and IC ₅₀	Possible cancer-relevant off-targets	In vitro and in vivo concentration tested, clinical trial doses, predicted maximum tolerated dose in human
A-485	 O=C(N1CC(N([C@H](C)C(F)(F)CC2=CC=C(F)C=C2)=O)[C@]3(OC1=O)C4=CC=C(NC(NC)=O)C=C4CC3	<ul style="list-style-type: none"> Macrophage colony stimulating factor receptor → Kinase Nerve growth factor receptor Trk-A → Kinase Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 → Kinase Hematopoietic prostaglandin D synthase → Transferase Kinesin-1 heavy chain/Tyrosine-protein kinase receptor RET → Kinase Glycine transporter 1 → Electrochemical transporter Sodium/glucose cotransporter 1 → Electrochemical transporter P-glycoprotein: substrate, I and II inhibitor Coagulation factor V → Secreted protein Dihydroorotate dehydrogenase → Oxidoreductase SUMO-activating enzyme → Enzyme Acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase → Enzyme Autotaxin → Enzyme Serine/threonine-protein kinase mTOR → Kinase Cyclin-dependent kinase 2/cyclin A → Other cytosolic protein P-glycoprotein: substrate 	<p>In vitro and in vivo studies:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 0.5 μM - 1 μM (<i>in vitro</i> GH3 cells) (Ji et al., 2022) ✓ 0.1 μM - 50 μM (<i>in vitro</i> primary bone marrow macrophages (BMMs), preosteoblast cells MC-3 T3 and rat bone marrow mesenchymal stem cells (rBMSCs)) (Huo et al., 2021) ✓ 3 μM (<i>in vitro</i> primary mouse hepatocytes were isolated from C57BL/6 mice) (Zhou et al., 2020) ✓ 20 mg·kg⁻¹·day⁻¹ (<i>in vivo</i> Male C57BL/6 mice) (Zhou et al., 2020) <p>Max. tolerated dose (mg/kg/day)</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 0.56 mg/kg/day
	p300 → 9.8 nM (B. Zhang et al., 2020)		
	CBP → 2.6 nM (B. Zhang et al., 2020)		
C646	 O=C(O)C1=CC=C(N2N=C(C)/C(C2=O)=C/C=C(C4=CC(C)=C(C)C=C4[N+](O-)C=O)C=C1	<ul style="list-style-type: none"> ATP-binding cassette subfamily G member 2 → Primary active transporter P-glycoprotein 1 → Primary active transporter Bromodomain-containing protein 2/3/4 → Reader Putative hydrolase RBBP9 → Enzyme Coagulation factor VII/tissue factor → Surface antigen Poly [ADP-ribose] polymerase 1/2/10 → Enzyme 	<p>In vitro and in vivo studies:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 4 μM - 50 μM (<i>in vitro</i> Human neural progenitor cell lines (15,167, 16,157, NHNP, and NSC194), HepG2 and Huh7) (W. Tao et al., 2020; Yuan et al., 2021) ✓ 30 nmol/g (<i>in vivo</i> mice) (Fan et al., 2020; Zhuo et al., 2022) <p>Max. tolerated dose (mg/kg/day)</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 1.4 mg/kg/day
L002	 O=C1C(C)=C/C(C=C1C)=N\OS(=O)(C2=CC=C(OC)C=C2)=O	<ul style="list-style-type: none"> ATP-binding cassette subfamily G member 2 → Primary active transporter P-glycoprotein 1 → Primary active transporter Bromodomain-containing protein 2/3/4 → Reader Putative hydrolase RBBP9 → Enzyme Coagulation factor VII/tissue factor → Surface antigen Poly [ADP-ribose] polymerase 1/2/10 → Enzyme 	<p>In vitro and in vivo studies:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 10 μM (<i>in vitro</i> podocytes, mesangial cells and cardiac fibroblasts cell lines) (Rai et al., 2017) ✓ ~20 μg/g (<i>in vivo</i> C57BL/6 mice with induced cardiac fibrosis model) (Rai et al., 2017) <p>Max. tolerated dose (mg/kg/day)</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 8.5 mg/kg/day

Molecule structure was generated using the pkCSM tool. IC₅₀ and SMILES notations values were obtained from literature, while off-targets with possible positive effects in anti-cancer therapy were derived from SwissTargetPrediction, which is founded on an algorithm that compares combination of 2D and 3D similarity with a reference library of compounds with known biological activity (Daina et al., 2019). Proteins highlighted in green indicate a significant probability that a molecule is bioactive against the designated protein. The pkCSM tool defined the possible interaction of CBP/p300 inhibitors with P-glycoprotein. Inhibitors of P-glycoprotein I and II correspond to the two enzyme family members encoded by the *MDR1* and *MDR2*, respectively. Human maximum recommended tolerated dose (MRTD; mg/kg/day) estimates the toxic dose threshold of chemical compounds for humans based on analysis of human experimental data collected from clinical trials.

4.1.2. C646

C646 is selective, reversible and competitive with Ac-CoA and non-competitive with the histone substrate inhibitor with Ki ~ 400 nM (Bowers et al., 2010). Chemically, it belongs to the pyrazolones and reduces p300 activity at 1.6 μM. It works by competing with acetyl-CoA and forms intermolecular interactions with W1861 and Tyr1436, located in the active site of p300. This interaction affects the inhibition of catalytic activity, whereas stability of the complex is affected by the hydrophobic bond between Tyr1467 and furan, methyl-pyrosol and benzoic acid rings (Dancy & Cole, 2015; Sivanandam et al., 2018). Numerous reports suggest that this compound has an anticancer activity. Ya-Mei Wang et al. showed the antineoplastic effect of C646 in 5 gastric cancer (GC) cell lines (SGC-7901, MKN45, MGC-803, BGC-823 and KATO III), where cell viability reduced and triggered apoptosis followed by cell cycle arrest,

suppressed migration and invasion capability of the GC cells and repression of oncogenic signaling molecules, such as c-Met, Akt, Bcl-2, Bax, cyclin D1, MMP7 and MMP9 (Y.-M. Wang et al., 2017). Furthermore, it reduced the proliferation rate of human breast cancer cell lines by repressing the p300-BRG1-dependent genes involved in mitotic division (Sobczak et al., 2019), inhibiting CDK2 and significantly reducing the proliferation rate of CXCL1 overexpressing colorectal cancer cells as well as breast cancer cell lines (Zhuo et al., 2022). The major cellular off-targets are comprised of proteins that promote tumor aggressiveness and overall survival (coagulation factor V), resistance and metastasis (SUMO-activating enzyme), proliferation (autotaxin – initially known as tumor cell-motility-stimulating factor, human dihydro-orotate dehydrogenase), autophagy and energy supply (serine/threonine-protein kinase mTOR) and cholesterol metabolism (acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase) (Table 1).

Table 2

Summary of CBP/p300 bromodomain inhibitors.

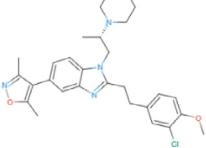
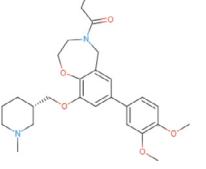
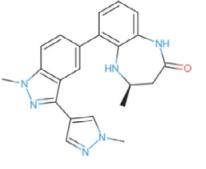
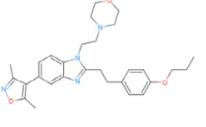
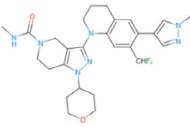
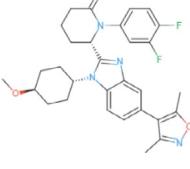
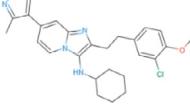
Name	Molecule structure, SMILES and IC ₅₀	Possible cancer-relevant off targets	In vitro and in vivo concentration tested, clinical trial doses, predicted maximum tolerated dose in human
SGC-CBP30	 C[C@H](N1CCOCC1)CN2C(CCC3 = CC=C(OC)(Cl) = C3) = NC4 = CC(C5 = C(ON=C5C) = CC=C42)	<ul style="list-style-type: none"> P-glycoprotein 1 → Primary active transporter, substrate, I and II inhibitor Tumor suppressor p53/oncoprotein Mdm2 → Transcription factor Serine/threonine-protein kinase mTOR → Kinase PI3-kinase p110-alpha subunit → Enzyme MAP kinase p38 alpha → Kinase Casein kinase I delta → Kinase Tyrosine-protein kinase ABL → Kinase 	In vitro and in vivo studies: <input checked="" type="checkbox"/> 1 μM – 10 μM (<i>in vitro</i>) (Conery et al., 2016; Hammitsch et al., 2015; Hlushchuk et al., 2021; Picaud et al., 2015; Principe et al., 2022) <input checked="" type="checkbox"/> 7.7 mg/kg, 15.4 mg/kg and 19.3 mg/kg (<i>in vivo</i> BALB/c mouse model) (Bi et al., 2021)
I-CBP112	 COC1 = C(OC)C=C(C2 = CC(OC[C@H]3CCCC(C)C3) = C(OCCN(C(CC)=O)C4)C4 = C2)C=C1	<ul style="list-style-type: none"> Tyrosine-protein kinase SRC → Kinase Tyrosine-protein kinase ABL → Kinase Vascular endothelial growth factor receptor 1 → Kinase Epidermal growth factor receptor erbB1 → Kinase Phosphodiesterase 5 A → Phosphodiesterase Fibroblast growth factor receptor 3 → Kinase P-glycoprotein: substrate, I and II inhibitor 	In vitro and in vivo studies: <input checked="" type="checkbox"/> 1 μM – 20 μM (<i>in vitro</i>) (Conery et al., 2016; Picaud et al., 2015; Strachowska et al., 2021; Zucconi et al., 2016) <input checked="" type="checkbox"/> 0.1 μM (<i>in vivo</i> B6D2F-1 mouse model and embryos obtained from B6D2F-1) (Yuan et al., 2020) <input checked="" type="checkbox"/> 1.2 mg/kg (Intravenous (IV) administration) – 3 mg/kg (Intraperitoneal (IP) administration) (<i>in vivo</i> leukemic blasts expressing MLL-AF9 model) (Picaud et al., 2015)
CPI-637	 O=C1NC2 = CC=CC(C3 = CC4 = C(N(C)N=C4C5 = CN(C)N=C5)C=C3) = C2N[C@H](C)C1	<ul style="list-style-type: none"> P-glycoprotein 1 → Primary active transporter, substrate, I and II inhibitor Bromodomain-containing protein 9 → Reader Bromodomain-containing protein 4 → Reader PI3-kinase p110-gamma subunit → Enzyme Serine/threonine-protein kinase RAF → Kinase 	In vitro and in vivo studies: <input checked="" type="checkbox"/> 2 μM (<i>in vitro</i>) (Yan et al., 2019) <input checked="" type="checkbox"/> 10 mg per kg SCID mice (He et al., 2021)
PF-CBP1	 CCOC1 = CC=C(CCC2 = NC3 = CC(C4 = C(C)ON=C4C) = CC=C3N2CCN5CCOC5)C=C1	<ul style="list-style-type: none"> ATP-binding cassette sub-family G member 2 → Primary active transporter Tumor suppressor p53/oncoprotein Mdm2 → Transcription factor 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 → Enzyme C–C chemokine receptor type 2 → Family A G protein-coupled receptor Nerve growth factor receptor Trk-A → Kinase Tyrosine-protein kinase ABL → Kinase PI3-kinase p110-beta subunit → Enzyme Neuropeptide Y receptor type 5 → Family A G protein-coupled receptor P-glycoprotein: substrate, I and II inhibitor 	In vitro and in vivo studies: <input checked="" type="checkbox"/> 100 nm – 1000 nm (<i>in vitro</i>) (Chekler et al., 2015) <input checked="" type="checkbox"/> 0.1 μM– 30 μM (<i>in vivo</i> mouse J774 macrophage-like cell line / primary macrophages) (Chekler et al., 2015)
	 CBP → 0.13 μM (Chekler et al., 2015) BRD4 → 18.1 μM (Chekler et al., 2015)		Max. tolerated dose (mg/kg/day) <input checked="" type="checkbox"/> 0.7 mg/kg/day

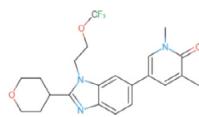
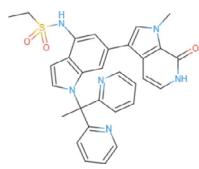
Table 2 (continued)

Name	Molecule structure, SMILES and IC ₅₀	Possible cancer-relevant off targets	In vitro and in vivo concentration tested, clinical trial doses, predicted maximum tolerated dose in human
GNE-781		<ul style="list-style-type: none"> P-glycoprotein 1 → Primary active transporter Neuropeptide Y receptor type 1 → Family A G protein-coupled receptor Metabotropic glutamate receptor 5 → Family C G protein-coupled receptor Metabotropic glutamate receptor 1 → Family C G protein-coupled receptor Orexin receptor 2 → Family A G protein-coupled receptor Dual specificity mitogen-activated protein kinase 1 (MAP2K1) → Kinase PI3-kinase p110-alpha subunit → Enzyme Heat shock protein HSP 90-alpha → Other cytosolic protein Heat shock protein HSP 90-beta → Other cytosolic protein P-glycoprotein: substrate, I and II inhibitor 	<p>In vitro and in vivo studies:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 1 μM (<i>in vitro</i>) (Morrison-Smith et al., 2020) ✓ 3 mg/kg - 30 mg/kg (<i>in vivo</i> SCID mice with MOLM-16 AML xenografts) (Romero et al., 2017) <p>Max. tolerated dose (mg/kg/day)</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 0.3 mg/kg/day
	O=C(N1CCC(N(C2CCOCC2)N=C3N4CCCC5=C4C=C(C(F)F)C(C6 = CN(C)N=C6) = C5) = C3C1)NC		
	CBP (TR-FRET) → 0.94 nM (Morrison-Smith et al., 2020; Romero et al., 2017)		
	CBP (BRET) → 6.2 nM (Romero et al., 2017)		
	p300 → 1.2 nM (Romero et al., 2017)		
	BRD4 → 5100 nM (Morrison-Smith et al., 2020; Romero et al., 2017)		
CCS1477		<ul style="list-style-type: none"> ALK tyrosine kinase receptor → Kinase Glycine transporter 1 → Electrochemical transporter Cathepsin S → Protease Hexokinase type IV → Enzyme Fatty acid synthase → Transferase Epoxide hydratase → Protease Mitogen-activated protein kinase 12 → Enzyme Poly [ADP-ribose] polymerase 1 → Enzyme P-glycoprotein: substrate, I and II inhibitor 	<p>In vitro and in vivo studies:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 300 nM - 1 μM (<i>in vitro</i>) (J. Liu et al.; Tontsch-Grunt et al., 2022) ✓ 5 mg/kg - 10 mg/kg (<i>in vivo</i> mice) (Tontsch-Grunt et al., 2022) ✓ 3 mg/kg and 30 mg/kg oral administration (<i>in vivo</i> male CD1 mice) (Welti et al., 2021) <p>Clinical trials:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 25 mg - 50 mg (on a 3-days-on- and 4 days-off--schedule) population of men with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) (Welti et al., 2021) <p>Max. tolerated dose (mg/kg/day)</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 0.8 mg/kg/day (<i>Study to Evaluate CCS1477 in Advanced Tumors - Full Text View - ClinicalTrials.gov</i>)
	O=C1N(C2 = CC=C(F)C(F) = C2)[@H](C3 = NC4 = CC(C5 = C(C)ON=C5C) = CC=C4N3[C@H]6CC[C@H](OC)CC6)CCC1		
	CBP and p300 → 19 nM (Rasool et al., 2021)		
	BRD4 → 1.06 nM (Rasool et al., 2021)		
UMB298		<ul style="list-style-type: none"> 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 → Enzyme Tyrosine-protein kinase JAK2 → Kinase Cyclin-dependent kinase 2 → Kinase Serotonin 6 (5-HT6) receptor → Family A G protein-coupled receptor MAP kinase ERK2 → Kinase ALK tyrosine kinase receptor → Kinase Signal transducer and activator of transcription 6 → Transcription factor P-glycoprotein: substrate, I and II inhibitor 	<p>In vitro and in vivo studies:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 1 μM - 10 μM (<i>in vitro</i> MOLM13 and MM cells) (Muthengi et al., 2021) <p>Max. tolerated dose (mg/kg/day)</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 1.5 mg/kg/day
	CC1 = C(C2 = CC3 = NC(CCC4 = CC=C(O)C(Cl) = C4) = C(NC5CCCC5)N3C=C2)C(C) = NO1		
	CBP → 72 nM (Muthengi et al., 2021)		
	BRD4 → 5193 nM (Muthengi et al., 2021)		

Molecule structure was generated using the pkCSM tool. IC₅₀ and SMILES notations values were obtained from literature, while off-targets with possible positive effects in anti-cancer therapy were derived from SwissTargetPrediction, which is founded on an algorithm that compares combination of 2D and 3D similarity with a reference library of compounds with known biological activity (Daina et al., 2019). Proteins highlighted in green indicate a significant probability that a molecule is bioactive against the designated protein. The pkCSM tool defined the possible interaction of CBP/p300 inhibitors with P-glycoprotein. Inhibitors of P-glycoprotein I and II correspond to the two enzyme family members encoded by the *MDR1* and *MDR2*, respectively. Human maximum recommended tolerated dose (MRTD; mg/kg/day) estimates the toxic dose threshold of chemical compounds for humans based on analysis of human experimental data collected from clinical trials.

Table 3

Summary of dual inhibitors of CBP/p300 and BET.

Name	Molecule structure, SMILES and IC ₅₀	Possible cancer-relevant off targets	In vitro and in vivo concentration tested, clinical trial doses, predicted maximum tolerated dose in human
NEO2734		<ul style="list-style-type: none"> MAP kinase ERK2 → Kinase Epoxide hydratase → Protease Proteinase-activated receptor 1 → Family A G protein-coupled receptor Complement factor D → Protease N-lysine methyltransferase SMYD2 → Writer Serine/threonine-protein kinase B-raf → Kinase Sodium/glucose cotransporter 1 → Electrochemical transporter P-glycoprotein: substrate, I and II inhibitor 	<p>In-vitro and in-vivo studies:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 100 nm - 10 μM (<i>in vitro</i>) (Kuang et al., 2022; Morrison-Smith et al., 2020; Spriano et al., 2020; Yan et al., 2019) ✓ 5 mg/kg - 30 mg/kg oral administration (<i>in vivo</i> CRPC and colon cancer xenograft mice model, SCID mice) (He et al., 2021; Kuang et al., 2022; Morrison-Smith et al., 2020; Welti et al., 2021) <p>Clinical trials:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 5 mg orally once a day castration-resistant prostate cancer, NUT midline carcinoma and other targeted advanced solid tumors (<i>Dual BET and CBP/P300 Inhibitor in Patients With Targeted Advanced Solid Tumors - Full Text View - ClinicalTrials.gov</i>) <p>Max. tolerated dose (mg/kg/day)</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 2.2 mg/kg/day
XP-524		<ul style="list-style-type: none"> Cyclin-dependent kinase 2 → Kinase Cyclin-dependent kinase 1 → Kinase Bradykinin B2 receptor → Family A G protein-coupled receptor Beta secretase 2 → Protease Beta secretase 1 → Protease P-glycoprotein 1 → Primary active transporter P-glycoprotein: substrate, I and II inhibitor 	<p>In vitro and in vivo studies:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 1 μM (<i>in vitro</i>) (Principe et al., 2022) ✓ 5 mg/kg (<i>in vivo</i> mouse model) (Principe et al., 2022) <p>Max. tolerated dose (mg/kg/day)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 3.5 mg/kg/day

Molecule structure was generated using the pkCSM tool. IC₅₀ and SMILES notations values were obtained from literature, while off-targets with possible positive effects in anti-cancer therapy were derived from SwissTargetPrediction, which is founded on an algorithm that compares combination of 2D and 3D similarity with a reference library of compounds with known biological activity (Daina et al., 2019). Proteins highlighted in green indicate a significant probability that a molecule is bioactive against the designated protein. The pkCSM tool defined the possible interaction of CBP/p300 inhibitors with P-glycoprotein. Inhibitors of P-glycoprotein I and II correspond to the two enzyme family members encoded by the *MDR1* and *MDR2*, respectively. Human maximum recommended tolerated dose (MRTD; mg/kg/day) estimates the toxic dose threshold of chemical compounds for humans based on analysis of human experimental data collected from clinical trials.

4.1.3. L002

L002 is a specific and reversible inhibitor of p300, with an IC₅₀ similar to C646, at 1.98 μM (Table 1). This compound may play a key role in cardio-renal fibrosis, because it quiets hypertension in the aforementioned pathology and inhibits pro-fibrogenic processes (Rai et al., 2017). Both catalytic domain inhibitors are also implicated in reversing pathologies such as cardiac fibrosis, diastolic dysfunction and hypertension-induced left ventricular hypertrophy in mice without notable side effects (Rai et al., 2019). As for cancer, Heng Yang et al. (H. Yang et al., 2013) demonstrated high sensitivity of leukemia, lymphoma, and triple-negative breast cancer cell lines MDA-MB-468 and MDA-MB-231 to L002, as evidenced by their suppressed proliferation (H. Yang et al., 2013). Alignment of the p300 catalytic domain with the crystal structure of the L002 inhibitor indicated that the HAT domain inhibitor can match residues in the α3 helix, α4 helix and L1 loop, which forms an acetyl-CoA binding pocket. The L002 oxygen atom forms 2 hydrogen bonds with the R1410 side chain in the α3 helix of the p300 catalytic domain. In addition, the Q1455 side chain of the L1 loop of the catalytic domain of the p300 protein can form a hydrogen bond with the oxygen bound to the nitrogen of the L002 molecule (H. Yang et al., 2013).

At higher concentrations it inhibits another 2 acetyltransferases PCAF (35 μM) and GCN5 (34 μM) (X.-J. Sun et al., 2015). According to SwissTargetPrediction, 2023 (Table 1) L002 may interact with BET Bromodomain proteins BRD2/3/4, which were considered promising targets for cancer treatments and an important step towards suppressing oncogenic networks within tumors, since these proteins regulate

cell cycle progression by activating oncogenes such as MYC, JUNB, CCND1 and CCNA1 (Shorstova et al., 2021). However, these agents failed in single therapies so their combinations with other chemotherapy drugs can be rather taken into consideration and further anticancer evaluation. L002 may increase the toxicity of chemotherapy drugs by inhibiting the ATP-binding cassette sub-family G member 2 (ABCG2, BCRP) and P-glycoprotein 1 (ABCB1), which are removed from cells or sequestered in the intracellular compartments by these transporters, thereby enhancing drug concentration and availability inside cells. This is particularly important in cells, where gained multidrug resistance is conferred by overexpression of ABC transporters. Furthermore, inhibition of PARP1 and PARP2, which are essential for maintaining genome integrity particularly upon BRCA1/2-deficiency, impairs the DNA repair efficacy of cells.

4.2. CBP/p300 bromodomain inhibitors

4.2.1. SGC-CBP30

Hay et al. (Popp et al., 2016) described **SGC-CBP30** as a potent inhibitor of the bromodomain-containing protein CBP (IC₅₀ = 21 nM) and p300 (IC₅₀ = 38 nM), which has a 40-fold selectivity over BRD4 (Table 2). It represents the 3,5-dimethylisoxazole-type of acetyl-lysine mimetics. SGC-CBP30 forms a hydrogen bond with conserved asparagine N1132 (CBP), and in water-mediated condition a hydrogen bond with the hydroxyl group of Y1089 of p300 bromodomain (Hammitzsch et al., 2015). Systemically delivered SGC-CBP30

suppresses or modulates the aggregation of α -synuclein which is a component of Lewy bodies in Parkinson's disease (Hlushchuk et al., 2021), and also alleviates idiopathic pulmonary fibrosis (J. Tao et al., 2018) in combination with DDR1, rescuing mice from lethal sepsis by inhibiting inflammatory responses (Bi et al., 2021). Although it exhibits low direct cytotoxicity against U2OS osteosarcoma cells (Chekler et al., 2015), Conery et al. (Conery et al., 2016) reported reduced viability, cell cycle arrest and initiation of programmed cell death in multiple myeloma cancer cells exposed to SGC-CBP30, repressing the expression of Interferon regulatory factor 4. Duncan et al. (Hay et al., 2014) suggested application of SGC-CBP30 as a clinical approach in the treatment of disorders related to hyperactive p53 diseases, as it prevents CBP interaction with the acetylated lysine 382 (K382) of p53, crucial for p53-induced p21-mediated G1 cell cycle arrest.

The Bitarget prediction tool (Table 2) indicated kinases as major off-targets of the SGC-CBP30, which represent 66.7% of the entire predicted interactome (SwissTargetPrediction). These include mTOR, as a serine/threonine kinase, PI3 kinase p110-alpha subunit, MAP kinase p38 alpha, Casein kinase I delta and Tyrosine-protein kinase ABL, involved in cancer cell survival, angiogenesis, migration and metastasis and expression of stemness factors, and in chemoresistance. Like all other inhibitors of CBP/p300 bromodomain listed below, SGC-CBP30 is a P-glycoprotein substrate. Therefore, its concentration inside cells and particularly in the nucleus may be limited by its ATP-dependent transport across membranes, and its efficacy in CBP/p300 inhibition could be reduced. On the other hand, saturation or inhibition of P-glycoprotein with SGC-CBP30 may help to accumulate higher doses of anticancer drugs inside cancer cells.

4.2.2. I-CBP112

The **I-CBP112** inhibitor selectively and potently inhibits the CBP/p300 bromodomain, but the IC₅₀ is lower for CBP (170 nM) than for p300 (625 nM) (Table 2). I-CBP112 also forms a hydrogen bond with the N1168 residue of the conserved asparagine in the CBP molecule, whereas in the water-mediated state the hydrogen bond involves the Y1125 residue (Picaud et al., 2015). Analysis of p300 distribution at the promoters of p300-dependent genes confirmed a considerable extrusion of p300 from the chromatin in response to I-CBP112, followed by markedly increased acetylation of histones H3K18 and H3K23 and recruitment of LSD1 that possibly reduced trimethylation of H3K4 (Strachowska et al., 2021). These alterations were observed at the promoters of some ABC transporters and caused repression that was associated with higher accumulation of anthracyclines and methotrexate inside triple-negative breast cancer and non-small-cell lung cancer cell lines as well as with cell sensitization to wide range of anticancer drugs. Furthermore, SwissTargetPrediction and pkCSM tool (Table 2) indicate a possible interaction between I-CBP112 and P-glycoprotein, which might also condition anticancer drug distribution and availability inside cells. Picaud et al. (Picaud et al., 2015) illustrated the possible application of I-CBP112 for the treatment of leukemia. It impairs the growth of leukemic cells by enhancing cytotoxicity of doxorubicin and BET inhibitor - JQ1. The predicted main off-targets for I-CBP112 comprise mainly of kinases, such as tyrosine-protein kinase SRC and ABL, vascular endothelial (VEGFR-1) and epidermal growth factors (EGFR) which are involved in malignant transformation, angiogenesis in tumors, proliferation, invasion and metastases.

4.2.3. CPI-637

CPI-637 belongs to the benzodiazepines and inhibits CBP (IC₅₀ = 30 nM), p300 (IC₅₀ = 51 nM) and BRD4 BD-1 (IC₅₀ = 11.0 μ M) (Table 2). The functional impact of this compound on BRD4 interaction with acetylated histones was shown by Tengyi Zheng et al. (T. Zheng et al., 2021), where CPI-637 prevented the "cytokine storm" in a model of acute HIV-1 infection and emerged as latency-reversing agents of HIV-1 by the TIP60-mediated signaling pathway. Wei et al. (Wei et al., 2022) demonstrated an important anticancer function of the CPI-637

inhibitor in *in-vitro* and in xenograft models of anaplastic large cell lymphoma (ALCL) and classical Hodgkin lymphoma. The predicted off-targets (Table 2) represent chromatin readers (BRD4 and BRD9), kinases (PI3K-kinase p110 and serine/threonine kinase RAF), membrane proteins (P-glycoprotein) and nuclear receptors (LXR α and LXR β).

4.2.4. PF-CBP1

Like CPI-637, this bromodomain inhibitor targets CBP (IC₅₀ = 0.13 μ M) and BRD4 (IC₅₀ = 18.1 μ M) (Table 2). Structurally, **PF-CBP1** lacks hydrogen bond donors, however, it has 6 hydrogen bond acceptors as well as 10 rotatable bonds. This compound has no cytotoxicity against M1-polarized macrophages at drug-applicable doses, whereas the drug-induced damage effect on liver cell lines was only found at very high concentrations of PF-CBP1 in the culture of immortalized human liver epithelial cells (THLE) (IC₅₀ = 23.7 μ M) and carcinoma HepG2 cells (IC₅₀ = 35.9 μ M) (Chekler et al., 2015). It can be transported across membranes by P-glycoprotein but may also interact with ABCG2. Due to the structural similarity to SGC-CBP30, the predicted list of possible off-targets (Table 2) includes p53 signaling, as well as PI3K and ABL kinases, but also the nerve growth factor receptor Trk-A and neuropeptide Y receptor type 5, since both have been shown to be overexpressed in the overwhelming majority of human solid cancers and has emerged as promising targets for cancer diagnosis and therapy. PF-CBP1 may interact with 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatases (PFKFB) that controls the level of fructose 2,6-bisphosphate, an essential activator of the glycolytic flux. This enzyme acts as an important regulator of prostate cancer cell survival and reduces paclitaxel sensitivity in ovarian and breast cancer cell lines with wild-type TP53 (H. Yang et al., 2019). C—C chemokine receptor type 2 (CCR2), listed as an off-target of PF-CBP1, is predominantly expressed by monocytes/macrophages infiltrating tumor microenvironments and is strongly immunosuppressive.

4.2.5. GNE-781

GNE-781 is a selective and a highly potent inhibitor of CBP (TR-FRET IC₅₀ = 0.94 nM; BRET IC₅₀ = 6.2 nM) with the ability to suppress p300 (IC₅₀ of 1.2 nM) as well as BRD4 (IC₅₀ = 5100 nM) (Table 2). *In vitro* experiments confirmed the marked selectivity for CBP (5425-fold) and p300 (4250-fold) over a subset of bromodomains. GNE-781 contains one hydrogen bond donor, 7 hydrogen bond acceptors and 4 rotatable bonds. GNE-781 is characterized by oral bioavailability and antitumor activity (Romero et al., 2017). It interferes with the differentiation of human CD4+ T cells into FOXP3-expressing regulatory T (Treg) cells, which are involved in inhibiting the anti-tumor immune response (Castillo et al., 2019; Tanaka & Sakaguchi, 2017) and such alterations in the tumor microenvironment may have a strong potential for cancer immunotherapy. Moreover, it regulates the proto-oncogene MYC expression, which encodes a protein that is a key in regulating cell proliferation, as well as programmed cell death in the AML tumor model. In addition to P-glycoprotein is inhibited by GNE-781, the list of possible off-targets includes G protein-coupled receptors, which together with their ligand glutamate, promote the growth of tumors of neuronal and non-neuronal origins (Table 2). The Orexin receptor 2 could trigger mitochondrial apoptosis in cancer cells and reduce the tumor volume by 80% in response to binding of its ligand – orexin. Another possible target of GNE-781 is mitogen-activated protein kinase 1 with dual specificity (MAPK1), which mediates signaling from extracellular ligands such as growth factors, cytokines and hormones to the MEK / ERK cascade and activates BRAF in a KSR1 or KSR2-dependent manner. Alterations in genes encoding elements of the MAPK pathway leads to oncogenesis, invasion and drug resistance of cancer cells, which explains the reason why MAPK inhibitors are such a desirable tool for numerous studies (Braicu et al., 2019; Burotto et al., 2014). For example, mutation in the MAP2K1 gene encoding MEK1 kinase is present in melanoma, colon cancer and lung cancer (Bardwell, 2020). Further target of GNE-781 is the cytoplasmic heat shock protein HSP 90-alpha and HSP 90-beta

with known effects on tumorigenesis and induction of adaptive immunity (Birbo et al., 2021).

4.2.6. CCS1477 (*Inobrodib*)

CCS1477 (*Inobrodib*) is a highly selective and orally bioavailable inhibitor of CBP and p300 with strong affinity for both acetyltransferases ($IC_{50} = 19$ nM) and BRD4 ($IC_{50} = 1.06$ nM) (Table 2). It represents the group of benzimidazole derivatives with 7 hydrogen bond acceptors, 5 rotatable bonds, and no hydrogen bond donors. Its mechanism of action includes suppression of transcription factors, such as Myc proto-oncogene (*c-Myc*) that are responsible for tumor development (Brooks et al., 2021). Accordingly, in models of acute myeloid leukemia and multiple myeloma, monotherapy with CCS1477 suppressed cancer cell proliferation (Brooks et al., 2019). The same effect was also seen in the stromal co-culture of primary patient AML blast cells from a range of patients with a range of molecular subtypes and was assigned to a combination of cell cycle arrest in G1/G0 and induction of differentiation, confirmed by the up regulation of selected differentiation markers CD11b and CD86. A strong pre-clinical rationale for the use of *Inobrodib* as monotherapy, or in combination with standard of care agents led this compound to phase 1b and 2a clinical trials (NCT04068597, NCT03568656), where its efficacy as monotherapy was tested in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer, Metastatic Breast Cancer, Non-small Cell Lung Cancer, Advanced Solid Tumors, Hematological Malignancy, Acute Myeloid Leukemia, Non-Hodgkin Lymphoma, Multiple Myeloma and Higher-risk Myelodysplastic Syndrome (Study to Evaluate CCS1477 in Advanced Tumors - Full Text View - ClinicalTrials.gov; Study to Evaluate CCS1477 in Hematological Malignancies - Full Text View - ClinicalTrials.gov). *Inobrodib* emerges as a substrate of P-glycoprotein and as a possible modulator of cell metabolism, since its predicted off-targets (Table 2) include hexokinase, which is responsible for the initiation and maintenance of glycolysis at a high level of efficiency for the growth and proliferation of cancer cells (Stachyra-Strawa et al., 2020). Fatty acid synthase, which acts as central regulator of lipid metabolism; the activity of this enzyme is crucial in the growth and survival of tumors with lipogenic phenotypes (Fhu & Ali, 2020).

4.2.7. UMB298

First presented by Alex Muthengi et al. (Muthengi et al., 2021) in 2021, the inhibitor **UMB298** that selectively binds to CBP/p300 bromodomain and the hydrogen bond formed involves conserved asparagine N1168. The IC_{50} of this compound against BRD4 is >70-fold higher than for CBP (5193 nM versus 72 nM) due methyl (in the OMe group) and cyclohexyl groups. UMB298 dose-proportionally inhibited the growth of human leukemia cell lines and multiple myeloma, and also suppressed Myc gene expression. The predicted activity of this compound includes the inhibition of P-glycoprotein and cytochrome P450 (Table 2, SwissADME and pkCSM tools), which may affect drug accumulation inside cancer cells and considerably alter drug metabolism. Other off-targets control mitotic divisions (CDK2), oncogenic pathway transducers known to promote tumor growth and survival (ERK2, ALK, JAK-STAT, 5-HT6R), (Ballou et al., 2018) and an essential activator of the glycolytic flux that energetically fuels cancer cells (PFK-2/FBPase-2). (Kocemba et al., 2016) Sphingosine-1-phosphate receptor 3 (S1PR3 or EDG-3), a member of the family G protein-coupled receptors, is a key factor in the sphingosine-1-phosphate (S1P) signaling pathway. EDG3 is a functional receptor for S1P, which as a second messenger affects cell growth and differentiation (Okamoto et al., 1999; Windh et al., 1999). Inhibition of EDG3 inhibits S1P signaling, which is associated with the process of enhanced proliferation and metastasis of cancer cells (J. Watters et al., 2011).

4.3. Dual inhibitors of CBP/p300 and BET

4.3.1. NEO2734

NEO2734 belongs to the selective dual CBP/p300 and BET bromodomain inhibitor with IC_{50} against simultaneous CBP/p300 and

BET bromodomains at <30 nM (Table 3), therefore, it is considered as promising compound for anticancer clinical studies. This orally active compound is in phase I clinical trials and will be administrated to patients with castration-resistant prostate cancer, NUT midline carcinoma and other targeted advanced solid tumors (NCT05488548). Prostate cancer (PC) cells having mutations in CULLIN3-based E3 ubiquitin ligase substrate-binding adaptor gene (SPOP), which drive cancer resistance to BET inhibitors due to aberrant elevation of BET proteins, were sensitive to NEO2734 monotherapy *in vitro* and *in vivo*. Moreover, NEO2734 arrested cell proliferation more strongly than a combination of BET (JQ1) and CBP/p300 bromodomain inhibitor (CPI-637) (Yan et al., 2019). NEO2734 potently inhibited the growth and induced differentiation of NUT midline carcinoma (NMC) that is an aggressive subtype of squamous carcinoma, driven by the BRD4-NUT fusion oncoprotein (Morrison-Smith et al., 2020), where BRD4, binds to nucleosomes via its bromodomains, whereas NUT recruits p300. According to SwissTargetPrediction, off-targets (Table 3) are quantitatively overrepresented by proteases (46.7%). PAR-1 might be a prognostic factor for colorectal cancer since it stimulates macrophages to produce thrombin and growth factors, resulting in enhanced cell proliferation, tumor growth and metastasis (Han et al., 2011; X. Liu et al., 2017). Immune modulatory activity was assigned to SGLT1, responsible for the highly glycolytic phenotype of tamoxifen-resistant breast cancer cells, lactate release and M2-like TAM polarization, which in turn promotes cancer proliferation by activating the EGFR/PI3K/Akt signaling pathway (Niu et al., 2021). BRAF with serine/threonine-protein kinase activity is a well-known proto-oncogene, transducing signals from RAS via *inter alia* ERK to the nucleus, hence controlling cell proliferation, differentiation and survival.

4.3.2. XP-524

XP-524 is a potent, dual inhibitor of the BET protein BRD4 and histone acetyltransferase p300/CBP with the IC_{50} s against p300 ~ 28 nM, CBP ~ 116 nM, BRD4-BD1 ~ 5.8 nM and BRD4-BD2 ~ 1.5 nM (Table 3) (Principe et al., 2022). Principe et al. (Principe et al., 2022) described a tumoricidal activity of XP-524 that inhibited pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) by repressing KRAS, with extended survival in 2 transgenic mouse models with aggressive PDAC in combination with an antibody-PD-1 potentiated cytotoxic immune response. The tumor growth inhibitory effect of XP-524 on PDAC cells was comparable to a combination of JQ-1 and SGC-CBP30. Importantly, SwissTargetPrediction does not compute any off-target (Table 3) with considerable bioactivity, but its 2D and 3D structure similarity profile is similar to compounds that interact with CDK2 and CDK1 that control cell cycle progression and then with BACE1 and BACE2 expression of which is associated with poor prognosis (Farris et al., 2021), as well as bradykinin B2 receptor agonists that increase lateral drug delivery across the vascular wall in malignant brain tumors by enhancing the half-life of the drug (Sarin et al., 2009).

5. Tolerated doses and pharmacokinetic features

Although the activity of most of above described CBP/p300 inhibitors was tested in animal model (Tables 1–3) and no acute or severe adverse effects were reported, only two of these compounds entered clinical trials. These clinical studies have been actively recruiting patients and the final data collection date for the primary outcome measurement is expected by summer 2024. The administrated doses of NEO2734 and CCS1477 are considerably lower than their maximum recommended tolerated dose (MRTD), which estimates the toxic dose threshold of chemical compounds for humans and helps to guide the starting dose for pharmaceuticals in phase I clinical trials and corresponds more directly to drug amounts tested in mice (Dual BET and CBP/P300 Inhibitor in Patients With Targeted Advanced Solid Tumors - Full Text View - ClinicalTrials.gov; He et al., 2021; Kuang et al., 2022; Morrison-Smith et al., 2020; Pires et al., 2015; Principe et al., 2022; Welti et al., 2021).

Anyway, according to very brief assumptions the doses tested in clinical trials as well as in animal models allow to achieve maximum blood concentration higher than reported IC₅₀ for particular compounds.

The experimentally proven pharmacokinetic features of CBP/p300 inhibitors remain missing and their estimation can only be made by *in silico* tests such as SwissADME, [SwissTargetPrediction, 2023](#) and pkCSM, which serve as starting point for safe and effective therapeutic management of drugs in animal preclinical models and in clinics. These tools compare similarity of new compound chemical structure with a library of other compounds and their impact on proteins and tissues, hence compute and predict biological activity of the drug candidates. Their collation with experimental data outlines the possible anticancer properties of the tested compounds and weak points that require particular monitoring while planning mono- and combined therapies. According to SwissADME, all CBP/p300 inhibitors meet the Lipinski's Rule of 5 and are characterized by required water solubility, whereas their expected intestinal absorption is relatively high, thereby licensing their oral administration as attempted in mice and clinical trials. The higher volume of distribution at steady state (VD_{ss}) for XP-524, NEO2734, I-CBP112 and UMP298 indicates that these compounds can reach significant concentrations in tissues and relatively weakly bind to blood components, whereas more of CCS1477 remains in the plasma. Blood-brain distribution emerges important when a given compound is considered as potential drugs for brain diseases that are driven or mediated by CBP/p300. Most of CBP/p300 inhibitors moderately cross the barrier, whereas A-485, GNE-781 and C646 are poorly distributed to brain, therefore their use for the treatment of gliomas can be limited. The two clinically tested inhibitors are likely substrates of organic cation transporter (OCT2), hence disposed from the body by renal tract, featured by similar and moderate total clearance indicator (CL_{tot}). However, low value of this parameter for A-485 and GNE-781 was not associated with their toxicities in animal studies. The interaction of CBP/p300 inhibitors with cytochrome P450 is key crucial for their metabolism and detoxification, but also for the activity of other drugs in combinatorial treatment schemes. Predicted inhibition of CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4 by acetyltransferase inhibitors may disturb activation of anticancer prodrugs such as cyclophosphamide, ifosfamide, decarbazine, procarbazine and tegafur, whereas metabolism and blood concentration of numerous other anticancer compounds, including tamoxifen, etoposide, idarubicin, topotecan can be substantially altered. In this case, *in silico* absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET) tests may be considered as indicators of possible weak points of therapy that target CBP/P300. In the light of these concerns, however, CBP/P300 inhibitors remain promising drugs for the treatment of cancer and other pathological conditions where these two acetyltransferases play an essential role due to confirmed, desired *in vivo* activity and the lack of reported severe side effects in animal models.

6. Perspectives of chemotherapeutic potential of CBP/p300 inhibitor off-targets

Since the predicted off-targets of CBP/p300 inhibitors play an important role in cancer initiation, progression or resistance, the anticancer potential of these compounds can be considered broader and go beyond previously reported anticancer potential resulting from inhibition of only CBP/p300. Particularly, the possible simultaneous interaction with CBP/p300 and currently known targets that have been used in anticancer therapies emerges likely beneficial. Therefore, in this paragraph we describe some of CBP/p300 off-targets that are clinically relevant in oncology and immune-oncology, as well as compare CBP/p300 inhibitors with clinically tested or FDA approved drugs in light of their interaction with specific protein cavities, particularly with catalytic domains. We made use of molecular docking to predict the binding affinity of both ligands and targets, and to identify the binding sites of the considered compounds.

6.1. Regulation of the cell cycle

The concerted action of cyclins and cyclin-dependent kinases (CDKs) enable cell-cycle transitions, hence cell proliferation and tumor growth. Cyclin D-CDK4/6 complexes induce Rb inactivation in early G1, expression of E2F-dependent genes and gradual increase in CDK2 activity (S. Kim et al., 2022), which promotes DNA replication and drives cell cycle entry to M phase. As long as cyclin-dependent kinase 2 emerged dispensable for mitotic division in normal cells, overexpression of cyclin E, one of the two major protein binding partners of CDK2, occurs in many tumor cells and causes the cells to become dependent on CDK2 and cyclin E (Wood et al., 2019). Furthermore, aberrant activation of CDK2 leads to uncontrolled cell proliferation during oncogenesis in many cancers. Therefore, CDK2 appeared an attractive target for cancer therapy. Most inhibitors against CDK2 are ATP competitors, but very recent study identified novel, protein-protein interaction interface (PPI) between CDK2 and Cyclin A as potential druggable pocket. The first group is represented by PF-07104091 that is being tested as single agent and in combination therapy for solid tumors such as ovarian and lung cancer, also for CDK4/6 inhibitor resistant HR+/HER2-breast cancer (Table 4) (Yap et al., 2023). This compound preferably binds catalytic domain. Very similar profile of interaction with the ATP pocket can be predicted for C646 and UMB298 using CB-Dock2. Bearing in mind that CBP/p300 catalytic domain inhibitor – C646 repressed genes encoding proteins involved in mitotic division such as CDK4, PCNA and cyclin B (Sobczak et al., 2020), then decline in cell cycle promoting factors and simultaneous inhibition of CDK2 in patients with active CDK2 cascades may increase antiproliferative efficacy of CBP/p300 inhibitors.

None of the considered CBP/p300 inhibitors preferably bound to PPI of CDK2, which was successfully targeted with Homoharringtonine (omacetaxine mepesuccinate). This FDA approved drug for the treatment of chronic myeloid leukemia disrupts the interaction between CDK2 and cyclins leading to an autophasic degradation mechanism of CDK2 protein (Zhang, Gan, et al., 2022).

6.2. Signaling cascades

Aberrations in cell signaling pathways and their misbehaviour often cause and sustain cancer. External and internal signals are transmitted via a series of proteins, in an extremely complex and carefully regulated process. In cancer, activity of some signal receivers or transmitters are frequently altered by, for example, up- and downregulation of receptor and signaling mediators, posttranslational modifications or mutations. The precise targeting of hyper- or hypoactive cascades is expected to potentiate the efficacy of killing cancer cells and alleviate detrimental side effects of non-personalized chemotherapy or radiotherapy to the patients.

The majority of solid tumors are explicitly characterized by their mutations in the RAS/RAF/MEK/ERK genes due to genetic and epigenetic alterations, rendering them attractive therapeutic targets and well-established. The role of ERK MAPK signaling in promoting cell proliferation, survival, and tumorigenesis is well-established, but the other arm of evidence suggests contribution of RAF/MEK/ERK signaling to pro-apoptotic signaling *in vitro* and *in vivo* (Sugiura et al., 2021). Anyway, several ERK1/2 inhibitor LY3214996 (Temuterkib) entered clinical trials for the treatment of solid tumors and acute myeloid leukemia (Table 4) (LY3214996 in Patients With AML Who Are Not Candidates for Standard Therapy - Full Text View - ClinicalTrials.gov). Activated ERK1/2 kinases phosphorylate numerous substrates including cytosolic signaling proteins such as p90 ribosomal S6 kinase (RSK), MAPK-interacting serine/threonine kinase (MNK), kinesin family member 5B (KIF5B) as well as transcription factors, such as ETS domain-containing protein Elk-1, proto-oncogenes c-FOS, c-Jun and c-Myc, and cyclic AMP-dependent transcription factor ATF2, located in the nucleus to foster cancer growth and drug resistance. LY3214996 is a competitive and

Table 4

CBP/p300 inhibitors off targets and their current inhibitors.

Off target	Current inhibitors used in anti-cancer therapies	Name of inhibitors
Macrophage colony stimulating factor receptor	• Turalio - Pexidartinib (FDA approved) → tenosynovial giant cell tumor (TGCT) (Cannarile et al., 2017)	A-485
Kinesin-1 heavy chain/Tyrosine-protein kinase receptor RET	• Retevmo - Selpercatinib (FDA approved) → non-small cell lung cancer (NSCLC), thyroid cancer, advanced or metastatic solid tumors • Gavreto - Pralsetinib (FDA approved) (Regua et al., 2022) → non-small cell lung cancer (NSCLC), thyroid cancer	A-485
Dihydroorotate dehydrogenase	• JNJ-74856665 monotherapy and/or in combination (Phase 1 of Clinical Trials - NCT04609826) (X. Yang et al., 2022) → acute myeloid leukemia (AML) or myelodysplastic syndrome (MDS)	C646
Serine/threonine-protein kinase mTOR	• Afinitor - Everolimus (FDA approved) → HR+, HER2- breast cancer, neuroendocrine tumors (NET), renal cell carcinoma, subependymal giant cell astrocytoma (SEGA) • Rapamycin (Fourth FDA approval in 2021) (Mohamed et al., 2022) → advanced metastatic or unresectable malignant perivascular epithelioid tumors • Torisel - Temsirolimus (FDA approved) (Zou et al., 2020) → renal cell carcinoma	C646, SGC-CBP30
Cyclin-dependent kinase 2/cyclin A	• Homoharringtonine /omacetaxine mepesuccinate (FDA approved) (Kantarjian et al., 2013) → chronic myeloid leukemia (CML) • PF-07104091 (Phase 1B/2 of Clinical Trials - NCT05262400 and Phase 1 of Clinical trials - NCT04553133) (Thoma et al., 2021) → small cell lung cancer (SCLC), ovarian cancer, breast cancer, solid tumors	C646
ATP-binding cassette sub-family G member 2	• Uloric - Febuxostat (FDA approved) (Xiao et al., 2021) → chronic management of hyperuricemia in patients with gout • Tariquidar (Phase 1/2 of Clinical Trials - NCT04603066) → neuropathic pain, additionally Tariquidar is still being tested against multidrug resistance in many types of cancer (Lai et al., 2020)	L002, PF-CBP1
P-glycoprotein 1	• Tariquidar (Phase 1/2 of Clinical Trials - NCT04603066) → neuropathic pain, additionally Tariquidar is still being tested against multidrug resistance in many types of cancer (Lai et al., 2020) • Mitotane (Phase 3 of Clinical Trials - NCT03583710, Phase 2 of Clinical Trials - NCT05634577, Evaluation of Adverse Events - NCT05839886, Evaluation of Side Effects - NCT00568139) (Karthika et al., 2022) → adrenocortical carcinoma (ACC)	L002, SGC-CBP30, CPI-637, PF-CBP1, GNE-781
Tumor suppressor p53/oncoprotein Mdm2	• Idasanutlin (Phase 2 of Clinical Trials - NCT04589845, Phase I/II of Clinical Trials - NCT04029688) → acute leukemias, solid tumors • Navtemadlin (Phase 1/2 of Clinical Trials - NCT02825836 and NCT03787602, Phase 1B/2 of Clinical Trials - NCT05705466, Phase 2/3 of Clinical Trials - NCT05797831) (Haronikova et al., 2021) → relapsed/refractory B cell malignancies, mantle cell lymphoma and diffuse large B cell lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, small lymphocytic lymphoma, treatment-naïve B cell malignancies, Merkel cell carcinoma, non-small cell lung cancer, endometrial cancer	SGC-CBP30, PF-CBP1
PI3-kinase p110-alpha subunit	• Zydelig - Idelalisib (FDA approved) → non-Hodgkin's lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, follicular lymphoma (FL) • Aliqopa - Copanlisib (FDA approved) → follicular lymphoma • Copiktra - Duvelisib (FDA approved) → chronic lymphocytic leukemia (CLL), small lymphocytic lymphoma (SLL) • Piqray - Alpelisib (FDA approved) (Bheemanaboina, 2020) → HR positive, HER2-negative, PIK3CA-mutated breast cancer	SGC-CBP30, GNE-781
Tyrosine-protein kinase ABL	• Gleevec - Imatinib (FDA approved) → gastrointestinal stromal tumors, acute myeloid leukemia (AML), chronic myeloid leukemia (CML), acute lymphoblastic leukemia (ALL) • Tasigna - Nilotinib (FDA approved) → chronic myelogenous leukemia (CML) • Sprycel - Dasatinib (FDA approved) → acute lymphoblastic leukemia (ALL), chronic myelogenous leukemia (CML) • Iclusig - Ponatinib (FDA approved) → acute lymphoblastic leukemia (ALL), chronic myeloid leukemia (CML) • Bosulif - Bosutinib (FDA approved) (Negi et al., 2021) → chronic myelogenous leukemia (CML)	SGC-CBP30, I-CBP112, PF-CBP1
Tyrosine-protein kinase SRC	• Inlyta - Axitinib (Luttmann et al., 2021) (FDA approved) → renal cell carcinoma • Sprycel - Dasatinib (FDA approved) → acute lymphoblastic leukemia (ALL), chronic myelogenous leukemia (CML) • Jakafi - Ruxolitinib (FDA approved) (Negi et al., 2021) → myelofibrosis, polycythemia vera, and graft-versus-host disease	I-CBP112
Serine/threonine-protein kinase RAF	• Zelboraf - Vemurafenib (FDA approved) → metastatic melanoma with BRAF V600E mutation • Tafinlar - Dabrafenib (FDA approved) → non-small cell lung cancer, melanoma, thyroid cancer, solid tumors, and low-grade glioma with BRAF V600 mutations	CPI-637
C-C chemokine receptor type 2	• Braftovi - Encorafenib in combination (FDA approved) → metastatic melanoma with a BRAF V600E or V600K mutation, metastatic colorectal cancer (CRC) with a BRAF V600E mutation • BMS-813160 in combination with Nivolumab (Phase 1/2 of Clinical Trials - NCT03767582, Phase 2 of Clinical Trials - NCT04123379) → locally advanced pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), pancreatic ductal adenocarcinoma, non-small cell lung cancer, hepatocellular carcinoma	PF-CBP1
ALK tyrosine kinase receptor	• Alecensa - Alectinib (FDA approved) → non-small cell lung cancer (NSCLC) • Xalkori - Crizotinib (FDA approved) → non-small cell lung cancer (NSCLC), inflammatory myofibroblastic tumor (IMT), lymphoma	CCS1477, UMB298
MAP kinase ERK2	• Rozlytrek - Entrectinib (FDA approved) → non-small cell lung cancer (NSCLC), solid tumors • Lorbrena - Lorlatinib (FDA approved) → non-small cell lung cancer (NSCLC) • Alunbrig - Brigatinib (FDA approved) (Della Corte et al., 2018) → non-small cell lung cancer (NSCLC) • LY3214996 (Phase 1 of Clinical Trials - NCT04916236, NCT04081259, Phase 1/2 of Clinical Trials - NCT04616183, Phase 2 of Clinical Trials - NCT04534283, NCT04386057) → pancreatic cancer, colorectal cancer, non-small cell lung cancer, KRAS mutation-related tumors, acute myeloid leukemia, metastatic colon adenocarcinoma, metastatic colorectal carcinoma, metastatic rectal adenocarcinoma and other	UMB298, NEO2734
Poly [ADP-ribose] polymerase-1	• Talzenna - Talazoparib (First approved by FDA - October 16, 2018) → breast cancer, prostate cancer • Lynparza - Olaparib (First approved by FDA - December 19, 2014) → ovarian cancer, breast cancer,	CCS1477, L002

Table 4 (continued)

Off target	Current inhibitors used in anti-cancer therapies	Name of inhibitors
Poly [ADP-ribose] polymerase-10	<p>pancreatic cancer, prostate cancer, fallopian tube cancer, peritoneal cancer</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zejula - Niraparib (First approved by FDA - March 27, 2017) → ovarian cancer, fallopian tube cancer, primary peritoneal cancer • Rubraca - Rucaparib (First approved by FDA December 19, 2016) → ovarian cancer, prostate cancer • Veliparib - ABT-888 (Phase 1–3 of Clinical Trials – monotherapy or combined therapy (for example with Carboplatin or Paclitaxel - NCT02163694, NCT02470585, NCT01386385, Cisplatin - NCT02595905, Temozolomide - NCT02152982; Status: 22/106 - active, not recruiting; 2/106 - recruiting) → triple negative breast cancer, malignant solid neoplasm, breast carcinoma, anaplastic astrocytoma, glioblastoma, malignant glioma, breast cancer, ovarian cancer, ovarian neoplasm, acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia, non-small cell lung cancer • Veliparib - ABT-888 (Phase 1–3 of Clinical Trials – monotherapy or combined therapy (for example with Carboplatin or Paclitaxel - NCT02163694, NCT02470585, NCT01386385, Cisplatin - NCT02595905, Temozolomide - NCT02152982; Status: 22/106 - active, not recruiting; 2/106 - recruiting) → triple negative breast cancer, malignant solid neoplasm, breast carcinoma, anaplastic astrocytoma, glioblastoma, malignant glioma, breast cancer, ovarian cancer, ovarian neoplasm, acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia, non-small cell lung cancer 	L002

relatively specific inhibitor of two similar kinases ERK1 and ERK2 that targets ATP binding cavity and the following amino acid motif: Ile31-Gly32-Glu33-Gly34-Val39-Ala52-Lys54 (Hong et al., 2022). These residues are likely interacting with two CBP/p300 inhibitors – UMB298 and NEO2734 as predicted by *in silico* molecular docking using CB-Dock2.

p53-MDM2 hub is suggested to play a critical role of in consolidating diverse stress signaling pathways to determine cell fates such as cell cycle arrest, senescence and programmed cell death, immune response, and regulation of tumor microenvironment to name only a few, in response to oncogenic stresses or damaging agents during anticancer therapy. The tumor-suppressor and transcription factor p53 (encoded by *TP53*) it is the most frequently altered in cancers and p53 deregulation drives malignancy, cancer cell proliferation and metastases via numerous mechanisms including p53-p21-RB-E2F1 pathway that controls transcription of genes involved in cell cycle progression (Engeland, 2022). E3 ubiquitin ligase MDM2 promotes ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53 and p21. MDM2 overexpression and *MDM2* amplification were detected in many human malignancies, including lung, colon and other cancers, and are associated with chemotherapeutic resistance via p53-MDM2 loop-dependent and p53-MDM2 loop-independent pathways (Hou et al., 2019). Therefore, targeting p53-MDM2 protein-protein interaction is a promising therapeutic strategy to restore the physiological function of the wild-type p53 in cancer cells. The ongoing clinical trials test Idasanutlin and Navtemadlin, majorly for the treatment of leukemias and some solid tumors (Table 4). These two compounds preferably interact with p53-MDM2 protein-protein binding surface that spans the crucial LEU33-GLY37-MET41 motif located in cavity between 33 and 80 amino acid residues of MDM2. This binding profile with MDM2 is characteristic for Nutlin 3A and RG7112 (Al-Ghabkari & Narendran, 2019; Andreeff et al., 2016) that are referred as a control in this paper due to previously published reports, which disclosed amino acids of both MDM2 and p53 interacting with Nutlin 3A and RG7112. Although this characteristic motif was also found among MDM2 residues that bound PF-CBP1 and SGC-CBP30 during molecular docking using CB-Dock2, the spatial arrangement of these two compounds differed from the above described and known p53-MDM2 inhibitors. Therefore, further analyses and experimental studies are needed to verify whether their occurrence at the p53-MDM2 binding surface forms a spatial hindrance that is potent to prevent the formation of p53-MDM2 complex.

KIF5B-RET is a fusion oncprotein that was recognized as a primary driver in a relatively small subset of lung adenocarcinomas (Das & Cagan, 2017), which comprises approximately 1–2%. The kinesin and kinase domains of KIF5B-RET act together and mediate signals through a multi-kinase signaling hub comprising RET, SRC, EGFR and FGFR,

hence drug targeting RET alone work poorly in KIF5B-RET-transformed cells. In the Chinese LAD patients this fusion protein was associated with multilevel activation of STAT3, which promoted proliferation and tumorigenicity (Qian et al., 2014). The predicted profile of A-485 interaction with KIF5B-RET matches ATP binding domain (Shang et al., 2014), similarly to Pralsetinib and Selpercatinib – two KIF5B-RET inhibitors approved by FDA for the treatment of RET fusion-positive non-small cell lung cancer and locally advanced or metastatic RET fusion-positive solid tumors, respectively (Table 4).

Three CBP/p300 bromodomain inhibitors may possibly interact with ABL1, which acts as proto-oncogene and tumor suppressor depending on the context. For example, in AML1-ETO and NUP98-PMX1 leukemias ABL1 is often deleted to enhance PI3K, DNA-PKcs and ATR signalling thereby ensuring growth factor independence and improves DNA damage response (Golovine et al., 2023), but also promotes epithelial-to-mesenchymal transition, metastases and solid tumor progression (Luttmann et al., 2021). Mutations and deletions in SH3 domain, which negatively regulates ABL1 activity, results in an oncogene, whereas ABL1 fusion to a variety of translocation partner genes, for example BCR, are frequently reported in leukemias (ABL1 *ABL Proto-Oncogene 1, Non-Receptor Tyrosine Kinase [Homo Sapiens (Human)] - Gene - NCBI*). And BCR-ABL1-driven leukemias are treated with several ABL1 inhibitors, and two of them, namely Imatinib and Axitinib, are administrated for the therapy of gastrointestinal stromal tumors and renal carcinoma, respectively, due to targeting multiple tyrosine kinase receptors (Table 4). As for ABL1, Imatinib and Dasatinib were shown to interact with enzyme catalytic domain and ATP binding pocket. Also PD173955, a non-clinical, is a potent inhibitor of BCR-ABL1 and SRC tyrosine kinase family, as well as SGC-CBP30, I-CBP112 and PF-CBP1 showed similar profile of interaction with amino acid residues of ABL1 according to CB-Dock2, thereby suggesting that CBP/p300 bromodomain inhibitors can be taken into further, experimental studies aiming at their validation as potent ABL1 inhibitors.

6.3. Metabolic pathways

Oncogenic transformation rewires cellular metabolism to sustain elevated rates of growth and divisions, since such abnormal cancer cell proliferation requires energy, amino acids, acetyl-CoA and nucleotides (Keibler et al., 2016). The high pyrimidine flux is indispensable to meet additional requirements of cancer cell for nucleic acids and other cellular components synthesis. The fourth out of six steps of pyrimidine *de novo* biosynthesis is catalyzed by dihydroorotate dehydrogenase - DHODH, flavin-dependent mitochondrial enzyme. Therefore, limitation in pyrimidine supply is being considered as a promising strategy for cancer treatment. Up to date, ten inhibitors of DHODH entered clinical

trials, two of which were approved by FDA (Zhang, Zhang, et al., 2022). JNJ-74856665, a novel DHODH inhibitor, is still under Phase I clinical trial evaluation for the treatment of acute myeloid leukemia (AML) or myelodysplastic syndrome (MDS) (Table 4). This compound interacts with the enzyme binding site for flavin mononucleotide, thereby inhibiting oxidation of dihydroorotate. That oxidizes dihydroorotate to orotate, which is converted to cytosine triphosphate (CTP) and deoxyuridine monophosphate (dUMP) by another enzymes. According to molecular docking, catalytic activity inhibitor of CBP/p300 – C646 may interact with 27 amino acid residues of DHODH, and shares 23 in common with JNJ-74856665 according to *in silico* modeling using CB-Dock2. Such a similarity makes C646 attractive for further experimental evaluation in terms of DHODH inhibition and relevant dosing, particularly, when some of previously developed inhibitors were withdrawn from clinical trials or trials were terminated due to the lack of sufficient clinical benefits (Abdullah, 2021; Bayer, 2021).

6.4. DNA repair by PARPs

By *inter alia* repressing CDK4/6, PCNA and CCNB (Sobczak et al., 2020; Waddell et al., 2021; Wasner et al., 2003) some of CBP/p300 inhibitors were reported to arrest mitotic divisions, which define transcription of PARP1 – NAD-dependent enzyme involved in numerous intracellular processes, while being mostly known from its role in DNA repair. ADP-ribosylation of chromatin-associated proteins and physical protein-protein interaction with DNA repair machinery components such as MARVELD1, XRCC1, HPF1, CARM1 and many other facilitate removal of DNA lesions (Pankey & Black, 2021; Ray Chaudhuri & Nussenzweig, 2017; Reber et al., 2023; H. Sun et al., 2023). This led some of PARP inhibitors to clinical trials and in BRCA1/2-mutated tumors, where dual BRCA and PARP deficiency results in synthetic lethality and cancer cell death. Conceivably, some of CBP/p300 inhibitors may act in a triple, disadvantageous for cancer way: specifically targeting acetyltransferase activity, arresting mitotic divisions, impairing DNA repair by repressing PARP1 and declining enzymatic activity of PARP1 and PARP10. The latter enzyme, which is overexpressed in numerous human tumors, promotes cancer cell proliferation by alleviating replication stress and lesion bypass by recruiting specialized, non-replicative DNA polymerases (Schleicher et al., 2018). Inhibitors of both enzymes interact with NAD-binding domain and accordingly Gly863-Ser904-Tyr907 motif in PARP1, and Gly888-Ala921-Ser927-Tyr932 in PARP10 as predicted with CB-Dock2. FDA approved indications for PARP inhibitors (Olaparib, Rucaparib, Niraparib) in the management of ovarian cancer include maintenance following response to platinum-based chemotherapy, Talazoparib is recommended for the treatment of BRCA-mutated HER2-negative breast cancer and HRR gene-mutated metastatic castration-resistant prostate cancer, whereas Veliparib is still under investigation, but received FDA Orphan Drug Designation for the treatment of advanced squamous non-small cell lung cancer (Table 4). Molecular docking suggest that catalytic inhibitor of CBP/p300 – L002 may interact with catalytic domain of PARP1 and PARP10, similarly to above described PARP inhibitors. If confirmed, the reduction of PARP activity complementary to CBP/p300 inhibition of acetyltransferase may potentiate anticancer activity of L002, particularly in BRCA-mutated background. PARP1 appeared in the list of CCS1477 off-targets according to SwissTargetPrediction. As same as L002, it may interact with NAD-binding pocket, hence possibly compete with substrate and decline PARP1 activity or trap the enzyme at the DNA damage site. However, none of our predicting tools allows to anticipate on the mechanism of L002 and CCS1477 action with regard to their possible catalytic inhibition of PARPs or potency in triggering formation of PARP-DNA complexes, which are more cytotoxic than unrepaired single-strand breaks caused by PARP inactivation (Murai et al., 2012).

6.5. Multidrug resistance mediated by membrane proteins

Another aspect relevant to cancer treatment is chemotherapy failure due to *inter alia* limitation of various anti-cancer drugs from entering tumor tissues. Three CBP/p300 inhibitors, namely L002, PF-CBP1 and I-CBP112, emerged possibly interacting with two key multidrug resistance proteins such as P-glycoprotein (ABCB1) and BRCP (ABCG2), which export xeno- and endobiotics from the interior of the tumor cells or sequester them inside some organelles, but also strongly alter the pharmacokinetic (PK) properties of various chemotherapy drugs (Pilotto Heming et al., 2022). Although these two proteins is linked to drug resistance and four generations of primarily P-glycoprotein or P-glycoprotein/BRCP dual inhibitors were developed, none of these compounds provides benefits that outweigh its known and potential risks cancer therapies. Current anticancer approaches target majorly drug binding pocket rather than nucleotide (ATP) binding domain of P-glycoprotein and BRCP (Kowal et al., 2021; J.-Q. Wang et al., 2019). Dual P-gp/BCRP inhibitor – Tariquidar shares similarity in the binding profile to 5-cyano-6-phenylpyrimidin derivative, an another dual inhibitor with the documented amino acid residues of both enzymes involved in protein-ligand interaction. This compound entered clinical trials, which have already been completed or terminated, but has not been approved by FDA yet for combined chemotherapy (Table 4). The three anticancer drugs and BRCP substrates, namely topotecan, mitoxantrone and doxorubicin, CBP/p300 inhibitors – L002 and PF-CBP1, and another clinically-relevant BRCP inhibitor – Uloric (Febuxostat) as same as Tariquidar appeared to possibly interact with at least five amino acid residues that create the following motif - Thr435-Asn436-Phe439-Thr542-Met549 according to modeling in CB-Dock2. The above mentioned Uloric was approved by FDA for the treatment of non-cancer disease, but his repurposing to cancer treatment is feasible since resent studies documented decline in BCRP-mediated efflux of BRCP substrates in the intestine (Lehtisalo et al., 2020) and anticancer drugs in chronic myeloid leukemia (CML) cells (Ito et al., 2021).

Although predicting tools such as SwissTargetPrediction and pkSCM indicated that L002 as well as all bromodomain and dual CBP/p300 inhibitors may inhibit activity of P-glycoprotein, only members of the last group and CCS1477 phenocopied the binding profile of Tariquidar and Mitotane, which is still under clinical evaluation in terms of safety profile and increasing chemotherapy efficacy in adrenocortical cancer (NCT00568139, NCT05634577, NCT03583710) (Table 4) (*A Phase II Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Pembrolizumab in Combination With Mitotane in Patients With Advanced Adrenocortical Carcinoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov; Evaluation of Side Effects of Mitotane - Full Text View - ClinicalTrials.gov; Mitotane With or Without Cisplatin and Etoposide After Surgery in Treating Patients With Stage I-III Adrenocortical Cancer With High Risk of Recurrence - Full Text View - ClinicalTrials.gov*). The last two confirmed P-glycoprotein inhibitors and three CBP/p300 inhibitors, namely CCS1477, NEO2734 and XP-524, agreeably interacted with C3 cavity within extracellular, drug binding domains of the enzyme. Once the interaction with cavity 3 can be considered as inhibitory mechanism, the three CBP/p300 inhibitors appear as attractive candidates for an anti-efflux and, hopefully, anti-multidrug resistant agents in cancers surviving the standard chemotherapy due to overexpression or overactivity of P-glycoproteins. Bearing in mind their attractive profile of single anticancer properties in the *in vitro* and *in vivo* tests, further studies on their impact on combined anticancer therapies with standard chemotherapy drugs, which more than once are substrates of P-glycoprotein and other ABC proteins, might emerge attractive to improve anticancer drug retention inside cancer cells.

Molecular docking indicated that other CBP/p300 inhibitors interacted preferably with somehow overlapping cavities 1 and 2 of P-glycoprotein, among which cavity 1 is primarily bound by

chemotherapy drug – doxorubicin previously reported as a substrate, but also inducer of P-glycoprotein overexpression. This suggests that the compound binding to cavity 3 may be associated with its inhibitory impact on P-glycoprotein activity, whereas the interaction with cavity 1 and 2 rather suggests P-glycoprotein mediated transport across membranes than inhibition of the enzyme. Anyway, this highly speculative and far-going concept requires experimental validation. Particularly, when at least four pharmacologically distinct drug binding sites within the transmembrane domain of P-glycoprotein were identified and assigned to poly-specificity of this ABC transporter (Mittra et al., 2017).

On the other hand, the interaction of CBP/p300 inhibitors with substrate binding domains of multidrug resistance proteins may cause their efflux thereby limiting their availability inside cells and inhibition of intracellular target and off-target enzymes.

6.6. Immuno-oncology

Some of CBP/p300 inhibitors may interact with receptors for the two key immunology ligands such as M-CSF (CFS1) and CCL2 (MCP1), which promote cancer well-being by directly activating cancer cells and by affecting monocyte/macrophage responses. Interaction of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF or CSF1) with its receptor (CSF1) drives differentiation of macrophages, some of which infiltrate solid tumors and can represent up to 50% of the tumor mass, where they contribute to each stage of cancer development and progression by releasing cytokines, growth factors, extracellular matrix-degrading enzymes, angiogenic factors and by inhibiting cytotoxic T-cell activity (M2-like phenotype). Higher expression levels of M-CSF correlate with higher histological tumor grading, more frequent metastases and poor prognosis in various cancer types, including breast cancer, serous and mucinous ovarian epithelial tumors, endometrioid carcinomas, and papillary renal cell carcinoma (Laoui et al., 2014). Overstimulation of CSF1-R promotes development of rare proliferative tenosynovial giant cell tumor (Lamb, 2019) that arises from the synovium, bursae, or tendon sheaths. Pexidartinib (TURALIO™, Daiichi Sankyo), an oral tyrosine kinase inhibitor with selective inhibition of CSF1-R, was proved by FDA in 2019 as the systemic therapy for adult patients with symptomatic tenosynovial giant cell tumor associated with severe morbidity or functional limitations that were not amenable to improvement with surgery (Table 4) (Monestime & Lazaridis, 2020). According to molecular docking with CB-Dock2, A-485 may bind the same domain in CSF1R as Pexidartinib and other potent CSF1R inhibitor – Vimseitinib. The two latter compounds interact with ATP binding site, and A-485 similarly to Vimseitinib is predicted to contact Lys616, Glu633, Met637, His776, Gly795, Asp796, Phe797 motif and deeply penetrates ATP binding cavity. Whether this interaction may compete with ATP requires experimental verification. If confirmed patients diagnosed with CBP/p300 and CSFR1 positive tumors could benefit from dual anticancer activity of A-485 that includes CBP/p300 specific antiproliferative and antimetastatic activity in cancer cells and immunomodulatory role in macrophages.

CCL2–CCR2 axis were taken into focus as target in immune-oncology since it acts as a monocyte chemoattractant and increases the recruitment of tumor-associated macrophages into the tumor microenvironment (Iwamoto et al., 2020). However, recent study reported direct impact of this cascade on cancer cell proliferation and migration via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway, Rac GTPase, activation of matrix metalloproteinase (MMP) 2, MMP9, Vimentin, Snail, and E-cadherin expression in cancer cells as well as on induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) via Transducers and Activator of Transcription 3 (STAT3) activation and IL6 overproduction. Ongoing clinical trials test efficacy of CCR2/5 dual antagonist - BMS-813160 in combination with immunomodulatory drugs such as Nivolumab and BMS-986253 (Table 4), and with standard chemotherapy based on Paclitaxel-derivatives,

Gemcitabine, Irinotecan, GVAX, Leucovorin, 5-Fluorouracil and other in pancreatic, renal, colorectal, lung and hepatocellular cancer. The predicted binding sites for BMS-813160 and PF-CBP1 span orthosteric pocket of the receptor that is localized on the extracellular side and was reported to be a key binding site for orthosteric BMS-681 antagonist that was capable of interfering with the chemokine binding (Y. Zheng et al., 2016). This suggests that PF-CBP1 may be considered as possible antagonist of CCR2. The anticancer properties of this compound resulting from specific targeting CBP/p300 could be potentiated in CCR2 expressing cells.

7. Conclusions / summary

Although all above-described interactions between CBP/P300 inhibitors and off-targets require experimental evidence in both *in vitro* and *in vivo* models, the possible benefits of simultaneous targeting of CBP/p300 and non-CBP/p300 cancer relevant proteins should be taken into consideration. Particularly, when some of these compounds likely interact with two or more therapeutically important off-targets or inhibit and repress several mediators within the same signaling cascade. Development of personalized medicine, which is based on profiling of genomes, transcriptomes and proteomes, allows to disclose cancer weakness in the individual patients. Therefore, the possible interaction of CBP/p300 inhibitors with identified fusion proteins, mutated or non-mutated gene products, overexpressed signal mediators or cancer distinctive drivers, may result in a more promising and desired outcome. Ideally, once the off-target activity of CBP/p300 inhibitors is confirmed in non-toxic doses, some of FDA approved or clinically tested drug candidates such as these listed above can be replaced or complemented by acetyltransferase inhibitors that will additionally repress CBP/P300-dependent gene transcription. If they have failed in monotherapy like single BET inhibitors, a combination with small molecule inhibitors of Abl, VEGFR, or mTOR kinases, CDK4/6, PARPs, which have been approved by the FDA, or standard chemotherapeutics may increase the efficacy of the therapy.

CRediT authorship contribution statement

Magdalena Strachowska: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Agnieszka Robaszkiewicz:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

Not Applicable.

References

- Abdullah, K. (2021). An open-label surgical window of opportunity study evaluating pharmacodynamic response of orally administered BAY 2402234 in subjects with recurrent glioma, IDH mutant, grade 3 or 4 (Clinical Trial Registration NCT05061251). <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05061251>.
- Al-Ghabbaki, A., & Narendran, A. (2019). In vitro characterization of a potent p53-MDM2 inhibitor, RG7112 in neuroblastoma cancer cell lines. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 34(4), 252–257. <https://doi.org/10.1089/cbr.2018.2732>.
- Andreeff, M., Kelly, K. R., Yee, K., Assouline, S., Strair, R., Popplewell, L., ... Kojima, K. (2016). Results of the phase I trial of RG7112, a small-molecule MDM2 antagonist in

- leukemia. *Clinical Cancer Research* 22(4), 868–876. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0481>.
- Ballou, Y., Rivas, A., Belmont, A., Patel, L., Amaya, C., Lipson, S., Khayou, T., Dickerson, E., Nahleh, Z., & Bryan, B. (2018). 5-HT serotonin receptors modulate mitogenic signaling and impact tumor cell viability. *Molecular and Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.3892/mco.2018.1681>.
- Bardwell, L. (2020). Cancer mutations: Molecular MEKanisms. *Current Biology* 30(5), R222–R224. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.01.039>.
- Bayer (2021). An open-label, multicenter phase 1 study to characterize the safety, tolerability, preliminary antileukemic activity, pharmacokinetics, and maximum tolerated dose of pharmacological active dose of Bay2402234 in patients with advanced myeloid malignancies (Clinical Trial Registration NCT03404726). <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03404726>.
- Bemanian, V., Noone, J. C., Sauer, T., Touma, J., Vetvik, K., Söderberg-Naucler, C., ... Geisler, J. (2018). Somatic EP300-G211S mutations are associated with overall somatic mutational patterns and breast cancer specific survival in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 172(2), 339–351. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4927-3>.
- Bheemanaboina, R. R. Y. (2020). Isoform-selective PI3K inhibitors for various diseases. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 20(12), 1074–1092. <https://doi.org/10.2174/15680266200106141717>.
- Bi, X., Jiang, B., Zhou, J., Fan, X., Yan, X., Liang, J., ... Yin, Z. (2021). CBP Bromodomain inhibition rescues mice from lethal sepsis through blocking HMGB1-mediated inflammatory responses. *Frontiers in Immunology* 11, Article 625542. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.625542>.
- Birbo, B., Madu, E. E., Madu, C. O., Jain, A., & Lu, Y. (2021). Role of HSP90 in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 22(19), 10317. <https://doi.org/10.3390/ijms221910317>.
- Bowers, E. M., Yan, G., Mukherjee, C., Orry, A., Wang, L., Holbert, M. A., ... Cole, P. A. (2010). Virtual ligand screening of the p300/CBP histone acetyltransferase: Identification of a selective small molecule inhibitor. *Chemistry & Biology* 17(5), 471–482. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.03.006>.
- Braicu, B., Busuioc, D., Gulei, R., Rusu, I., Atanasov, S., & Ionescu, & Berindan-Neagoe. (2019). A comprehensive review on MAPK: A promising therapeutic target in cancer. *Cancers* 11(10), 1618. <https://doi.org/10.3390/cancers11101618>.
- Brooks, N., Knurowski, T., Hughes, A., Clegg, K., West, W., Pegg, N. A., ... Somervaille, T. C. P. (2021). CCS1477, a novel p300/CBP bromodomain inhibitor, enhances efficacy of azacitidine and venetoclax in pre-clinical models of acute myeloid leukaemia and lymphoma. *Blood* 138(Supplement 1), 3291. <https://doi.org/10.1182/blood-2021-148295>.
- Brooks, N., Raju, M., Young, B. W., Spencer, G. J., Somervaille, T. C., & Pegg, N. A. (2019). CCS1477: A novel small molecule inhibitor of p300/CBP bromodomain for the treatment of acute myeloid leukaemia and multiple myeloma. *Blood* 134(Supplement 1), 2560. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-124707>.
- Burotto, M., Chiou, V. L., Lee, J., & Kohn, E. C. (2014). The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. *Cancer* 120(22), 3446–3456. <https://doi.org/10.1002/cncr.28864>.
- Cannarile, M. A., Weisser, M., Jacob, W., Jegg, A.-M., Ries, C. H., & Rüttinger, D. (2017). Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. *Journal for Immunotherapy of Cancer* 5(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0257-y>.
- Castillo, J., Wu, E., Lowe, C., Srinivasan, S., McCord, R., Wagle, M. -C., ... Mounir, Z. (2019). CBP/p300 drives the differentiation of regulatory T cells through transcriptional and non-transcriptional mechanisms. *Cancer Research* 79(15), 3916–3927. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3622>.
- Chekler, E. L. P., Pellegrino, J. A., Lanz, T. A., Denny, R. A., Flick, A. C., Coe, J., ... Jones, L. H. (2015). Transcriptional profiling of a selective CREB binding protein bromodomain inhibitor highlights therapeutic opportunities. *Chemistry & Biology* 22(12), 1588–1596. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.10.013>.
- Chelladurai, P., Boucherat, O., Stenmark, K., Kracht, M., Seeger, W., Bauer, U., ... Pullamsetti, S. S. (2021). Targeting histone acetylation in pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy. *British Journal of Pharmacology* 178(1), 54–71. <https://doi.org/10.1111/bph.14932>.
- Chen, Q., Yang, B., Liu, X., Zhang, X. D., Zhang, L., & Liu, T. (2022). Histone acetyltransferases CBP/p300 in tumorigenesis and CBP/p300 inhibitors as promising novel anticancer agents. *Theranostics* 12(11), 4935–4948. <https://doi.org/10.7150/thno.73223>.
- Conery, A. R., Centore, R. C., Neiss, A., Keller, P. J., Joshi, S., Spillane, K. L., ... Sims, R. J. (2016). Bromodomain inhibition of the transcriptional coactivators CBP/EP300 as a therapeutic strategy to target the IRF4 network in multiple myeloma. *eLife* 5, Article e10483. <https://doi.org/10.7554/eLife.10483>.
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2019). SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Research* 47(W1), W357–W364. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz382>.
- Dallas, P. B., Cheney, I. W., Liao, D. -W., Bowrin, V., Byam, W., Pacchione, S., ... Moran, E. (1998). P300/CREB binding protein-related protein p270 is a component of mammalian SWI/SNF complexes. *Molecular and Cellular Biology* 18(6), 3596–3603. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.6.3596>.
- Dancy, B. M., & Cole, P. A. (2015). Protein lysine acetylation by p300/CBP. *Chemical Reviews* 115(6), 2419–2452. <https://doi.org/10.1021/cr500452k>.
- Das, T. K., & Cagan, R. L. (2017). KIF5B-RET oncoprotein signals through a multi-kinase signaling hub. *Cell Reports* 20(10), 2368–2383. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.037>.
- Della Corte, C. M., Viscardi, G., Di Liello, R., Fasano, M., Martinelli, E., Troiani, T., ... Morgillo, F. (2018). Role and targeting of anaplastic lymphoma kinase in cancer. *Molecular Cancer* 17(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0776-2>.
- Delvecchio, M., Gaucher, J., Aguilera-Gurrieri, C., Ortega, E., & Panne, D. (2013). Structure of the p300 catalytic core and implications for chromatin targeting and HAT regulation. *Nature Structural & Molecular Biology* 20(9), 1040–1046. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2642>.
- Durban, A. D., Wang, T., Wimalasena, V. K., Zimmerman, M. W., Li, D., Dharia, N. V., ... Qi, J. (2022). EP300 selectively controls the enhancer landscape of MYCN -amplified neuroblastoma. *Cancer Discovery* 12(3), 730–751. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0385>.
- Dutto, I., Scalera, C., Tillhon, M., Ticli, G., Passaniti, G., Cazzalini, O., ... Prosperi, E. (2020). Mutations in CREBBP and EP300 genes affect DNA repair of oxidative damage in Rubinstein-Taybi syndrome cells. *Carcinogenesis* 41(3), 257–266. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgz149>.
- Ebrahimi, A., Sevinç, K., Gürhan Sevinç, G., Cribbs, A. P., Philpott, M., Uyulur, F., ... Önder, T. T. (2019). Bromodomain inhibition of the coactivators CBP/EP300 facilitate cellular reprogramming. *Nature Chemical Biology* 15(5), 519–528. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0264-z>.
- Engeland, K. (2022). Cell cycle regulation: P53-p21-RB signaling. *Cell Death and Differentiation* 29(5), 946–960. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z>.
- Fan, Z., Wu, J., Chen, Q., Lyu, A., Chen, J., Sun, Y., Lyu, Q., Zhao, Y., Guo, A., Liao, Z., Yang, Y., Zhu, S., Jiang, X., Chen, B., & Xiao, Q. (2020). Type 2 diabetes-induced overactivation of P300 contributes to skeletal muscle atrophy by inhibiting autophagic flux. *Life Sciences* 258, Article 118243. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118243>.
- Farría, A., Li, W., & Dent, S. Y. R. (2015). KATs in cancer: Functions and therapies. *Oncogene* 34(38), 4901–4913. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.453>.
- Farris, F., Matafona, V., & Bach, A. (2021). The emerging role of β-secretases in cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 40(1), 147. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01953-3>.
- Fauquier, L., Azzag, K., Parra, M. A. M., Quillien, A., Boulet, M., Diouf, S., ... Vandell, L. (2018). CBP and P300 regulate distinct gene networks required for human primary myoblast differentiation and muscle integrity. *Scientific Reports* 8(1), 12629. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31102-4>.
- Feng, L., Yu, S., Wang, H., Yang, S., Li, X., Dai, H., ... Wang, Y. (2021). Synthesis and biological evaluation of spirocyclic chromane derivatives as a potential treatment of prostate cancer. *Molecules* 26(11), 3162. <https://doi.org/10.3390/molecules26113162>.
- Fhu, C. W., & Ali, A. (2020). Fatty acid synthase: An emerging target in cancer. *Molecules* 25(17), 3935. <https://doi.org/10.3390/molecules25173935>.
- Freedman, S. J., Sun, Z.-Y. J., Poy, F., Kung, A. L., Livingston, D. M., Wagner, G., & Eck, M. J. (2002). Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1α. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(8), 5367–5372. <https://doi.org/10.1073/pnas.082117899>.
- Gallenkamp, D., Gelato, K. A., Haendler, B., & Weinmann, H. (2014). Bromodomains and their pharmacological inhibitors. *ChemMedChem* 9(3), 438–464. <https://doi.org/10.1002/cmcd.201300434>.
- García-Carpizo, V., Ruiz-Llorente, S., Sarmentero, J., Graña-Castro, O., Pisano, D. G., & Barrero, M. J. (2018). CREBBP/EP300 bromodomains are critical to sustain the GATA1/MYC regulatory axis in proliferation. *Epigenetics & Chromatin* 11(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0197-x>.
- van Gils, N., Martínez Canales, T., Vermue, E., Rutten, A., Denkers, F., van der Deure, T., ... Smits, L. (2021). The novel oral BET-CBP/p300 dual inhibitor NEO2734 is highly effective in eradicating acute myeloid leukemia blasts and stem/progenitor cells. *HemaSphere* 5(8), Article e610. <https://doi.org/10.1097/HSP.0000000000000610>.
- Golovine, K., Abalakov, G., Lian, Z., Chatila, S., Karami, A., Chitralkar, K. N., ... Skorski, T. (2023). ABL1 kinase as a tumor suppressor in AML1-ETO and NUP98-PMX1 leukemias. *Blood Cancer Journal* 13(1), 42. <https://doi.org/10.1038/s41408-023-00810-0>.
- Gong, Y., Dou, Y., Wang, L., Wang, X., & Zhao, Z. (2022). EP300 promotes renal tubular epithelial cell fibrosis by increasing HIF2α expression in diabetic nephropathy. *Cellular Signalling* 98, Article 110407. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110407>.
- Hammitzsch, A., Tallant, C., Fedorov, O., O'Mahony, A., Brennan, P. E., Hay, D. A., ... Bowness, P. (2015). CBP30, a selective CBP/p300 bromodomain inhibitor, suppresses human Th17 responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(34), 10768–10773. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501956112>.
- Han, N., Jin, K., He, K., Cao, J., & Teng, L. (2011). Protease-activated receptors in cancer: A systematic review. *Oncology Letters* 2(4), 599–608. <https://doi.org/10.3892/ol.2011.291>.
- Haronikova, L., Bonczek, O., Zatloukalova, P., Kokas-Zavadil, F., Kucerikova, M., Coates, P. J., ... Vojetsek, B. (2021). Resistance mechanisms to inhibitors of p53-MDM2 interactions in cancer therapy: Can we overcome them? *Cellular & Molecular Biology Letters* 26(1), 53. <https://doi.org/10.1168/s11658-021-00293-6>.
- Hay, D. A., Fedorov, O., Martin, S., Singleton, D. C., Tallant, C., Wells, C., ... Brennan, P. E. (2014). Discovery and optimization of small-molecule ligands for the CBP/p300 Bromodomains. *Journal of the American Chemical Society* 136(26), 9308–9319. <https://doi.org/10.1021/ja412434f>.
- He, Y., Wei, T., Ye, Z., Orme, J. J., Lin, D., Sheng, H., ... Huang, H. (2021). A noncanonical AR addiction drives enzalutamide resistance in prostate cancer. *Nature Communications* 12(1), 1521. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21860-7>.
- Ilushchuk, I., Ruskoaho, H., Domanskyi, A., Airavaara, M., & Välimäki, M. J. (2021). Domain-independent inhibition of CBP/p300 attenuates α-synuclein aggregation. *ACS Chemical Neuroscience* 12(13), 2273–2279. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.1c00215>.
- Hong, D. G., Lee, S., Kim, J., Yang, S., Lee, M., Ahn, J., ... Lee, J. (2022). Anti-inflammatory and neuroprotective effects of Morin in an MPTP-induced Parkinson's disease model. *International Journal of Molecular Sciences* 23(18), 10578. <https://doi.org/10.3390/ijms231810578>.
- Hou, H., Sun, D., & Zhang, X. (2019). The role of MDM2 amplification and overexpression in therapeutic resistance of malignant tumors. *Cancer Cell International* 19(1), 216. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0937-4>.
- Huo, S., Liu, X., Zhang, S., Lyu, Z., Zhang, J., Wang, Y., Nie, B., & Yue, B. (2021). P300/CBP inhibitor A-485 inhibits the differentiation of osteoclasts and protects against

- osteoporotic bone loss. *International Immunopharmacology* 94, Article 107458. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107458>.
- Ito, F., Miura, M., Fujioka, Y., Abumiya, M., Kobayashi, T., Takahashi, S., Yoshioka, T., Kameoka, Y., & Takahashi, N. (2021). The BCRP inhibitor febuxostat enhances the effect of nilotinib by regulation of intracellular concentration. *International Journal of Hematology* 113(1), 100–105. <https://doi.org/10.1007/s12185-020-03000-x>.
- Iwamoto, H., Izumi, K., & Mizokami, A. (2020). Is the C-C motif ligand 2-C-C chemokine receptor 2 axis a promising target for cancer therapy and diagnosis? *International Journal of Molecular Sciences* 21(23), 9328. <https://doi.org/10.3390/ijms21239328>.
- Ji, C., Xu, W., Ding, H., Chen, Z., Shi, C., Han, J., ... Zhao, Y. (2022). The p300 inhibitor A-485 exerts antitumor activity in growth hormone pituitary adenoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 107(6), e2291–e2300. <https://doi.org/10.1210/cenm/dgac128>.
- Kantarjian, H. M., O'Brien, S., & Cortes, J. (2013). Homoharringtonine/omacetaxine mepesuccinate: The long and winding road to Food and Drug Administration approval. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 13(5), 530–533. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2013.03.017>.
- Karamouzis, M. V., Konstantopoulos, P. A., & Papavassiliou, A. G. (2007). Roles of CREB-binding protein (CBP)/p300 in respiratory epithelium tumorigenesis. *Cell Research* 17(4), 324–332. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.10>.
- Karthika, C., Sureshkumar, R., Zehravi, M., Akter, R., Ali, F., Ramproshad, S., ... Cavalu, S. (2022). Multidrug resistance of cancer cells and the vital role of P-glycoprotein. *Life* 12(6), 897. <https://doi.org/10.3390/life12060897>.
- Keibler, M. A., Wasyleンko, T. M., Kelleher, J. K., Iliopoulos, O., Vander Heiden, M. G., & Stephanopoulos, G. (2016). Metabolic requirements for cancer cell proliferation. *Cancer & Metabolism* 4(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s40170-016-0156-6>.
- Kim, J., He, Y., Tormen, S., Kleindienst, P., Ducoli, L., Restivo, G., ... Detmar, M. (2023). The p300/CBP inhibitor A485 normalizes psoriatic fibroblast gene expression in vitro and reduces psoriasis-like skin inflammation in vivo. *Journal of Investigative Dermatology* 143(3), 431–443.e19. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2022.09.004>.
- Kim, S., Leong, A., Kim, M., & Yang, H. W. (2022). CDK4/6 initiates Rb inactivation and CDK2 activity coordinates cell-cycle commitment and G1/S transition. *Scientific Reports* 12(1), 16810. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20769-5>.
- Kocemba, K. A., Dulifńska-Litewka, J., Wojdyła, K. L., & Pękala, P. A. (2016). The role of 6-phosphofructo-2-kinase (PFK-2)/fructose 2,6-bisphosphatase (FBPase-2) in metabolic reprogramming of cancer cells. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 70, 938–950. <https://doi.org/10.5604/17322693.1218187>.
- Kowal, J., Ni, D., Jackson, S. M., Manolariδis, I., Stahlberg, H., & Locher, K. P. (2021). Structural basis of drug recognition by the multidrug transporter ABCG2. *Journal of Molecular Biology* 433(13), Article 166980. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166980>.
- Kuang, C., Tong, J., Ermine, K., Cai, M., Dai, F., Hao, S., Giles, F., Huang, Y., Yu, J., & Zhang, L. (2022). Dual inhibition of BET and HAT/p300 suppresses colorectal cancer via DR5- and p53/PUMA-mediated cell death. *Frontiers in Oncology* 12, 1018775. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1018775>.
- Lai, J.-I., Tseng, Y.-J., Chen, M.-H., Huang, C.-Y. F., & Chang, P. M.-H. (2020). Clinical perspective of FDA approved drugs with P-glycoprotein inhibition activities for potential cancer therapeutics. *Frontiers in Oncology* 10, Article 561936. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.561936>.
- Lamb, Y. N. (2019). Pexidartinib: First approval. *Drugs* 79(16), 1805–1812. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01210-0>.
- Laoui, D., Van Overmeire, E., De Baetselier, P., Van Ginderachter, J. A., & Raes, G. (2014). Functional relationship between tumor-associated macrophages and macrophage colony-stimulating factor as contributors to cancer progression. *Frontiers in Immunology* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00489>.
- Lasko, L. M., Jakob, C. G., Edalji, R. P., Qiu, W., Montgomery, D., Digiammarino, E. L., ... Bromberg, K. D. (2017). Discovery of a selective catalytic p300/CBP inhibitor that targets lineage-specific tumours. *Nature* 550(7674), 128–132. <https://doi.org/10.1038/nature24028>.
- Lehtisalo, M., Keskitalo, J. E., Tornio, A., Lapatto-Reiniluoto, O., Deng, F., Jaatinen, T., ... Niemi, M. (2020). Febuxostat, but not allopurinol, markedly raises the plasma concentrations of the breast cancer resistance protein substrate Rosuvastatin. *Clinical and Translational Science* 13(6), 1236–1243. <https://doi.org/10.1111/cts.12809>.
- Liu, X., Yu, J., Song, S., Yue, X., & Li, Q. (2017). Protease-activated receptor-1 (PAR-1): A promising molecular target for cancer. *Oncotarget* 8(63), 107334–107345. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21015>.
- López, M., García-Oguiza, A., Armstrong, J., García-Cobaleda, I., García-Miñaur, S., Santos-Simarro, F., Seidel, V., & Domínguez-Garrido, E. (2018). Rubinstein-Taybi 2 associated to novel EP300 mutations: Deepening the clinical and genetic spectrum. *BMC Medical Genetics* 19(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12881-018-0548-2>.
- Luo, M., Zhang, Y., Xu, Z., Lv, S., Wei, Q., & Dang, Q. (2023). Experimental analysis of bladder cancer-associated mutations in EP300 identifies EP300-R1627W as a driver mutation. *Molecular Medicine* 29(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s10020-023-00608-7>.
- Luttmann, J. H., Coleman, A., Mayro, B., & Pendergast, A. M. (2021). Role of the ABL tyrosine kinases in the epithelial–mesenchymal transition and the metastatic cascade. *Cell Communication and Signaling* 19(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00739-6>.
- Maksimska, J., Segura-Peña, D., Cole, P. A., & Marmorstein, R. (2014). Structure of the p300 histone acetyltransferase bound to acetyl-coenzyme A and its analogues. *Biochemistry* 53(21), 3415–3422. <https://doi.org/10.1021/bi500380f>.
- Mitra, R., Pavly, M., Subramanian, N., George, A. M., O'Mara, M. L., Kerr, I. D., & Callaghan, R. (2017). Location of contact residues in pharmacologically distinct drug binding sites on P-glycoprotein. *Biochemical Pharmacology* 123, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.10.002>.
- Mohamed, M. A., Elkhatib, W. A., & Daba, G. M. (2022). Rapamycin golden jubilee and still the miraculous drug: A potent immunosuppressant, antitumor, rejuvenative agent, and potential contributor in COVID-19 treatment. *Bioresources and Bioprocessing* 9(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00554-y>.
- Monestime, S., & Lazaridis, D. (2020). Pexidartinib (TURALIOTM): The first FDA-indicated systemic treatment for tenosynovial giant cell tumor. *Drugs in R&D* 20(3), 189–195. <https://doi.org/10.1007/s40268-020-00314-3>.
- Morrison-Smith, C. D., Knox, T. M., Filic, I., Soroko, K. M., Eschle, B. K., Wilkens, M. K., ... French, C. A. (2020). Combined targeting of the BRD4-NUT-p300 axis in NUT midline carcinoma by dual selective bromodomain inhibitor, NEO2734. *Molecular Cancer Therapeutics* 19(7), 1406–1414. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0087>.
- Mujtaba, S., He, Y., Zeng, L., Yan, S., Plotnikova, O., Sachchidanand, ... Zhou, M.-M. (2004). Structural mechanism of the bromodomain of the coactivator CBP in p53 transcriptional activation. *Molecular Cell* 13(2), 251–263. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00528-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00528-8).
- Murai, J., Huang, S. N., Das, B. B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshow, J. H., ... Pommier, Y. (2012). Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. *Cancer Research* 72(21), 5588–5599. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-253>.
- Muthengi, A., Wimalasena, V. K., Yosief, H. O., Bikowitz, M. J., Sigua, L. H., Wang, T., ... Zhang, W. (2021). Development of dimethylisoxazole-attached imidazo[1,2-a]pyridines as potent and selective CBP/p300 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 64(9), 5787–5801. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c0223>.
- Negi, P., Cheke, R. S., & Patil, V. M. (2021). Recent advances in pharmacological diversification of Src family kinase inhibitors. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 22(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s43042-021-00172-x>.
- Niu, X., Ma, J., Li, J., Gu, Y., Yin, L., Wang, Y., Zhou, X., Wang, J., Ji, H., & Zhang, Q. (2021). Sodium/glucose cotransporter 1-dependent metabolic alterations induce tamoxifen resistance in breast cancer by promoting macrophage M2 polarization. *Cell Death & Disease* 12(6), 509. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03781-x>.
- Okamoto, H., Takuwa, N., Yatomi, Y., Gonda, K., Shigematsu, H., & Takuwa, Y. (1999). EDG3 is a functional receptor specific for sphingosine 1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine with signaling characteristics distinct from EDG1 and AGR16. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 260(1), 203–208. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0886>.
- Ong, B. X., Brunmeir, R., Zhang, Q., Peng, X., Idris, M., Liu, C., & Xu, F. (2020). Regulation of thermogenic adipocyte differentiation and adaptive thermogenesis through histone acetylation. *Frontiers in Endocrinology* 11, 95. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00095>.
- Ozaki, T., & Nakagawara, A. (2011). Role of p53 in cell death and human cancers. *Cancers* 3(1), 994–1013. <https://doi.org/10.3390/cancers3010994>.
- Pandey, N., & Black, B. E. (2021). Rapid detection and signaling of DNA damage by PARP-1. *Trends in Biochemical Sciences* 46(9), 744–757. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.01.014>.
- Park, J. E., Kim, E., Lee, D.-W., Park, T. K., Kim, M. S., Jang, S. Y., ... Kim, D.-K. (2021). Identification of de novo EP300 and PLAU variants in a patient with Rubinstein-Taybi syndrome-related arterial vasculopathy and skeletal anomaly. *Scientific Reports* 11(1), 15931. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95133-0>.
- Patel, R., Kumar, A., Lokhande, K. B., Swamy, K. V., Pal, J. K., Sharma, P., & N. K. (2020). Molecular docking and simulation studies predict lactyl-CoA as the substrate for P300 directed lactylation [preprint]. *Chemistry*. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12770360.v1>.
- Picaud, S., Fedorov, O., Thanasopoulou, A., Leonards, K., Jones, K., Meier, J., ... Knapp, S. (2015). Generation of a selective small molecule inhibitor of the CBP/p300 bromodomain for leukemia therapy. *Cancer Research* 75(23), 5106–5119. <https://doi.org/10.1186/0008-5472.CAN-15-0236>.
- Pilotto Heming, C., Muriithi, W., Wanjuhi, M., Macharia, L., Niemeyer Filho, P., Moura-Neto, V., & Aran, V. (2022). P-glycoprotein and cancer: What do we currently know? *Heliyon* 8(10), Article e11171. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11171>.
- Pires, D. E. V., Blundell, T. L., & Ascher, D. B. (2015). pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *Journal of Medicinal Chemistry* 58(9), 4066–4072. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>.
- Popp, T. A., Tallant, C., Rogers, C., Fedorov, O., Brennan, P. E., Müller, S., ... Bracher, F. (2016). Development of selective CBP/P300 benzoxazepine bromodomain inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 59(19), 8889–8912. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00774>.
- Principe, D. R., Xiong, R., Li, Y., Pham, T. N. D., Karnath, S. D., Dubrovsky, O., ... Rana, A. (2022). XP-524 is a dual-BET/EP300 inhibitor that represses oncogenic KRAS and potentiates immune checkpoint inhibition in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119(4), Article e2116764119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2116764119>.
- Qian, Y., Chai, S., Liang, Z., Wang, Y., Zhou, Y., Xu, X., Zhang, C., Zhang, M., Si, J., Huang, F., Huang, Z., Hong, W., & Wang, K. (2014). KIF5B-RET fusion kinase promotes cell growth by multilevel activation of STAT3 in lung cancer. *Molecular Cancer* 13(1), 176. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-176>.
- Rai, R., Sun, T., Ramirez, V., Lux, E., Eren, M., Vaughan, D. E., & Ghosh, A. K. (2019). Acetyltransferase p300 inhibitor reverses hypertension-induced cardiac fibrosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 23(4), 3026–3031. <https://doi.org/10.1111/jcem.14162>.
- Rai, R., Verma, S. K., Kim, D., Ramirez, V., Lux, E., Li, C., ... Ghosh, A. K. (2017). A novel acetyltransferase p300 inhibitor ameliorates hypertension-associated cardio-renal fibrosis. *Epigenetics* 12(11), 1004–1013. <https://doi.org/10.1080/15592294.2017.1370173>.
- Raisner, R., Kharbanda, S., Jin, L., Jeng, E., Chan, E., Merchant, M., ... Gascoigne, K. E. (2018). Enhancer activity requires CBP/P300 bromodomain-dependent histone H3K27 acetylation. *Cell Reports* 24(7), 1722–1729. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.041>.

- Rasool, R. U., Natesan, R., & Asangani, I. A. (2021). Toppling the HAT to treat lethal prostate cancer. *Cancer Discovery* 11(5), 1011–1013. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0184>.
- Ray Chaudhuri, A., & Nussenzwieg, A. (2017). The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18(10), 610–621. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.53>.
- Reber, J. M., Božić-Petković, J., Lippmann, M., Mazzardo, M., Dilger, A., Warmers, R., ... Mangerich, A. (2023). PARP1 and XRCC1 exhibit a reciprocal relationship in genotoxic stress response. *Cell Biology and Toxicology* 39(1), 345–364. <https://doi.org/10.1007/s10565-022-09739-9>.
- Regua, A. T., Najjar, M., & Lo, H.-W. (2022). RET signaling pathway and RET inhibitors in human cancer. *Frontiers in Oncology* 12, Article 932353. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.932353>.
- Ring, A., Kaur, P., & Lang, J. E. (2020). EP300 knockdown reduces cancer stem cell phenotype, tumor growth and metastasis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 20(1), 1076. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07573-y>.
- Romero, F. A., Murray, J., Lai, K. W., Tsui, V., Albrecht, B. K., An, L., ... Magnuson, S. (2017). GNE-781, A highly advanced potent and selective bromodomain inhibitor of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein, binding protein (CBP). *Journal of Medicinal Chemistry* 60(22), 9162–9183. <https://doi.org/10.1021/acsm.jmedchem.b700796>.
- Sanchez, R., & Zhou, M.-M. (2010). *The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription*.
- Sarin, H., Kanevsky, A. S., Fung, S. H., Butman, J. A., Cox, R. W., Glen, D., ... Auh, S. (2009). Metabolically stable bradykinin B2 receptor agonists enhance transvascular drug delivery into malignant brain tumors by increasing drug half-life. *Journal of Translational Medicine* 7(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-7-33>.
- Schleicher, E. M., Galvan, A. M., Imamura-Kawasawa, Y., Moldovan, G.-L., & Nicolae, C. M. (2018). PARP10 promotes cellular proliferation and tumorigenesis by alleviating replication stress. *Nucleic Acids Research* 46(17), 8908–8916. <https://doi.org/10.1093/nar/gky658>.
- Shang, Z., Zhou, K., Xu, C., Csencsits, R., Cochran, J. C., & Sindelar, C. V. (2014). High-resolution structures of kinesin on microtubules provide a basis for nucleotide-gated force-generation. *eLife* 3, Article e04686. <https://doi.org/10.7554/eLife.04686>.
- Shortsova, T., Foulkes, W. D., & Witcher, M. (2021). Achieving clinical success with BET inhibitors as anti-cancer agents. *British Journal of Cancer* 124(9), 1478–1490. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01321-0>.
- Shvedunova, M., & Akhtar, A. (2022). Modulation of cellular processes by histone and non-histone protein acetylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 23(5), 329–349. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00441-y>.
- Sima, A., Smădeanu, R. E., Simionescu, A. A., Nedelea, F., Vlad, A. -M., & Becheanu, C. (2022). Menke-Hennekam syndrome: A literature review and a new case report. *Children* 9(5), 759. <https://doi.org/10.3390/children9050759>.
- Sivanandam, M., Saravanan, K., & Kumaradhas, P. (2018). Insights into intermolecular interactions, electrostatic properties and the stability of C646 in the binding pocket of p300 histone acetyltransferase enzyme: A combined molecular dynamics and charge density study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 36(12), 3246–3264. <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1384761>.
- 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(2), 349. <https://doi.org/10.3390/cancers12020349>.
- Sobczak, Pitt, Spickett, & Robaszkiewicz (2019). PARP1 co-regulates EP300–BRG1-dependent transcription of genes involved in breast cancer cell proliferation and DNA repair. *Cancers* 11(10), 1539. <https://doi.org/10.3390/cancers11101539>.
- Spriano, F., Gaudio, E., Cascione, L., Tarantelli, C., Melle, F., Motta, G., ... Bertoni, F. (2020). Antitumor activity of the dual BET and CBP/EP300 inhibitor NEO2734. *Blood Advances* 4(17), 4124–4135. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020001879>.
- Stachyra-Strawa, P., Cisek, P., Janiszewski, M., & Grzybowska-Szatkowska, L. (2020). The role of hexokinase in cancer. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 74, 144–150. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0014.1528>.
- Strachowska, M., Gronkowska, K., Michlewski, S., & Robaszkiewicz, A. (2021). CBP/p300 bromodomain inhibitor—I-CBP112 declines transcription of the key ABC transporters and sensitizes cancer cells to chemotherapy drugs. *Cancers* 13(18), 4614. <https://doi.org/10.3390/cancers13184614>.
- Sugiura, R., Satoh, R., & Takasaki, T. (2021). ERK: A double-edged sword in cancer. ERK-dependent apoptosis as a potential therapeutic strategy for cancer. *Cells* 10(10), 2509. <https://doi.org/10.3390/cells10102509>.
- Sun, H., Liu, C., Han, F., Lin, X., Cao, L., Liu, C., Ji, Q., Cui, J., Yao, Y., Wang, B., Liao, Y., Nie, H., Zhang, Y., & Li, Y. (2023). The regulation loop of MARVELD1 interacting with PARP1 in DNA damage response maintains genome stability and promotes therapy resistance of cancer cells. *Cell Death and Differentiation* 30(4), 922–937. <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01118-z>.
- Sun, X.-J., Man, N., Tan, Y., Nimer, S. D., & Wang, L. (2015). The role of histone acetyltransferases in normal and malignant hematopoiesis. *Frontiers in Oncology* 5. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00108>.
- SwissTargetPrediction (2023). Retrieved February 17. from <http://www.swisstargetprediction.ch/>.
- Tanaka, A., & Sakaguchi, S. (2017). Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Research* 27(1), 109–118. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.151>.
- Tao, J., Zhang, M., Wen, Z., Wang, B., Zhang, L., Ou, Y., Tang, X., Yu, X., & Jiang, Q. (2018). Inhibition of EP300 and DDR1 synergistically alleviates pulmonary fibrosis in vitro and in vivo. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 106, 1727–1733. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.132>.
- Tao, W., Zhang, A., Zhai, K., Huang, Z., Huang, H., Zhou, W., ... Bao, S. (2020). SATB2 drives glioblastoma growth by recruiting CBP to promote FOXM1 expression in glioma stem cells. *EMBO Molecular Medicine* 12(12). <https://doi.org/10.15252/emmm.202012291>.
- Taylor, A. M., Côté, A., Hewitt, M. C., Pastor, R., Leblanc, Y., Nasveschuk, C. G., ... Albrecht, B. K. (2016). Fragment-based discovery of a selective and cell-active benzodiazepinone CBP/EP300 bromodomain inhibitor (CPI-637). *ACS Medicinal Chemistry Letters* 7(5), 531–536. <https://doi.org/10.1021/acsmmedchemlett.6b00075>.
- Thoma, O.-M., Neurath, M. F., & Waldner, M. J. (2021). Cyclin-dependent kinase inhibitors and their therapeutic potential in colorectal cancer treatment. *Frontiers in Pharmacology* 12, Article 757120. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.757120>.
- Tontsch-Grunt, U., Traexler, P.-E., Baum, A., Musa, H., Marzin, K., Wang, S., Trapani, F., Engelhardt, H., & Solca, F. (2022). Therapeutic impact of BET inhibitor BI 894999 treatment: Backtranslation from the clinic. *British Journal of Cancer* 127(3), 577–586. <https://doi.org/10.1038/s41416-022-01815-5>.
- Tziastoudi, M., Theoharides, T. C., Nikolaou, E., Efthymiadi, M., Eleftheriadis, T., & Stefanidis, I. (2022). Key genetic components of fibrosis in diabetic nephropathy: An updated systematic review and meta-analysis. *International Journal of Molecular Sciences* 23(23), 15331. <https://doi.org/10.3390/ijms232315331>.
- Waddell, A., Mahmud, I., Ding, H., Huo, Z., & Liao, D. (2021). Pharmacological inhibition of CBP/p300 blocks estrogen receptor alpha (ERα) function through suppressing enhancer H3K27 acetylation in luminal breast cancer. *Cancers* 13(11), 2799. <https://doi.org/10.3390/cancers13112799>.
- Wang, J.-Q., Wang, B., Lei, Z.-N., Teng, Q.-X., Li, J. Y., Zhang, W., ... Chen, Z.-S. (2019). Derivative of 5-cyano-6-phenylpyrimidin antagonizes ABCB1- and ABCG2-mediated multidrug resistance. *European Journal of Pharmacology* 863, Article 172611. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172611>.
- Wang, Y.-M., Gu, M.-L., Meng, F.-S., Jiao, W.-R., Zhou, X.-X., Yao, H.-P., & Ji, F. (2017). Histone acetyltransferase p300/CBP inhibitor C646 blocks the survival and invasion pathways of gastric cancer cell lines. *International Journal of Oncology* 51(6), 1860–1868. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4176>.
- Wapenaar, H., & Dekker, F. J. (2016). Histone acetyltransferases: Challenges in targeting bi-substrate enzymes. *Clinical Epigenetics* 8(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0225-2>.
- Wasner, M., Tschöp, K., Spiesbach, K., Haugwitz, U., Johne, C., Mössner, J., Mantovani, R., & Engelhard, K. (2003). Cyclin B1 transcription is enhanced by the p300 coactivator and regulated during the cell cycle by a CHR-dependent repression mechanism. *FEBS Letters* 536(1–3), 66–70. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00028-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00028-0).
- Watters, R. J., Wang, H.-G., Sung, S.-S., Loughran, T. P., & Liu, X. (2011). Targeting sphingosine-1-phosphate receptors in cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 11(9), 810–817. <https://doi.org/10.2174/18752011797655041>.
- Wei, W., Song, Z., Chiba, M., Wu, W., Jeong, S., Zhang, J.-P., ... Yang, Y. (2022). Analysis and therapeutic targeting of the EP300 and CREBBP acetyltransferases in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01774-z>.
- Welti, J., Sharp, A., Brooks, N., Yuan, W., McNair, C., Chand, S. N., ... de Bono, J. S. (2021). Targeting the p300/CBP axis in lethal prostate cancer. *Cancer Discovery* 11(5), 1118–1137. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0751>.
- Windh, R. T., Lee, M.-J., Hla, T., An, S., Barr, A. J., & Manning, D. R. (1999). Differential coupling of the sphingosine 1-phosphate receptors Edg-1, Edg-3, and H218/Edg-5 to the Gi, Gq, and G12 families of heterotrimeric G proteins. *Journal of Biological Chemistry* 274(39), 27351–27358. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.39.27351>.
- Wood, D. J., Korolchuk, S., Tatum, N. J., Wang, L.-Z., Endicott, J. A., Noble, M. E. M., & Martin, P. M. (2019). Differences in the conformational energy landscape of CDK1 and CDK2 suggest a mechanism for achieving selective CDK inhibition. *Cell Chemical Biology* 26(1), 121–130.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.10.015>.
- Xiang, Q., Zhou, Y., Zhang, Y., & Xu, Y. (2022). CBP/p300 bromodomain: New promising epigenetic target. *Visualized Cancer Medicine* 3, 3. <https://doi.org/10.1051/vcm/2022004>.
- Xiao, H., Zheng, Y., Ma, L., Tian, L., & Sun, Q. (2021). Clinically-relevant ABC transporter for anti-cancer drug resistance. *Frontiers in Pharmacology* 12, Article 648407. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.648407>.
- Yan, Y., Ma, J., Wang, D., Lin, D., Pang, X., Wang, S., ... Huang, H. (2019). The novel BET-CBP/p300 dual inhibitor NEO2734 is active in SPOP mutant and wild-type prostate cancer. *EMBO Molecular Medicine* 11(11). <https://doi.org/10.15252/emmm.201910659>.
- Yanazumi, T., Hasegawa, K., Morimoto, T., Kawamura, T., Wada, H., Matsumori, A., ... Kita, T. (2003). Cardiac p300 is involved in myocyte growth with decompensated heart failure. *Molecular and Cellular Biology* 23(10), 3593–3606. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.10.3593-3606.2003>.
- Yang, H., Pinello, C. E., Luo, J., Li, D., Wang, Y., Zhao, L. Y., ... Liao, D. (2013). Small-molecule inhibitors of acetyltransferase p300 identified by high-throughput screening are potent anticancer agents. *Molecular Cancer Therapeutics* 12(5), 610–620. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0930>.
- Yang, H., Shu, Z., Jiang, Y., Mao, W., Pang, L., Redwood, A., ... Lu, Z. (2019). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-2 regulates TP53-dependent pacitaxel sensitivity in ovarian and breast cancers. *Clinical Cancer Research* 25(18), 5702–5716. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3448>.
- Yang, X., Li, C., Gou, K., Liu, X., Zhou, Y., Zou, J., Chen, Q., Luo, Y., & Zhao, Y. (2022). A novel and potent dihydoroxyroate dehydrogenase inhibitor suppresses the proliferation of colorectal cancer by inducing mitochondrial dysfunction and DNA damage. *MedComm – Oncology* 1(1). <https://doi.org/10.1002/mog2.6>.
- Yap, T. A., Elhaddad, A. M., Grisham, R. N., Hamm, J. T., Marks, D. K., Shapiro, G., ... Sharma, M. (2023). First-in-human phase 1/2a study of a potent and novel CDK2-selective inhibitor PF-07104091 in patients (pts) with advanced solid tumors, enriched for CDK4/6 inhibitor resistant HR+/HER2- breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 41 (16_suppl), 3010. https://doi.org/10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.3010.
- Yu, Y.-L., Chen, M., Zhu, H., Zhuo, M.-X., Chen, P., Mao, Y.-J., Li, L.-Y., Zhao, Q., Wu, M., & Ye, M. (2021). STAT1 epigenetically regulates LCP2 and TNFAIP2 by recruiting EP300 to contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical Epigenetics* 13(1), 127. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01101-w>.

- Yuan, Y., Wang, J., Mesalam, A., Li, L., Choi, Y., Talimur Reza, A. M. M., ... Qian, C. (2020). Nicotinamide-induced mouse embryo developmental defect rescued by resveratrol and I-CBP112. *Molecular Reproduction and Development* 87(9), 1009–1017. <https://doi.org/10.1002/mrd.23405>.
- Yuan, Y., Yuan, H., Geng, Y., Zhao, L., Yun, H., Wang, Y., Yang, G., & Zhang, X. (2021). Aspirin modulates 2-hydroxyisobutyrylation of ENO1K281 to attenuate the glycolysis and proliferation of hepatoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 560, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.04.083>.
- Zhang, B., Chen, D., Liu, B., Dekker, F. J., & Quax, W. J. (2020). A novel histone acetyltransferase inhibitor A485 improves sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cells to TRAIL. *Biochemical Pharmacology* 175, Article 113914. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113914>.
- Zhang, J., Gan, Y., Li, H., Yin, J., He, X., Lin, L., ... Huang, W. (2022). Inhibition of the CDK2 and cyclin A complex leads to autophagic degradation of CDK2 in cancer cells. *Nature Communications* 13(1), 2835. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30264-0>.
- Zhang, L., Zhang, J., Wang, J., Ren, C., Tang, P., Ouyang, L., & Wang, Y. (2022). Recent advances of human dihydroorotate dehydrogenase inhibitors for cancer therapy: Current development and future perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 232, Article 114176. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114176>.
- Zheng, T., Chen, P., Huang, Y., Qiu, J., Zhou, C., Wu, Z., & Li, L. (2021). CPI-637 as a potential bifunctional latency-reversing agent that targets both the BRD4 and TIP60 proteins. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11, Article 686035. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.686035>.
- Zheng, Y., Qin, L., Zacarías, N. V. O., De Vries, H., Han, G. W., Gustavsson, M., ... Handel, T. M. (2016). Structure of CC chemokine receptor 2 with orthosteric and allosteric antagonists. *Nature* 540(7633), 458–461. <https://doi.org/10.1038/nature20605>.
- Zhou, F., Liu, Q., Zhang, L., Zhu, Q., Wang, S., Zhu, K., Deng, R., Liu, Y., Yuan, G., Wang, X., & Zhou, L. (2020). Selective inhibition of CBP/p300 HAT by A-485 results in suppression of lipogenesis and hepatic gluconeogenesis. *Cell Death & Disease* 11(9), 745. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02960-6>.
- Zhuo, C., Ruan, Q., Zhao, X., Shen, Y., & Lin, R. (2022). CXCL1 promotes colon cancer progression through activation of NF-κB/P300 signalling pathway. *Biology Direct* 17(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s13062-022-00348-4>.
- Zou, Z., Tao, T., Li, H., & Zhu, X. (2020). mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: Progress and challenges. *Cell & Bioscience* 10(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00396-1>.
- Zucconi, B. E., Luef, B., Xu, W., Henry, R. A., Nodelman, I. M., Bowman, G. D., ... Cole, P. A. (2016). Modulation of p300/CBP acetylation of nucleosomes by bromodomain ligand I-CBP112. *Biochemistry* 55(27), 3727–3734. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00480>.

Poliploidia jako rezultat terapii przeciwnowotworowych i przyczyna braku ich skuteczności

STRESZCZENIE

Poliploidia komórek nowotworowych obok ich wrodzonej i nabytej oporności jest opisywana jako mechanizm odpowiedzialny za nieskuteczność terapii przeciwnowotworowych opartych głównie na związkach cyto- i genotoksycznych. Jest ona odpowiedzią części komórek na działanie leków, które indukują w nich endoreduplicację, nieprawidłową cytokinezę, fuzję lub kanibalizm, co w konsekwencji prowadzi do zwielokrotnienia poziomu DNA, zatrzymania podziałów i uniknięcia śmierci. Odtworzenie raka następuje w wyniku depoliploidyzacji komórek poliploidalnych na drodze neozy, podziałów amitotycznych i podobnych do mejozy. W pracy przeglądowej prezentujemy poznane dotychczas mechanizmy odpowiedzialne za powstawanie komórek poliploidalnych, ich główne cechy i rolę w nawrotach raka. Przedstawiamy również obecnie brane pod uwagę podejścia, celujące w metabolizm i ścieżki sygnalowe, które są niezbędne do funkcjonowania komórek poliploidalnych. Dane literackie wskazują, że zastosowanie chemioterapii lub radioterapii w skojarzeniu ze związkami hamującymi powstawanie lub eliminującymi komórki poliploidalne może w istotny sposób zwiększyć skuteczność leczenia.

WPROWADZENIE

Współczesne terapie przeciwnowotworowe obejmują wiele sposobów leczenia, jednak całkowite wyleczenie nowotworów złośliwych, do których należą także raki wywodzące się z tkanki nabłonkowej, pozostaje bardzo trudnym zadaniem. Wynika to z mechanizmów przetrwania wykształcalanych przez te komórki, często w odpowiedzi na zastosowane leczenie. Dostępne są liczne podejścia terapeutyczne mające na celu zwalczenie nowotworów złośliwych. Zalicza się do nich chemioterapię, radioterapię, immunoterapię, terapię celowaną oraz spersonalizowaną. Pomimo tego w wielu przypadkach stosuje się chemioterapię przez wzgląd na między innymi wysoką dostępność leków o różnym mechanizmie działania. Warunkuje to możliwość dostosowania leku do danego typu nowotworu złośliwego, zmianę leczenia w przypadku nabycia oporności przez nowotwór i łączenie leków w terapię skojarzone. Chemiczna terapia stosowana jest często w przypadku nowotworów złośliwych zdiagnozowanych w późnych stadiach choroby, charakteryzujących się obecnością komórek aktywnie proliferujących, tworzących przerzuty i pozbawionych charakterystycznych markerów dla terapii celowanej, co ogranicza możliwość zastosowania innych form leczenia [1].

Komórki nowotworowe namnażające się w wyniku podziałów mitotycznych przechodzą przez kilka następujących po sobie etapów cyklu komórkowego, który ma na celu zwielokrotnienie, a następnie rozdzielenie materiału genetycznego i cytoplazmy pomiędzy dwie komórki potomne. Obejmuje on podział komórki (kariokinezę i cytokinezę) oraz okres międzymitotyczny – interfazę, na którą składają się fazy G1, S i G2. Zaburzenia w przebiegu cyklu komórkowego i zaburzenia funkcjonowania punktów kontrolnych na granicy kolejnych jego faz mogą prowadzić do niekontrolowanego podziału komórek, co sprzyja transformacji nowotworowej i postępowi choroby. Leki przeciwnowotworowe stosowane w chemioterapii mają na celu blokowanie podziałów mitotycznych i indukowanie różnych typów śmierci komórki, często poprzez powodowanie uszkodzeń DNA, wywoływanie zaburzeń w procesie replikacji czy cytokiny. Jednak w trakcie terapii nowotwory złośliwe wytwarzają lub utrwalają już istniejące mechanizmy umożliwiające im adaptację do warunków stresowych wywoływanych przez chemioterapeutyki. Do najczęściej wymienianych należą nadekspresja transporterów ABC i białek naprawy uszkodzeń DNA oraz tworzenie komórek poli-an euploidalnych [2,3]. Komórki poliploidalne charakteryzują się zwiększoną liczbą całych chromosomów w komórce i stanowią ważny obszar badań w dziedzinie biologii nowotworów, ponieważ procentowy udział komórek poliploidalnych lub mających zdolność do przechodzenia w stan poliploidii rośnie w odpowiedzi na terapie przeciwnowotworowe oraz w wyniku

Mgr Kinga Kołacz^{1,2}✉,

Mgr Karolina Gronkowska^{1,2},

Mgr Magdalena Strachowska^{1,2},

dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz, prof. UŁ¹✉

¹Katedra Biofizyki Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony, Uniwersytet Łódzki

²Szkoła Doktorska BioMedChem Uniwersytetu Łódzkiego i Instytutów Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, Uniwersytet Łódzki

https://doi.org/10.18388/pb.2021_55

✉autorzy korespondujący: kinga.kolacz@edu.uni.lodz.pl; agnieszka.robaszkiewicz@biol.uni.lodz.pl

Słowa kluczowe: poliploidalne olbrzymie komórki nowotworowe, oporność wielokrotna, chemioterapia, endoreduplicacja, depoliploidyzacja

Wykaz skrótów: AMPK – kinaza białkowa aktywowana AMP; DDR – odpowiedź na uszkodzenia DNA (ang. *DNA damage response*); PGCC – poliploidalne olbrzymie komórki nowotworowe (ang. *polyploid giant cancer cells*); PRL3 – białkowa fosfataza tyrozynowa (ang. *protein tyrosine phosphatase 4A3*); Rho A – białko o aktywności GTP-azy (ang. *Ras homolog family member A*); SAC – punkt kontrolny wrzeciona podziałowego (ang. *Spindle Assembly Checkpoint*); TIP – poliploidia indukowana leczeniem (ang. *therapy-induced polyploidy*); TIS – starzenie komórkowe indukowane leczeniem (ang. *therapy-induced senescence*)

niedotlenienia lub braku składników odżywcznych [4]. W wielu typach nowotworów złośliwych obserwuje się olbrzymie komórki z jednym ogromnym lub wieloma mniejszymi jądrami i są one określane jako poliploidalne olbrzymie komórki nowotworowe (ang. *polyploid giant cancer cells*, PGCC) lub olbrzymie nowotworowe komórki wielojadrzaste (ang. *multinucleated giant cancer cells*). Pierwszy termin jest aktualnie powszechnie akceptowany i stosowany przez większość badaczy zajmujących się poliploidalnością komórek nowotworowych. Choć PGCC stanowią stosunkowo niewielką część populacji komórek w guzie wahającą się od 5% do 20% to zakłada się obecnie, że te ogromne komórki są odpowiedzialne za nawroty nowotworu po leczeniu i nieskuteczność terapii [5-7].

Komórki poliploidalne definiuje się jako subpopulację komórek nowotworowych zawierających jedno jądro komórkowe o zwielokrotnionej ilości materiału genetycznego lub wiele widocznie oddzielonych jąder komórkowych [8,9]. Powstawanie PGCC przyczynia się do wytworzenia heterogenności genetycznej zwiększać prawdopodobieństwo przeżycia przynajmniej części komórek nowotworowych w warunkach niekorzystnych. Niezależnie od liczby jąder komórkowych PGCC charakteryzują się dużym rozmiarem zarówno samego jądra o nieregularnej strukturze jak i całej komórki, jednak morfologia tych komórek różni się w zależności od linii komórkowej [10]. Zhang i wsp. zdefiniowali średni rozmiar olbrzymiej komórki poliploidalnej jako ponad trzykrotnie większy od diploidalnej komórki nowotworowej (od 3 do 10 razy) [11]. Dane literaturowe wskazują na możliwość wykorzystywania liczby PGCC jako markera do oceny stopnia złośliwości i zróżnicowania guzów litych [9]. Pomimo znaczenia klinicznego, dokładne mechanizmy leżące u podstaw indukowania polianeuploidii i rozmieszczenia olbrzymich komórek w guzach pierwotnych i przerzutach po terapii przeciwnowotworowej pozostają słabo poznane.

PGCC mogą pojawić się m.in. w odpowiedzi na promieniowanie jonizujące oraz leki przeciwnowotworowe stosowane w chemioterapii [4,7], co najprawdopodobniej skutkuje odnowieniem populacji komórek nowotworowych tym samym przyczyniając się do wzrostu guza, przerzutowania oraz wznowy [6]. Dlatego zrozumienie procesów związanych z tworzeniem się poliploidii, znalezienie sposobu eliminacji PGCC i zapobiegania ich powstawaniu w trakcie terapii może przyczynić się do zwiększenia skuteczności leczenia pacjentów z nowotworami złośliwymi, dla których leczeniem pierwszego wyboru jest chemo- i radioterapia [6]. W niniejszej pracy wymieniamy i charakteryzujemy obecnie znane mechanizmy powstawania polianeuploidii indukowanej przez terapie przeciwnowotworowe, rzucając światło na implikacje tego procesu w obniżeniu skuteczności chemioterapii i odtwarzaniu się populacji komórek nowotworowych.

MECHANIZMY POWSTAWANIA KOMÓREK WIEŁOJĄDRZASTYCH A TERAPIE PRZECIWNOWOTWOROWE

Diploidalne komórki nowotworowe mogą być przekształcane w poliploidalne olbrzymie komórki nowotwo-

rowe na drodze procesów takich jak: endoreduplikacja, poślizg mitotyczny, nieprawidłowa cytokinez, fuzja komórek lub kanibalizm mitotyczny (Ryc. 1) [6,9,12].

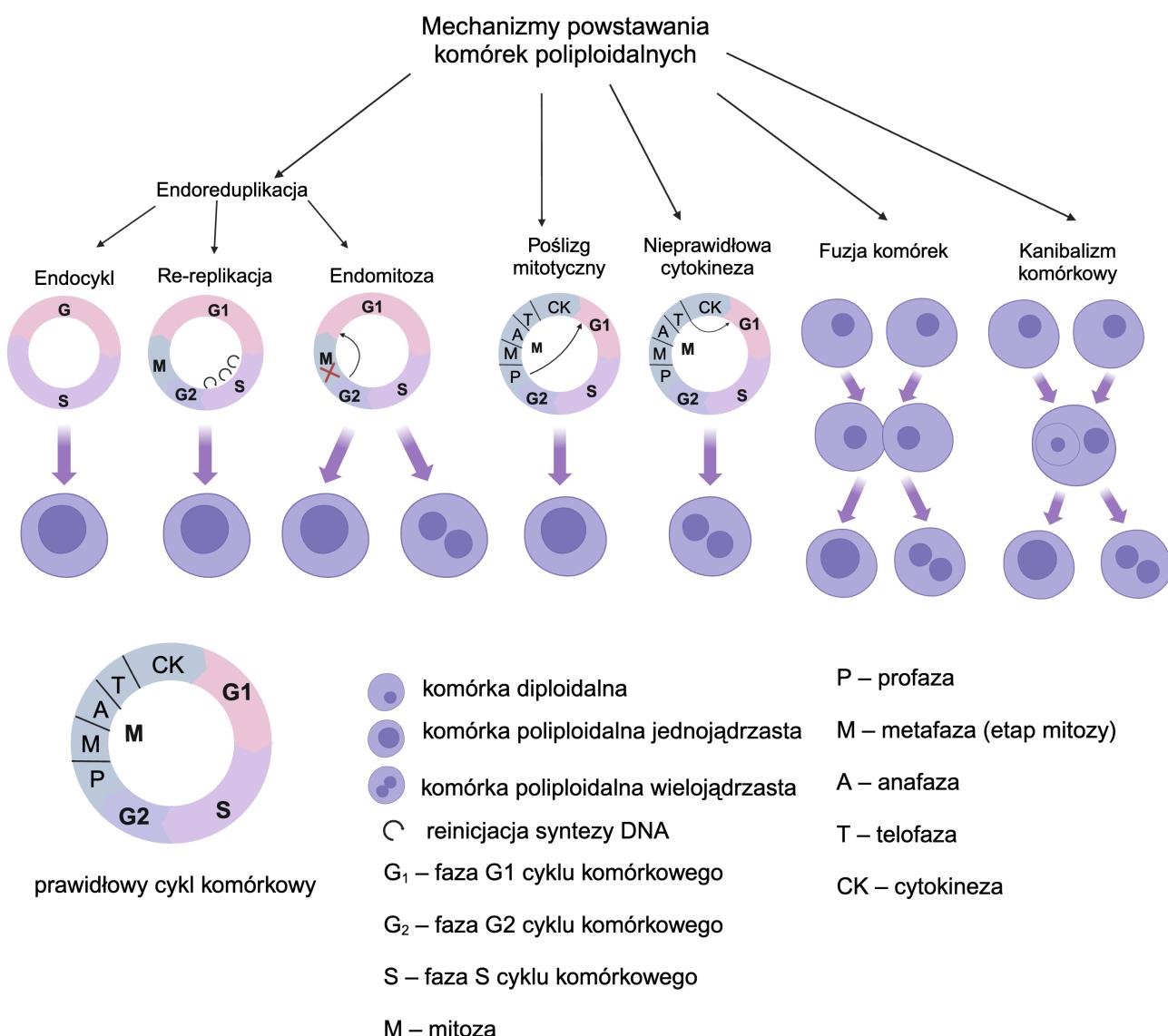
ENDOREDUPLIKACJA

Ten mechanizm powstawania PGCC obejmuje zaburzenia przebiegu mitozy takie jak: endomitosa, endocykl, poślizg mitotyczny i nieprawidłowa lub niewydolna cytokinez. Endoreduplikacja to proces, w którym komórka przechodzi przez cykl replikacji DNA bez podziału komórki i wiąże się z pominięciem mitozy (endocykl), ponownym rozpoczęciem replikacji DNA w trakcie fazy S cyklu komórkowego (re-replikacja) lub przerwaniem mitozy (endomitosa) [13,14]. Jednym z wymienionych wariantów endoreduplikacji jest proces endomitozy, w którym komórki rozpoczynają mitozę, ale jej nie kończą, co skutkuje powstaniem komórek o zwielokrotnionej ploidalności genomu [9]. Na endocykl składają się powtarzające się fazy S i G, w wyniku których powstają komórki z pojedynczym poliploidalnym jądem [13,15]. Charakterystyczne dla endocyklu jest wyraźne podwojenie ilości DNA, co odróżnia ten mechanizm od nieprawidłowego procesu re-replikacji, który charakteryzuje się niekontrolowaną, ciągłą reinicjacją syntezy DNA w fazie S, w wyniku której dochodzi do wzrostu zawartości DNA bez wyraźnie rozpoznawalnych podwojeń genomu [13,16]. Komórki endomitotyczne osiągają metafazę lub anafazę, ale nie przechodzą cytokinez, co skutkuje poliploidalnymi jądrami, natomiast komórki endocykliczne nie wykazują cech mitozy, takich jak rozpad otoczki jądrowej lub kondensacja chromosomów [13].

Endoreduplikacja może być wywoływana przez różne czynniki, takie jak promieniowanie UV, hipoksja [17] czy terapie przeciwnowotworowe, w tym radioterapię i chemioterapię obejmującą różne grupy leków przeciwnowotworowych m.in.: czynniki alkilujące (mitomycyna C) [18], taksany (winkrystyna) [19,20], związki zawierające platynę (cisplatyna) [21,22] czy inhibitory topoizomerazy II (dokosrubicyna, etopozyd) [23-25].

Proces endoreduplicacji ułatwia progresję nowotworu zwiększając tolerancję na błędy replikacji DNA. W prawidłowych komórkach po wystąpieniu kilku rund re-replikacji aktywacji ulega szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR) – ATM-CHEK2-p53 uruchamiany po wystąpieniu dwuniciowych pęknięć DNA w komórkach dzielących się na drodze mitozy [26]. W dalszej kolejności prowadzi to do zatrzymania cyklu komórkowego i naprawy uszkodzeń na drodze rekombinacji homologicznej (HR) lub niehomologicznego łączenia końców (NHEJ) [27], bądź do śmierci komórki na drodze apoptozy. Natomiast komórki endocykliczne unikają apoptozy poprzez hamowanie ekspresji genów proapoptotycznych [26]. Wyniki Mehrotra i wsp. sugerują, że komórki endocykliczne nie ulegają apoptozie, ponieważ równowaga ekspresji pomiędzy genami pro- i anti-apoptotycznymi jest przechylona w kierunku przetrwania komórek w endocyklu [26]. W komórkach tych często obserwuje się mutację w genie TP53.

Zahamowanie procesu mitozy warunkuje zajście endoreduplicacji lub endocyklu. Zmiany w aktywności głównych



Rycina 1. Schematyczne przedstawienie mechanizmów prowadzących do powstania poliploidii: endoreduplicacji, proces ten może zachodzić poprzez powtarzanie faz G i S cyklu komórkowego (endocykl), wielokrotne powtarzanie fazy S cyklu komórkowego (re-replikacja) lub pomijanie etapów mitozy w trakcie cyklu komórkowego (endomitosa); poślizgu mitotycznego, nieprawidłowej cytokinezji, fuzji komórek i kanibalizmu komórkowego (entozy). W wyniku tych procesów mogą powstawać komórki poliploidalne z jednym lub wieloma jądrami komórkowymi.

regulatorów cyklu komórkowego – kompleksów cyklin i kinaz zależnych od cyklin (cdks) prowadzą do inaktywacji kinazy mitotycznej cdk1 [28]. U ssaków i Drosophila w trakcie endoreduplicacji poziom mitotycznych cyklin A i B lub tylko cykliny B ulega obniżeniu, podczas gdy poziom cykliny E utrzymuje się. Naprzemienne fazy S i G endocyklu są częściowo regulowane przez kompleks cyklinu E-Cdk2, którego akumulacja jest kluczowa dla syntezy DNA [28]. Wysoki poziom aktywności CycE-Cdk2 wyzwala fazę S, podczas gdy obniżenie aktywności CycE-Cdk2 jest kluczowe dla rozpoczęcia replikacji [29]. W konsekwencji komórki przechodzą rundy replikacji DNA i wzrostu bez podziału. Również regulatory fazy G₂, mitozy i cytokinezji odgrywają rolę w endoreduplicacji [26]. Cząsteczki kontrolujące cytoskelet, brudzę podziału komórkowego lub cytokinetyczny pierścień aktyno-miozynowy, takie jak RhoA, odgrywają rolę w endomitozie. Na przykład, zróżnicowane

hamowanie RhoA napędza endomitozę i późniejszą poliploidyzację w megakaryocytach [30]. Kinazy Aurora i pogo-podobne (PLKs) są zaangażowane w punkt kontrolny montażu wrzeciona (SAC), a ich deregulacja może prowadzić do niewydolności cytokinezji poprzez nieprawidłową segregację chromosomów [31]. Kolejnym czynnikiem istotnym w procesie endoreduplicacji jest Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome (APC/C), który degraduje między innymi mitotyczne cykliny, aby zapobiec wejściu komórki w mitozę. Obniżenie aktywności APC/C skutkuje stabilizacją białka Gemininy, która zapobiega ponownej replikacji DNA w fazie S i blokuje progresję endocyklu [29]. Wahania poziomu APC/C podczas endoreduplicacji sprzyjają progresji endocyklu [28].

Opisane przykłady interakcji pomiędzy kluczowymi dla podziałów mitotycznych białkami umożliwiają zachodzenie wspomnianych wariantów endoreplikacji.

POŚLIZG MITOTYCZNY I NIEPRAWIDŁOWA CYTOKINEZA

Poślizg mitotyczny, czyli niekompletna mitoza, może skutkować podwojeniem genomu w interfazie [32]. Komórki nie przechodzą cytokinezy, czyli podziału cytoplazmy i organelli, która jest ostatnim etapem podziału komórkowego. Proces cytokinezy zachodzi tuż po mitozie. W środkowej części komórki powstaje kurczliwy pierścień zbudowany z aktyny, miozyny i innych białek. Skurcz pierścienia prowadzi do powstania bruzdy podziałowej, która wraz z postępem cytokinezy tworzy barierę błonową między zawartością cytoplazmatyczną każdej komórki potomnej. Kurcząca się bruzda zwęza składniki strefy środkowej wrzeciona podziałowego w strukturę zwaną ciałem środkowym. W końcowym etapie cytokinezy bruzda „zamyka się”, tworząc dwie oddzielne komórki. Do przerwania cytokinezy może prowadzić rozregulowanie punktów kontrolnych cyklu komórkowego, a to z kolei może skutkować powstawaniem komórek tetraploidycznych i poliploidycznych [33]. Za jeden z mechanizmów mogących mieć istotny związek z aneuploidią i poliploidią w komórkach nowotworowych uważana jest nadmierna aktywacja punktu kontrolnego składania wrzeciona kariokinetycznego SAC (ang. *spindle assembly checkpoint*), który zapewnia dwubiegumowe mocowanie wrzeciona podziałowego przed rozpoczęciem anafazy [34]. Kluczowym białkiem zaangażowanym w SAC jest ligaza ubikwityny E3, CDC20, która wiąże się z białkami mitotycznego punktu kontrolnego: Mad2 (ang. *mitotic arrest-deficient 2*) i BubR1 (ang. *budding uninhibited by benzimidazoles related 1*), a następnie hamuje mediowaną przez APC/C ubikwitynację cyklinu B i sekuryny [35], co w normalnych komórkach prowadzi do anafazy. Uważa się, że nadmierna aktywacja Mad2 jest odpowiedzialna za indukcję aneuploidii i poliploidii w nowotworach [34], a nadeksprezja Mad2 powoduje poliploidię w wyniku niepowodzenia cytokinezy [36].

Z wielokrotnią liczbą chromosomów będącą następstwem poślizgu mitotycznego pozostaje w obrębie jednej poliploidycznej komórki. Czynnikiem prowadzącym do tego zjawiska jest chemioterapia indukująca uszkodzenia DNA oraz zatrzymanie syntezy lub depolimeryzacji mikrotubul [37]. Pierwszy przypadek mogą reprezentować komórki potrójnie ujemnego raka piersi (ang. *triple negative breast cancer – TNBC*) – linia MDA-MB-231 z mutacją w genie TP53, które odpowiadały na działanie antracykliny – doksorubicyny poliploidią zachodzącą na drodze poślizgu mitotycznego. Również antymetabolity takie jak 5-fluorouracyl w połączeniu z sulforafenem mogą prowadzić do poliploidii w komórkach TNBC [38]. Innym lekiem powodującym nieprawidłową cytokinezę i w konsekwencji powstawanie poliploidii w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc z niedoborem ERCC1 (ang. *excision repair cross-complementation group 1*) była cisplatyna [39]. Z kolei taksany hamują funkcję wrzeciona podziałowego a tym samym podział komórki, co może prowadzić do zajścia niepełnego cyklu komórkowego – bez cytokinezy i indukcji tetraploidii [40]. Badania prowadzone na komórkach jajnika (komórki chomika CHO i człowieka A2780) wykazały, że taksol prowadził do zablokowania mitozy, jednak komórki przełamły blok

mitotyczny i kontynuowały cykl komórkowy bez cytokinezy tworząc wielojadrzaste komórki poliploidyczne [41].

FUZJA KOMÓREK

Innym sposobem powstawania poliploidii jest fuzja dwóch komórek, która może zachodzić między komórkami tego samego lub innego typu. Fuzja komórek nowotworowych jest zjawiskiem występującym m.in. w guzach litych i prowadzi do wytworzenia subpopulacji komórek nowotworowych o większej zawartości DNA [42]. Ponadto, fuzja komórek zróżnicowanych z komórkami macierzystymi może odpowiadać za powstawanie nowotworowych komórek macierzystych, które stanowią niewielki odsetek komórek masy guza, ale są kluczowe dla wcześniejszych etapów jego wzrostu. Fuzja między komórkami nowotworowymi a komórkami śródblastu czy limfatycznymi może ułatwiać angiogenezę (proces tworzenia się naczyni krwionośnych) i limfangiogenezę (powstawanie naczyni limfatycznych) w obrębie guza, a tym samym przyspieszać jego wzrost [43]. Niedotlenienie jest opisywane jako jeden z czynników wyzwalających fuzję komórek i tworzenie PGCC [6,10], ale inne warunki, takie jak radioterapia [44] i chemioterapia [45], również mogą sprzyjać temu procesowi. W komórkach glejaka śmiertelna dawka promieniowania selekcyjnie oporną subpopulację (7-10% komórek), która przejściowo zatrzymuje się w fazie G2/M i przeżywa terapię. Ocenia się, że komórki te powstają w wyniku fuzji. Badania przeprowadzone na mieszanych kulturach zawierających komórki znakowane zielonymi i czerwonymi reporterami fluorescencyjnymi eksponowanymi na promieniowanie wykazaly, że większość komórek, które przeżyły eksperyment emitowała żółty sygnał [44]. Wydaje się jednak, że mechanizm ten nie jest jednym z częstszych sposobów powstawania poliploidii. W komórkach raka piersi i jajnika tylko 10-20% PGCC powstało w wyniku fuzji, a w komórkach śluzakowłókniakomiesaka (ang. *myxofibrosarcoma*) tylko jedna z wielu PGCC powstała w wyniku tego mechanizmu [46].

KANIBALIZM KOMÓRKOWY

Kanibalizm komórkowy (entoza) jest definiowany jako proces wchłaniania jednej komórki przez drugą, co skutkuje pojawiением się całych komórek w dużych wakuolach i może prowadzić do poliploidii w nowotworach [47]. Podobnie jak fuzja proces ten może zachodzić między komórkami różnych typów lub między komórkami tego samego rodzaju, jednak najczęściej obserwowany jest między komórkami nowotworowymi i jest wskaźnikiem złego rokowania [48-50]. Kanibalizm komórkowy można uznać za mechanizm przetrwania w niekorzystnych warunkach, takich jak niedobór składników odżywczych, niedotlenienie lub kwaśne pH [6]. Entoza obejmuje tworzenie połączeń adhezyjnych między komórkami nabłonkowymi, w których pośredniczy E-kadheryna, a następnie pochłanianie w sposób zależny od Rho-GTPazy i kinazy Rho [6,51]. Wykazano, że kanibalizm komórkowy może prowadzić do progresji nowotworu poprzez indukowanie poliploidii w komórkach. Do tworzenia poliploidii dochodzi na skutek zakłócenia podziału komórkowego, ponieważ wchłonięta komórka stanowi fizyczną przeszkodę w cytoplazmie gospodarza, co uniemożliwia prawidłowe zakończenie cytokinezy i podziału komór-

ki[50]. W rezultacie komórka zewnętrzna może ulec poliploidyzacji.

ZNACZENIE KOMÓREK WIEŁOJĄDRZASTYCH W OPORNOŚCI NA LEKI, PROGRESJI NOWOTWORÓW ORAZ GENEZA KOMÓREK POTOMNYCH O FENOTYPIE OPORNYM

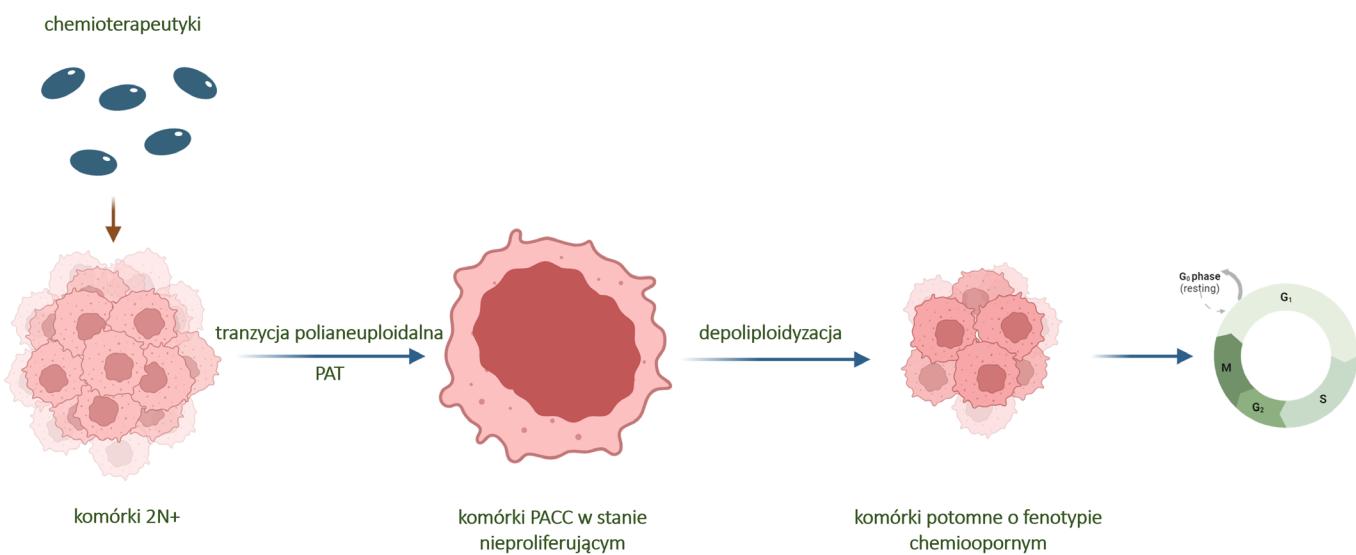
Zjawisko poliploidii pojawia się przede wszystkim jako skutek działania leków cytostatycznych, które pozostają podstawową i najczęstszą metodą leczenia nowotworów. Cisplatyna, dokosorubicyna (Adriamycyna), docetaksel (Taksotere), irynotekan (CPT-11, Camptosar®), czy pemetrexed (Alimta) to cytostatyki powszechnie wykorzystywane w leczeniu, między innymi raka szyjki macicy, raka płuc czy raka piersi. Was i wsp. w swojej pracy określili istotną rolę wymienionych leków w formowaniu się poliploidalnych komórek olbrzymich [6]. Cechą komórek poliploidalnych jest ich możliwość przetrwania terapii poprzez przejście w stan „spoczynku”, pozwalający na ochronę DNA przed uszkodzeniami dzięki zatrzymaniu podziałów mitotycznych. PGCC charakteryzuje się także zwiększoną zdolnością do inwazji i wyższym potencjałem przerzutowym [52]. Poza opornością na cytostatyki wykazują one zwiększoną ekspresję genów oporności na stres wywołyany takimi czynnikami jak niedotlenienie (hipoksja), ciśnienie mechaniczne, czy stan zakwaszenia środowiska, które są typowe dla środowiska wewnętrz guza [53].

Bukkuri i współautorzy stworzyli matematyczne modele do badania zjawiska oporności w populacjach komórek poddanych chemioterapii. Według nich aneuploidalne komórki nowotworowe, charakteryzujące się anormalną liczbą chromosomów $2N+$, ich zmianami strukturalnymi, delecjami i amplifikacjami, mogą przejść do stanu nieproliferacyjnego (PACC – odpowiednik PGCC) poprzez polianeuploidalną tranzycję [54]. Stan spoczynku PACC pojawia się jako następstwo endocyklu, który prowadzi do podwojenia materiału genomowego, w wyniku czego komórka posiada więcej materiału genetycznego niż w klasycznej fazie G2. Komórki wprowadzone w stan PACC wyzwalają

proces ewolucyjności, który polega na zdolności do generowania dziedzicznej oraz adaptacyjnej zmienności fenotypowej [55]. Proces depoliploidyzacji umożliwia komórkom powrót do stanu $2N+$, a tym samym kontynuację cyklu komórkowego i ponowny podział [54]. W następstwie tego zjawiska powstają komórki o fenotypie chemioopornym (Ryc. 2).

Obecnie wyróżnia się dwa procesy, które prowadzą do redukcji poliploidalności. Zespół z Shanghai w badaniach *in vitro* i *in vivo* zaobserwował unikalny mechanizm podziału komórkowego PGCC zwany neozą [7]. Ten typ podziału charakteryzuje się kariokinezą, która zachodzi w wyniku pączkowania jądrowego. W kolejnym etapie komórka przechodzi proces asymetrycznej cytokinyzy, która prowadzi do powstania jednojądrzastych, diploidalnych i aneuploidalnych komórek „Raju” [56]. W procesie tym ekspresji ulegają geny typowe dla mejozy. Powstałe w procesie depoliploidyzacji poliploidalne komórki nowotworowe $2N+$ mają możliwość powrotu do stanu diploidalnego [7]. Drugi typ redukcji poliploidalności polega na rozdzieleniu chromatyd siostrzanych na dwie komórki potomne w tak zwanym „późnym okresie mitozy”. W rezultacie następuje proces redukcji ze stanu tetraploidalnego do diploidalnego. Po tym etapie w ramach mejozy następują dwie dodatkowe transformacje eliminujące ploidalność komórki tetraploidalnej do haploidalnej [7].

Jedną z dwóch hipotez tłumaczących powstawanie oporności krzyżowej nowotworów na chemioterapeutyki o różnej strukturze chemicznej i niezależnym sposobie działania, jest wpływ pamięci PGCC i skrócony czas ponownej transzycji polianeuploidalnej po kolejnej dawce leków. Druga z badanych hipotez uwzględnia wyższy poziom wrodzonej oporności na chemioterapeutyki. Zespół badawczy do zweryfikowania hipotez wykorzystał stochastyczną symulację eko-ewolucyjnej dynamiki badanych populacji komórek nowotworowych, jednakże żadna z dwóch hipotez nie została dotychczas zweryfikowana eksperymentalnie.



Rycina 2. Schemat przedstawiający procesy prowadzące do powstania komórek w stanie spoczynku PACC, a następnie komórek potomnych o fenotypie opornym.

Coraz częściej mówi się o związku oraz podobieństwach komórek w stanie PACC/PGCC do komórek, w których starzenie zostało wyindukowane w następstwie terapii. Sikora i współautorzy wyróżnili starzenie (ang. *therapy-induced senescence* – TIS) i poliploidię (ang. *therapy-induced polyploidy* – TIP) jako dwa typy odpowiedzi na działanie terapii przeciwnowotworowych. W przypadku obydwoj typów komórek obserwuje się zatrzymanie podziałów komórkowych w następstwie aktywacji szlaków p53 i Rb, częstą autofagię, wyższy poziom uszkodzeń DNA, podobny profil ekspresji wielu genów i przywrócenie ekspresji genów charakterystycznych dla komórek macierzystych. W przeciwnieństwie do PACC/PGCC, które na drodze depoliploidyzacji mogą odzyskać zdolność do proliferacji, zatrzymanie komórek starzejących się w fazie G0 lub G1 cyklu uniemożliwia ich powrót do mitozy i uniknięcie śmierci. Zasugerowano jednak, że starzejące się komórki nowotworowe mogą zmieniać się w komórki poliploidalne, aby uniknąć śmierci wywoływanej leczeniem przeciwnowotworowym [57, 58].

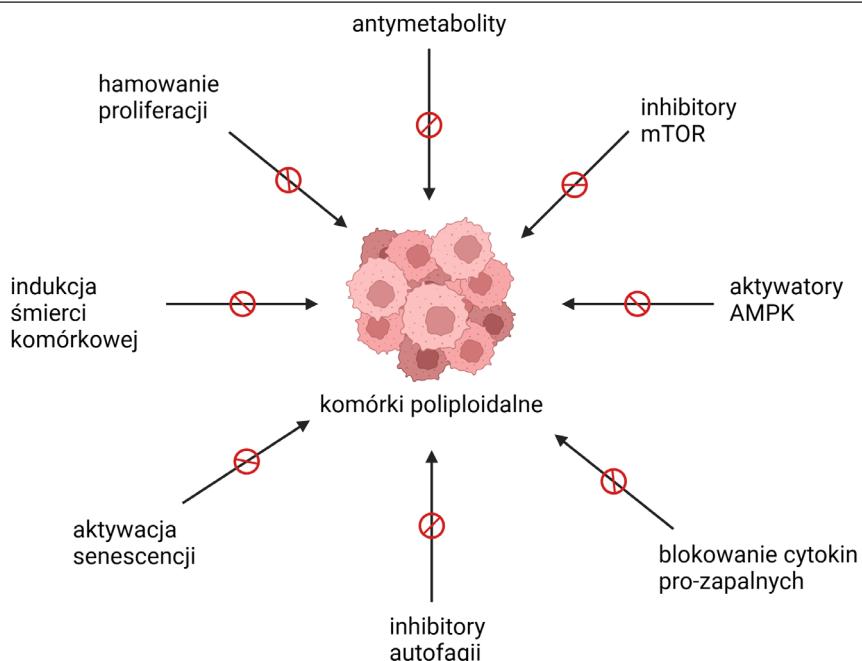
Macierzyste właściwości PACC/PGCC przejawiają się głównie poprzez profil ekspresji genów takich jak CD44 i CD133, co skłoniło do porównania ich do nowotworowych komórek macierzystych. Względnie wysoki poziom białek SOX2, Nanog i OCT4 zapewnia im zdolność do ponownej proliferacji i różnicowania w wiele typów komórek. Ponadto, pierwsza generacja komórek potomnych posiada markery typowe dla macierzystych komórek nowotworowych [7]. Niu i inni wykazali, że PGCC formujące się w raku jajnika posiadają podwyższoną ekspresję markerów embrionalnych komórek macierzystych, takich jak OCT4, NANOG, SOX2 i SOX4 [45]. Komórki potomne pochodzące z PGCC wykazywały co prawda obniżoną zdolność do inwazji, ale zwiększoną oporność na paklitaksel. Wyższączęstość komórek poliploidalnych zaobserwowano u pacjentów z nowotworami terminalnymi, u których nowotwór nie reagu-

je na leczenie, a powstawanie komórek anaplastycznych PGCC nasilało się po kolejnych cyklach chemioterapii [45]. Ponadto, PGCC spotykane są częściej w przerzutach niż w nowotworach pierwotnych. Zależność tą zaobserwowano podczas hodowli porównawczej pierwotnego guza trzustki i przerzutów do otrzewnej [59]. W badaniach przeprowadzonych przez Pienta i innych pokazano, że w wyniku 6-dniowego traktowania komórek raka prostaty PC3 doce-taxelem w hodowli pozostają niemal wyłącznie komórki o fenotypie poliploidalnym, co jednoznacznie wskazuje na ich charakter oporny względem tego chemoterapeutyku [52].

W dwóch liniach raka jajnika A2789 i SCOV-3 zaobserwowano powstawanie znacznej liczby komórek poliploidalnych o wielkości do 100 µm po 7 dniach od zakończenia 72-godzinnej inkubacji hodowli z cisplatyną. Pomiar zawartości materiału genetycznego w komórkach PGCC wskazał na 2,0- i 4,7-krotny wzrost zawartości DNA względem komórek diploidalnych. W przytoczonym przykładzie polinukleacja okazała się być również mechanizmem oporności na cisplatynę [53]. Ponadto, warunki naśladujące niedotlenienie wywołane inkubacją komórek raka jajnika z chlorkiem kobaltu (CoCl_2) także prowadziły do indukcji komórek PGCC opornych na pochodną platyny. Traktowanie linii MCF7 (rak piersi), T29H (rak jajnika) oraz HEY (rak jajnika) paklitaksemem w stężeniu 1 µM indukowało tranzycję polianeuploidalną oraz przejście komórek do stanu statycznego PGCC trwającego od 4 do 6 miesięcy, po którym rozpoczęła się neoza i generowanie komórek potomnych [60].

PERSPEKTYWY HAMOWANIA POLIPLOIDII INDUKOWANEJ CHEMIO- I RADIOTERAPIĄ ORAZ ELIMINOWANIA KOMÓRK POLIPLOIDALNYCH

Ponieważ powstawanie poliploidalnych komórek nowotworowych w znaczącym stopniu ogranicza powodzenie terapii, badacze starają się opracować nowe podejścia tera-



Rycina 3. Schematyczne przedstawienie głównych proponowanych rozwiązań terapeutycznych w celu zwalczania poliploidalnych olbrzymich komórek nowotworowych.

apeutyczne celujące w PGCC, a także hamujące ich powstawanie (Ryc. 3). Pod tym kątem wyłoniono kilka istotnych różnic pomiędzy komórkami poliploidalnymi i diploidalnymi. Pierwszą z nich jest duży rozmiar genomu i zwiększoną objętość komórek poliploidalnych, które w konsekwencji zwiększały zapotrzebowanie energetyczne. Ponadto, zwiększoną ekspresję mRNA i białek spowodowana zwiększoną zawartością DNA wymaga większych nakładów metabolicznych. Wykazano, że komórki poliploidalne ostrej białaczki szpikowej były wrażliwe na działanie analogu glukozy 2-DG. Sugeruje to, że hamowanie istotnych szlaków metabolizmu komórkowego może preferencyjnie zabijać poliploidalne komórki nowotworowe [5]. PGCC indukowane terapią cisplastynową charakteryzowały się zwiększoną zawartością lipidów w porównaniu z nieleczonymi komórkami nowotworowymi. Terapia kwasem zoledronowym (ZA), redukująca poziom tłuszczyków (lipidów) miała silny wpływ hamujący na PGCC, prowadząc do znacznej zmiany w ich aktywności metabolicznej [61]. Podobnie, zaburzenie syntezy cholesterolu za pomocą LCL521 lub symwastatyny zapobiegało tworzeniu kolonii potomnych PGCC [62]. Również specyficzne inhibitory kinazy serynowo-treoninowej mTOR, która łączy przekazywanie sygnału komórkowego z metabolizmem i proliferacją komórek, promują apoptozę i autofagię w komórkach nowotworowych ostrej białaczki szpikowej z poliploidią. Dodatkowo zwiększały skuteczność inhibitorów kinazy Aurora, potwierdzając tym samym, że metabolizm nowotworu może stanowić realny punkt interwencji terapeutycznej przeciwko komórkom nowotworowym z poliploidią. Hamowanie sygnalizacji mTOR zapobiegało powstawaniu poliploidii wywołanej terapią i utrzymywało wrażliwość komórek raka piersi i trzustki na działanie chemioterapii [5]. System kinaz białkowych aktywowanych AMP (AMPK), będący konserwatywnym ewolucyjnie punktem kontrolnym niskiego poziomu energii i działającym jako kanoniczny supresor proliferacji komórek, może być również celem molekularnym przeciwko poliploidii. Aktywacja AMPK przy użyciu inhibitora PDE-4, resweratrolu, salicylanu acetylu (aspiryny) oraz nadekspresja AMPK selektywnie zwalczają komórki tetraploidalne. Wymienione przykłady sugerują, że aktywacja AMPK przy użyciu naturalnych produktów, resweratrolu i aspiryny, może być wykorzystana do specyficznego celowania w tetraploidalne komórki nowotworowe w warunkach *in vitro* i *in vivo* [5].

Kolejną cechą wyróżniającą komórki poliploidalne jest profil ekspresji i wydzielania przez nie cytokin. Mediatorzy pro-zapalne takie jak interleukiny: IL-6, IL-8, IL-1 β i Gro-1, ulegają nasilonej ekspresji w PGCC w odpowiedzi na szok genotoksyczny wywołany lekiem, a ich sekrecja prowadzi do przeprogramowania mikrośrodowiska nowotworu, promując w ten sposób jego rozwój. Zablokowanie funkcji IL-6 przy użyciu specyficznego przeciwciała (tocilizumab) zmniejszyło wzrost guza u myszy z przeszczepionymi komórkami pochodząymi od pacjentów [63]. W innym badaniu wykazano, że hamowanie IL-1 β wzmacniało proapoptotyczne działanie docetakselu w PGCC [64]. Identyfikacja białek, które są niezbędne do przeżycia czy późniejszych podziałów komórek o zwiększonej ploidalności oraz do proliferacji komórek potomnych stanowi obiecującą strategię do walki z PGCC. Wykazano, że komórki z duplikacją

całego genomu są bardziej zależne od KIF18A w porównaniu do ich normalnych odpowiedników [65]. Białko KIF18A należące do nadrodziny kinezyn wykorzystuje hydrolizę ATP do depolimeryzacji mikrotubul w czasie podziałów mitotycznych, będąc tym samym istotnym elementem systemu umożliwiającego proliferację komórek. Białkiem zaangażowanym w powstawanie PGCC jest PRL3, ulegające specyficznej nadekspresji w 80,6% nowotworów. Badania na modelu mysim wskazały skuteczność immunoterapii opartej na humanizowanym przeciwciele PRL3-zumab, która ograniczała nawrót nowotworu [66]. W pierwszej fazie badań klinicznych nad nowotworami opornymi na leczenie i hematologicznymi przeciwiąło to okazało się być skuteczne u części pacjentów z guzami litymi [67].

Kolejnym podejściem do problemu poliploidalności są próby indukowania senescencji i śmierci komórkowej [63]. Flawopirydol, inhibitor kinaz zależnych od cyklin (CDK) o szerokim spektrum działania wykazał potencjał do zmniejszenia indukcji PGCC przez leki oddziałujące na wrzeciono podziałowe. Leczenie flawopirydolem zatrzymało komórki nowotworowe w fazie G1 i zapobiegało tworzeniu komórek poliploidalnych poprzez endoreduplicację [68]. Z kolei zablokowanie białka mitotycznego PLK1 zmniejszało przeżycie tetraploidalnych komórek nowotworu jelita grubego [69]. Inhibitory HDAC (deacetylazy histonów) hamują proliferację komórek nowotworowych i nowotworowych komórek macierzystych, tranzycję epithelialno-mezechymalną i samoodnowę guzów, ograniczając tym samym inwazję raka i przerzuty. Badania wykazały, że inhibitory HDAC znaczco zmniejszają pulę PGCC indukowanych lekami przeciwnowotworowymi [70,71]. Hamowanie aktywności białek antyapoptotycznych może być strategią eliminacji komórek wielojądrzastych. Zahamowanie aktywności Bcl-xL przez drobnocząsteczkowy inhibitor ABT-263 lub siRNA powoduje szybki zanik komórek poliploidalnych w populacji komórek ostrej białaczki szpikowej [72]. W przypadku chloniaków z komórką B zastosowanie Venetoclaxu, który jest inhibitorem BCL-2, umożliwiło eliminację komórek PGCC [73]. PGCC wykazują niedostateczną ekspresję regulatorów ferroptozy (FTL, FTH1 i SLC3A2) i zwiększyły poziom RFT, co charakteryzuje komórki wrażliwe na zależną od żelaza nieapoptotyczną śmierć komórek. Potwierdzono to w badaniach z użyciem 5 induktorów ferroptozy, których mechanizm działania opierał się na hamowaniu peroxsydazy glutationowej 4 (RSL3, ML162, FINO2 i ML210) lub systemie Xc- (IKE). Wszystkie analizowane związki obniżały przeżywalność PGCC nowotworu piersi [70].

Wykazano, że autofagia odgrywa kluczową rolę w indukcji PGCC. Modulatory autofagii takie jak hydroksychlorochina, nelfinawir i rapamycyna zastosowane po chemioterapii redukowały liczbę powstających PGCC w raku jajnika i mogą w przyszłości stać się istotnym elementem skojarzonych terapii przeciwnowotworowych [74].

Hipoksja sprzyja powstawaniu PGCC, dlatego celowanie w niedotlenione mikrośrodowisko guza lub w odpowiedź komórek na ograniczony dostęp do tlenu może hamować poliploidię [10]. W komórkach poliploidalnych indukowanych CoCl₂ ekspresja HIF1 α , głównego czynnika transkrypcyjnego aktywowanego niedoborem tlenu, istotnie wzra-

stała. Zmianie ulegała także subkomórkowa lokalizacja tego białka, co przekładało się na zwiększoną proliferację, migrację i invazję komórek potomnych wywodzących się z komórek poliploidalnych poddanych hipoksji. Wykazano, że czynnik transkrypcyjny związany z mikroftalmią (MITF) reguluje ekspresję HIF1α oraz SUMOilację tego białka [75]. Terapie celujące w MITF oraz HIF1α mogą zapobiegać powstawaniu PGCC.

Zaproponowano również inne rozwiązania ukierunkowane na PGCC, jednakże ich mechanizm nie został do końca poznany. Dla przykładu, środek antykoncepcyjny mifepriston blokuje tworzenie komórek poliploidalnych podczas terapii olaparibem oraz redukuje wzrost guzów opornych na terapię inhibitorem PARP. Wśród potencjalnych mechanizmów wyróżnia się promowanie różnicowania PGCC i komórek potomnych w kierunku linii łagodnych oraz blokowanie działania receptora glukokortykoidowego przez mifepriston [76]. Związek antyestrogenowy tamoksifen może przynosić korzyści kliniczne w leczeniu raka prostaty, glejaka i czerniaka, niezależnie od sygnalizacji estrogenowej. Może to wynikać z hamowania kwaśnej ceramidazy ASAHI, co zapobiega podziałom amitotycznym PGCC z nierówną dystrybucją materiału genetycznego do komórek potomnych [77].

Dokładne poznanie specyfiki komórek poliploidalnych, ich cech charakterystycznych, swoistych markerów i wewnętrzkomórkowych procesów inicjujących ponowne podziały po etapie ich tymczasowego zahamowania może ujawnić nowe cele terapeutyczne do kontrolowania progressji raka oraz niesie ze sobą wizję poprawy skuteczności leczenia nowotworów za pomocą radio- i chemioterapii.

PODSUMOWANIE

Z punktu widzenia skuteczności terapii przeciwnowotworowych zasadne jest równolegle zapobieganie powstawaniu komórek poliploidalnych oraz ich efektywna eliminacja w trakcie radioterapii i chemioterapii. Obecnie proponowane i testowane podejścia opierają się głównie na wykorzystaniu związków ingerujących w sygnalizację komórkową i metabolizm komórek PGCC. W dalszym ciągu nie wiemy czym charakteryzują się komórki, które mogą wchodzić w cykle endoreduplicacji, unikać mitozy, ulegać fuzji czy wchłaniać komórki sąsiadujące. Wydaje się, że obecnie stosowane techniki takie jak sekwencjonowanie pojedynczych komórek mogłyby pomóc zidentyfikować frakcje komórek w populacji i wyłonić potencjalne prekursory PGCC. Brakuje również danych dotyczących profilu ekspresji genów i prawdopodobnych zmian w genomach komórek potomnych PGCC. Czy neoza, asymetryczna mitoza i podział podobny do mejozy odtwarzają dokładnie genomy komórek diploidalnych lub polianeuploidalnych sprzed fazy PGCC? Czy też przekazują tylko „pamięć” w formie modyfikacji potranslacyjnych chromatyny i DNA prowadzące do innej ekspresji genów, a przez to adaptacji komórek potomnych do środowiska, w którym działają czynniki geno- i cytotoksyczne? Postęp w zakresie nowych technologii niewątpliwie ułatwi uzyskanie odpowiedzi na te i wiele innych nasuwających się pytań, które mogą przyczynić się do opracowania terapii skojarzonych, gdzie jeden

z leków wykorzysta słabe punkty komórek poliploidalnych, ich prekursorów lub komórek potomnych.

PIŚMIENNICTWO

1. Behranvand N, Nasri F, Zolfaghari Emameh R, Khani P, Hosseini A, Garsen J, Falak R (2022) Chemotherapy: a double-edged sword in cancer treatment. *Cancer Immunol Immunother* 71:507–526. <https://doi.org/10.1007/s00262-021-03013-3>
2. Zheng H-C (2017) The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget* 8:59950–59964. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19048>
3. Khan SU, Fatima K, Aisha S, Malik F (2024) Unveiling the mechanisms and challenges of cancer drug resistance. *Cell Commun Signal* 22:109. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01302-1>
4. Zhang J, Qiao Q, Xu H, Zhou R, Liu X (2022) Human cell polypliodization: The good and the evil. *Seminars in Cancer Biology* 81:54–63. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.04.005>
5. Coward J, Harding A (2014) Size Does Matter: Why Polyploid Tumor Cells are Critical Drug Targets in the War on Cancer. *Front Oncol* 4:1. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00123>
6. Was H, Borkowska A, Olszewska A, Klemba A, Marciniak M, Synowiec A, Kieda C (2022) Polyploidy formation in cancer cells: How a Trojan horse is born. *Seminars in Cancer Biology* 81:24–36. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.03.003>
7. Song Y, Zhao Y, Deng Z, Zhao R, Huang Q (2021) Stress-Induced Polyploid Giant Cancer Cells: Unique Way of Formation and Non-Negligible Characteristics. *Front Oncol* 11:724781. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.724781>
8. Alameddine RS, Hamieh L, Shamseddine A (2014) From Sprouting Angiogenesis to Erythrocytes Generation by Cancer Stem Cells: Evolving Concepts in Tumor Microcirculation. *BioMed Research International* 2014:1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/986768>
9. Zhou X, Zhou M, Zheng M, Tian S, Yang X, Ning Y, Li Y, Zhang S (2022) Polyploid giant cancer cells and cancer progression. *Front Cell Dev Biol* 10:1017588. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1017588>
10. Lopez-Sánchez LM, Jimenez C, Valverde A, Hernandez V, Peñaranda J, Martínez A, Lopez-Pedrera C, Muñoz-Castañeda JR, De la Haba-Rodríguez JR, Aranda E i inni (2014) CoCl₂, a Mimic of Hypoxia, Induces Formation of Polyploid Giant Cells with Stem Characteristics in Colon Cancer. *PLoS ONE* 9:e99143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099143>
11. Zhang S, Mercado-Uribe I, Xing Z, Sun B, Kuang J, Liu J (2014) Generation of cancer stem-like cells through the formation of polyploid giant cancer cells. *Oncogene* 33:116–128. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.96>
12. Moein S, Adibi R, da Silva Meirelles L, Nardi NB, Gheisari Y (2020) Cancer regeneration: Polyploid cells are the key drivers of tumor progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1874:188408. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188408>
13. Lee HO, Davidson JM, Duronio RJ (2009) Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Dev* 23:2461–2477. <https://doi.org/10.1101/gad.1829209>
14. Edgar BA, Orr-Weaver TL (2001) Endoreplication Cell Cycles. *Cell* 105:297–306. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00334-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00334-8)
15. Lilly MA, Duronio RJ (2005) New insights into cell cycle control from the *Drosophila* endocycle. *Oncogene* 24:2765–2775. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208610>
16. Zhong W, Feng H, Santiago FE, Kipreos ET (2003) CUL-4 ubiquitin ligase maintains genome stability by restraining DNA-replication licensing. *Nature* 423:885–889. <https://doi.org/10.1038/nature01747>
17. Parekh A, Das S, Parida S, Das CK, Dutta D, Mallick SK, Wu PH, Kumar BNP, Bharti R, Dey G i inni (2018) Multi-nucleated cells use ROS to induce breast cancer chemo-resistance in vitro and in vivo. *Oncogene* 37:4546–4561. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0272-6>
18. Cartsburg O, Kallen C, Hillenkamp J, Sundmacher R, Pomjanski N, Böcking A (2001) Topical Mitomycin C and Radiation Induce Con-

- junctival DNA-Polyplody. *Analytical Cellular Pathology* 23:65–74. <https://doi.org/10.1155/2001/961735>
19. Mann J, Yang N, Montpetit R, Kirschenman R, Lemieux H, Goping IS (2020) BAD sensitizes breast cancer cells to docetaxel with increased mitotic arrest and necroptosis. *Sci Rep* 10:355. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57282-1>
 20. Wertz IE, Kusam S, Lam C, Okamoto T, Sandoval W, Anderson DJ, Helgason E, Ernst JA, Eby M, Liu J i inni (2011) Sensitivity to anti-tubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature* 471:110–114. <https://doi.org/10.1038/nature09779>
 21. Yeung T, Fung O, Bashkurov M, Khandani A, Subedar O, Wudwud A, Shaw P, Clarke B, Bartlett J, Rottapel R i inni (2019) Avoidance of apoptotic death via a hyperploid salvage survival pathway after platinum treatment in high grade serous carcinoma cell line models. *Oncotarget* 10:6691–6712. <https://doi.org/10.18633/oncotarget.27330>
 22. Wolf KW, Mentzel M, Mendoza AS (1996) Treatment with the anti-tumor drugs, cis-platin and mafosfamide, does not affect the structure of prekinetochores in a human breast cancer cell line. An immunofluorescence study using human anticentromere autoantibodies. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 178:425–432. [https://doi.org/10.1016/S0940-9602\(96\)80132-4](https://doi.org/10.1016/S0940-9602(96)80132-4)
 23. Cortés F, Mateos S, Pastor N, Domínguez I (2004) Toward a comprehensive model for induced endoreduplication. *Life Sciences* 76:121–135. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.08.006>
 24. Vigneron A, Roninson IB, Gamelin E, Coqueret O (2005) Src Inhibits Adriamycin-Induced Senescence and G2 Checkpoint Arrest by Blocking the Induction of p21waf1. *Cancer Research* 65:8927–8935. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0461>
 25. Jackson TR, Salmina K, Hunziker A, Inashkina I, Jankevics E, Riekstina U, Kalnina Z, Ivanov A, Townsend PA, Cragg MS i inni (2013) DNA damage causes TP53-dependent coupling of self-renewal and senescence pathways in embryonal carcinoma cells. *Cell Cycle* 12:430–441. <https://doi.org/10.4161/cc.23285>
 26. Mehrotra S, Maqbool SB, Kolpakas A, Murnen K, Calvi BR (2008) Endocycling cells do not apoptose in response to DNA rereplication genotoxic stress. *Genes Dev* 22:3158–3171. <https://doi.org/10.1101/gad.171020>
 27. Smith J, Mun Tho L, Xu N, A. Gillespie D (2010) The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer. In: *Advances in Cancer Research*. Elsevier, pp 73–112
 28. Shu Z, Row S, Deng W-M (2018) Endoreplication: The Good, the Bad, and the Ugly. *Trends in Cell Biology* 28:465–474. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.006>
 29. Zielke N, Querings S, Rottig C, Lehner C, Sprenger F (2008) The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is required for rereplication control in endoreplication cycles. *Genes Dev* 22:1690–1703. <https://doi.org/10.1101/gad.469108>
 30. Gao Y, Smith E, Ker E, Campbell P, Cheng EC, Zou S, Lin S, Wang L, Halene S, Krause DS (2012) Role of RhoA-Specific Guanine Exchange Factors in Regulation of Endomitosis in Megakaryocytes. *Developmental Cell* 22:573–584. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.12.019>
 31. Gandarillas A, Molinuevo R, Sanz-Gómez N (2018) Mammalian endoreplication emerges to reveal a potential developmental timer. *Cell Death Differ* 25:471–476. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0040-0>
 32. Salmina K, Bojko A, Inashkina I, Staniak K, Dudkowska M, Podlesniy P, Rummels F, Vainshelbaum NM, Pjanova D, Sikora E i inni (2020) “Mitotic Slippage” and Extranuclear DNA in Cancer Chemoresistance: A Focus on Telomeres. *IJMS* 21:2779. <https://doi.org/10.3390/ijms21082779>
 33. Normand G, King RW (2010) Understanding Cytokinesis Failure. In: Poon RYC (ed) *Polyplloidization and Cancer*. Springer New York, New York, NY, pp 27–55
 34. Schwartzman J-M, Sotillo R, Benezra R (2010) Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease. *Nat Rev Cancer* 10:102–115. <https://doi.org/10.1038/nrc2781>
 35. Weaver BAA, Cleveland DW (2009) The role of aneuploidy in promoting and suppressing tumors. *Journal of Cell Biology* 185:935–937. <https://doi.org/10.1083/jcb.200905098>
 36. Sotillo R, Hernando E, Díaz-Rodríguez E, Teruya-Feldstein J, Cordón-Cardo C, Lowe SW, Benezra R (2007) Mad2 Overexpression Promotes Aneuploidy and Tumorigenesis in Mice. *Cancer Cell* 11:9–23. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.019>
 37. Balachandran RS, Kipreos ET (2017) Addressing a weakness of anti-cancer therapy with mitosis inhibitors: Mitotic slippage. *Molecular & Cellular Oncology* 4:e1277293. <https://doi.org/10.1080/23723556.2016.1277293>
 38. Milczarek M, Wiktorzka K, Mielczarek L, Koronkiewicz M, Dąbrowska A, Lubelska K, Matosiuk D, Chilmonczyk Z (2018) Autophagic cell death and premature senescence: New mechanism of 5-fluorouracil and sulforaphane synergistic anticancer effect in MDA-MB-231 triple negative breast cancer cell line. *Food and Chemical Toxicology* 111:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.10.056>
 39. Friboulet L, Postel-Vinay S, Sourisseau T, Adam J, Stoclin A, Ponsonnailles F, Dorvault N, Commo F, Saulnier P, Salome-Desmoulez S i inni (2013) ERCC1 function in nuclear excision and interstrand cross-link repair pathways is mediated exclusively by the ERCC1-202 isoform. *Cell Cycle* 12:3298–3306. <https://doi.org/10.4161/cc.26309>
 40. Nakayama Y, Inoue T (2016) Antiproliferative Fate of the Tetraploid Formed after Mitotic Slippage and Its Promotion; A Novel Target for Cancer Therapy Based on Microtubule Poisons. *Molecules* 21:663. <https://doi.org/10.3390/molecules21050663>
 41. Lopes NM, Adams EG, Pitts TW, Bhuyan BK (1993) Cell kill kinetics and cell cycle effects of taxol on human and hamster ovarian cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 32:235–242. <https://doi.org/10.1007/BF00685842>
 42. Wakeling WF, Greetham J, Bennett DC (1994) Efficient Spontaneous Fusion Between Some Co-cultured Cells, Especially Murine Melanoma Cells. *Cell Biology International* 18:207–210. <https://doi.org/10.1006/cbir.1994.1063>
 43. Song K, Song Y, Zhao XP, Shen H, Wang M, Yan TL, Liu K, Shang ZJ (2014) Oral cancer/endothelial cell fusion experiences nuclear fusion and acquisition of enhanced survival potential. *Experimental Cell Research* 328:156–163. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.07.006>
 44. Kaur E, Rajendra J, Jadhav S, Shridhar E, Goda JS, Moiyadi A, Dutt S (2015) Radiation-induced homotypic cell fusions of innately resistant glioblastoma cells mediate their sustained survival and recurrence. *Carcinogenesis* 36:685–695. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv050>
 45. Niu N, Mercado-Uribe I, Liu J (2017) Dedifferentiation into blastomere-like cancer stem cells via formation of polyploid giant cancer cells. *Oncogene* 36:4887–4900. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.72>
 46. Ariizumi T, Ogose A, Kawashima H, Hotta T, Umezu H, Endo N (2009) Multinucleation followed by an acytokinetic cell division in myxofibrosarcoma with giant cell proliferation. *J Exp Clin Cancer Res* 28:44. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-28-44>
 47. Overholtzer M, Brugge JS (2008) The cell biology of cell-in-cell structures. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:796–809. <https://doi.org/10.1038/nrm2504>
 48. Sharma N, Dey P (2011) Cell cannibalism and cancer. *Diagnostic Cytopathology* 39:229–233. <https://doi.org/10.1002/dc.21402>
 49. Abodief WT, Dey P, Al-Hattab O (2006) Cell cannibalism in ductal carcinoma of breast. *Cytopathology* 17:304–305. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2006.00326.x>
 50. Krajcovic M, Johnson NB, Sun Q, Normand G, Hoover N, Yao E, Richardson AL, King RW, Cibas ES, Schnitt SJ i inni (2011) A non-genetic route to aneuploidy in human cancers. *Nat Cell Biol* 13:324–330. <https://doi.org/10.1038/ncb2174>
 51. Overholtzer M, Mailleux AA, Mouneimne G, Normand G, Schnitt SJ, King RW, Cibas ES, Brugge JS (2007) A Nonapoptotic Cell Death Process, Entosis, that Occurs by Cell-in-Cell Invasion. *Cell* 131:966–979. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.040>
 52. Pienta KJ, Hammarlund EU, Axelrod R, Brown JS, Amend SR (2020) Poly-aneuploid cancer cells promote evolvability, generating lethal cancer. *Evolutionary Applications* 13:1626–1634. <https://doi.org/10.1111/eva.12929>
 53. Adibi R, Moein S, Gheisari Y (2023) Cisplatin-resistant ovarian cancer cells reveal a polyploid phenotype with remarkable activation of nu-

- clear processes. *Adv Biomed Res* 12:77. https://doi.org/10.4103/abr.abr_348_21
54. Bukkuri A, Pienta KJ, Austin RH, Hammarlund EU, Amend SR, Brown JS (2023) A mathematical investigation of polyaneuploid cancer cell memory and cross-resistance in state-structured cancer populations. *Sci Rep* 13:15027. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42368-8>
 55. Payne JL, Wagner A (2019) The causes of evolvability and their evolution. *Nat Rev Genet* 20:24–38. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0069-z>
 56. Sundaram M, Guernsey DL, Rajaraman MM, Rajaraman R (2004) Neosis: A Novel Type of Cell Division in Cancer. *Cancer Biology & Therapy* 3:207–218. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.2.663>
 57. Wang Q, Wu PC, Dong DZ, Ivanova I, Chu E, Zeliadt S, Vesselle H, Wu DY (2013) Polypliody road to therapy-induced cellular senescence and escape. *Intl Journal of Cancer* 132:1505–1515. <https://doi.org/10.1002/ijc.28710>
 58. Mallin MM, Kim N, Choudhury MI, Lee SJ, An SS, Sun SX, Konstantopoulos K, Pienta KJ, Amend SR (2023) Cells in the polyaneuploid cancer cell (PACC) state have increased metastatic potential. *Clin Exp Metastasis* 40:321–338. <https://doi.org/10.1007/s10585-023-10216-8>
 59. Hasegawa K, Suetsugu A, Nakamura M, Matsumoto T, Aoki H, Kunisada T, Shimizu M, Saji S, Moriwaki H, Hoffman RM (2017) Imaging the Role of Multinucleate Pancreatic Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts in Peritoneal Metastasis in Mouse Models. *AR* 37: <https://doi.org/10.21873/anticancres.11711>
 60. Zhang S, Mercado-Uribe I, Liu J (2014) Tumor stroma and differentiated cancer cells can be originated directly from polyplioid giant cancer cells induced by paclitaxel. *Intl Journal of Cancer* 134:508–518. <https://doi.org/10.1002/ijc.28319>
 61. Adibi R, Moein S, Gheisari Y (2023) Zoledronic acid targets chemo-resistant polyplioid giant cancer cells. *Sci Rep* 13:419. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-27090-1>
 62. White-Gilbertson S, Lu P, Esobi I, Echesabal-Chen J, Mulholland PJ, Gooz M, Ogretmen B, Stamatikos A, Voelkel-Johnson C (2022) Polyplioid giant cancer cells are dependent on cholesterol for progeny formation through amitotic division. *Sci Rep* 12:8971. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12705-4>
 63. Liu J, Niu N, Li X, Zhang X, Sood AK (2022) The life cycle of polyplioid giant cancer cells and dormancy in cancer: Opportunities for novel therapeutic interventions. *Seminars in Cancer Biology* 81:132–144. <https://doi.org/10.1016/j.semcaner.2021.10.005>
 64. Zhao S, Xing S, Wang L, Ouyang M, Liu S, Sun L, Yu H (2023) IL-1 β is involved in docetaxel chemoresistance by regulating the formation of polyplioid giant cancer cells in non-small cell lung cancer. *Sci Rep* 13:12763. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39880-2>
 65. Quinton RJ, DiDomizio A, Vittoria MA, Kotýnková K, Ticas CJ, Patel S, Koga Y, Vakhshoorzadeh J, Hermance N, Kuroda TS i inni (2020) Whole genome doubling confers unique genetic vulnerabilities on tumor cells. *Nature* 590(7846):492–497. doi:10.1038/s41586-020-03133-3
 66. Thura M, Ye Z, Al-Aidaroos AQ, Xiong Q, Ong JY, Gupta A, Li J, Guo K, Ang KH, Zeng Q (2021) PRL3 induces polyplioid giant cancer cells eliminated by PRL3-zumab to reduce tumor relapse. *Commun Biol* 4:923. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02449-8>
 67. Chee CE, Ooi M, Lee SC, Sundar R, Heong V, Yong WP, Ng CH, Wong A, Lim JSJ, Tan DSP i inni (2023) A Phase I, First-in-Human Study of PRL3-zumab in Advanced, Refractory Solid Tumors and Hematological Malignancies. *Targ Oncol* 18:391–402. <https://doi.org/10.1007/s11523-023-00962-w>
 68. Ghosh S, Choudhury D, Ghosh D, Mondal M, Singha D, Malakar P (2024) Characterization of polypliody in cancer: Current status and future perspectives. *International Journal of Biological Macromolecules* 268:131706. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131706>
 69. Jemaà M, Kifagi C, Serrano SS, Massoumi R (2020) Preferential Killing of Tetraploid Colon Cancer Cells by Targeting the Mitotic Kinase PLK1. *Cell Physiol Biochem* 54:303–320. <https://doi.org/10.33594/000000221>
 70. Zhou M, Ma Y, Chiang CC, Rock EC, Butler SC, Anne R, Yatsenko S, Gong Y, Chen YC (2023) Single-cell morphological and transcriptome analysis unveil inhibitors of polyplioid giant breast cancer cells in vitro. *Commun Biol* 6:1301. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05674-5>
 71. Havas AP, Rodrigues KB, Bhakta A, Demirjian JA, Hahn S, Tran J, Scavello M, Tula-Sanchez AA, Zeng Y, Schmelz M i inni (2016) Belinostat and vincristine demonstrate mutually synergistic cytotoxicity associated with mitotic arrest and inhibition of polypliody in a preclinical model of aggressive diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Biology & Therapy* 17:1240–1252. <https://doi.org/10.1080/15384047.2016.1250046>
 72. Zhou W, Xu J, Gelston E, Wu X, Zou Z, Wang B, Zeng Y, Wang H, Liu A, Xu L i inni (2015) Inhibition of Bcl-xL overcomes polypliody resistance and leads to apoptotic cell death in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget* 6:21557–21571. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4306>
 73. Portelinha A, da Silva Ferreira M, Erazo T, Jiang M, Asgari Z, de Stanchina E, Younes A, Wendel HG (2023) Synthetic lethality of drug-induced polypliody and BCL-2 inhibition in lymphoma. *Nat Commun* 14:1522. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37216-2>
 74. Bowers RR, Andrade MF, Jones CM, White-Gilbertson S, Voelkel-Johnson C, Delaney JR (2022) Autophagy modulating therapeutics inhibit ovarian cancer colony generation by polyplioid giant cancer cells (PGCCs). *BMC Cancer* 22:410. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09503-6>
 75. Zheng M, Tian S, Zhou X, Yan M, Zhou M, Yu Y, Zhang Y, Wang X, Li N, Ren L i inni (2024) MITF regulates the subcellular location of HIF1α through SUMOylation to promote the invasion and metastasis of daughter cells derived from polyplioid giant cancer cells. *Oncol Rep* 51:63. <https://doi.org/10.3892/or.2024.8722>
 76. Zhang X, Yao J, Li X, Niu N, Liu Y, Hajek RA, Peng G, Westin S, Sood AK, Liu J (2023) Targeting polyplioid giant cancer cells potentiates a therapeutic response and overcomes resistance to PARP inhibitors in ovarian cancer. *Sci Adv* 9:eadf7195. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adf7195>
 77. White-Gilbertson S, Lu P, Jones CM, Chiodini S, Hurley D, Das A, Delaney JR, Norris JS, Voelkel-Johnson C (2020) Tamoxifen is a candidate first-in-class inhibitor of acid ceramidase that reduces amitotic division in polyplioid giant cancer cells—Unrecognized players in tumorigenesis. *Cancer Medicine* 9:3142–3152. <https://doi.org/10.1002/cam4.2960>

Polyplioidy as an outcome of anticancer therapies and a contributing cause of their lack of efficacy

Kinga Kołacz^{1,2✉}, Karolina Gronkowska^{1,2}, Magdalena Strachowska^{1,2}, Agnieszka Robaszkiewicz^{1✉}

¹Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź

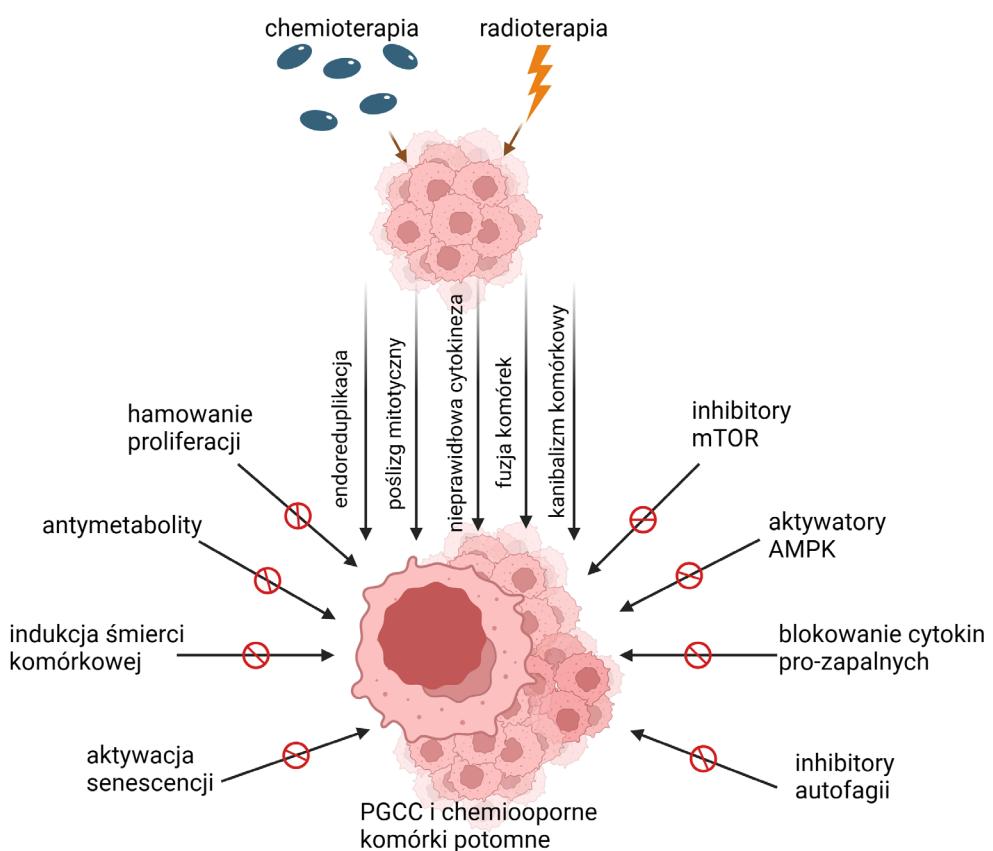
²Bio-Med-Chem Doctoral School of the University of Łódź and Łódź Institutes of the Polish Academy of Sciences, University of Łódź

✉corresponding authors: kinga.kolacz@edu.uni.lodz.pl; agnieszka.robaszkiewicz@biol.uni.lodz.pl

Keywords: polyplioid giant cancer cells, multidrug resistance, chemotherapy, endoreduplication, depolyplioidization

ABSTRACT

In addition to innate and gained resistance, polyploidy of cancer cells is described as a mechanism responsible for lack of response or cancer relapses after initial patient recovery. Formation of these cells is induced by cyto- and genotoxic agents, which trigger endoreduplication, cytokinesis failure, cell fusion or canibalism. These processes lead to amplification of DNA, cell cycle arrest and escape from death. Cancer reinitiation results from depolyplioidization by neosis, amitotic and meiotic-like divisions. In this paper we review the known mechanisms, which drive cancer cell transition to polyploidy, major features of these cells and their role in cancer progression. We also depict the current approaches, which target metabolic and signaling pathways that are crucial for survival and functioning of polyploid cells. Literature data indicate that the combination of chemotherapy and radiotherapy with agents capable of inhibiting or eliminating polyploid cells could substantially improve the success rate and efficacy of anticancer therapies.



Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Ogólnej
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
magdalena.strachowska@edu.uni.lodz.pl

Łódź, 09.12.2024r.

Mgr Magdalena Strachowska

OŚWIADCZENIE

Dotyczy publikacji:

- 1) **Strachowska, M.; Gronkowska, K.; Michlewska, S.; Robaszkiewicz, A. (2021). CBP/p300 Bromodomain Inhibitor-I-CBP112 Declines Transcription of the Key ABC Transporters and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapy Drugs. Cancers, 13(18), 4614.**

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na wykonaniu eksperymentów określających wpływ I-CBP112 na ułatwienie komórek na działanie cytostatyków (w tym test wykorzystujący resazurynę oraz ApoTox-Glo Triplex Assay), porównaniu działania I-CBP112 oraz powszechnie stosowanych inhibitorów ABC, określeniu zmian w ekspresji trasporterów ABC po zastosowaniu badanego inhibitora (w tym wykonanie Real-Time PCR, Western Blot oraz mikroskopii konfokalnej) oraz jego wpływie na akumulowanie leków, porównaniu działania I-CBP112 w linii MDA-MB-231 z linią HepG2, analizie statystycznej oraz interpretacji otrzymanych wyników, przygotowaniu figur, tekstu manuskryptu oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy oceniam na 45%.

- 2) **Strachowska, M.; Gronkowska, K.; Sobczak, M.; Grodzicka, M.; Michlewska, S.; Kołacz, K.; Sarkar, T.; Korszon, J.; Ionov, M.; Robaszkiewicz, A. (2023). I-CBP112 declines overexpression of ATP-binding cassette transporters and sensitized drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines to chemotherapy drugs. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie, 168, 115798.**

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na wykonaniu eksperymentów dotyczących potwierdzenia oporności uzyskanych linii MDA-MB-231 (w tym ocena wrażliwości na cytostatyki oraz analiza ekspresji transporterów ABC z wykorzystaniem techniki Real-Time PCR, Western Blot oraz mikroskopii konfokalnej), określeniu wpływu I-CBP112 na ekspresję trasporterów ABC oraz akumulację leków (Real-Time PCR, Western Blot oraz mikroskopia konfokalna, ponadto dla akumulacji leków wykonana została cytometria przepływowa), wygenerowaniu sferoidów oraz weryfikacji wpływu I-CBP112 na akumulowanie leków wewnątrz kultur 3D, porównaniu nasilenia działania wybranych cytostatyków po zastosowaniu I-CBP112 oraz powszechnie używanych inhibitorów ABC, określeniu stopnia apoptozy oraz obkurczania się sferoidów po inkubacji z I-CBP112 oraz wybranymi cytostatykami, ocena profilu bezpieczeństwa badanego inhibitora względem komórek prawidłowych, jego wpływ na polaryzację makrofagów, a także wykonanie testu *in silico* w celu charakterystyki właściwości ADMET, wykonaniu immunofenotypowania wyizolowanych monocytów oraz limfocytów, analizie statystycznej oraz

interpretacji otrzymanych wyników, przygotowaniu figur, tekstu manuskryptu oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy oceniam na 35%.

3) **Strachowska, M.**; Robaszkiewicz, A. (2024). Characteristics of anticancer activity of CBP/p300 inhibitors - Features of their classes, intracellular targets and future perspectives of their application in cancer treatment. *Pharmacology & therapeutics*, 257, 108636.

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na wykonaniu części analiz *in silico* off-targetów, farmakokinetyki, właściwości ADMET oraz dokowania molekularnego badanych inhibitorów CBP/p300, przygotowaniu pierwotnej oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu, a także współczestniczeniu w odpowiedzi na recenzje. Swój udział procentowy oceniam na 50%.

4) Kołacz, K.; Gronkowska, K.; **Strachowska, M.**; Robaszkiewicz, A. Poliploidia jako rezultat terapii przeciwnowotworowych i przyczyna braku ich skuteczności. *Postępy biochemii*, 325 – 335.

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na przygotowaniu pierwotnej oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu, wykonaniu rycin 2, a także współczestniczeniu w odpowiedzi na recenzje. Swój udział procentowy oceniam na 25%.

Strachowska
Magdalena

Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Ogólnej
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
agnieszka.robaszkiewicz@biol.uni.lodz.pl

Łódź, 10.12.2024r.

Dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz, prof. UŁ

OŚWIADCZENIE

Dotyczy publikacji:

- 1) Strachowska, M.; Gronkowska, K.; Michlewska, S.; **Robaszkiewicz, A.** (2021). CBP/p300 Bromodomain Inhibitor-I-CBP112 Declines Transcription of the Key ABC Transporters and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapy Drugs. *Cancers*, 13(18), 4614.

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na zdefiniowaniu hipotezy badawczej, wykonaniu części eksperymentów dotyczących oceny poziomu białek PCNA, CDK4 i CCNE, oceny eksternalizacji fosfatydylseryny z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej, wykonaniu pomiaru akumulowania leków z wykorzystaniem czynnika fluorescencyjnego w układzie z iABC, analiz statystycznych i interpretacji wyników, opracowaniu układu figur, przygotowaniu i edycji tekstu manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów, zapewnieniu finansowania badań, sprawowaniu nadzoru merytorycznego i naukowego nad prowadzonymi badaniami.

Swój udział procentowy oceniam na 45%.

- 2) Strachowska, M.; Gronkowska, K.; Sobczak, M.; Grodzicka, M.; Michlewska, S.; Kołacz, K.; Sarkar, T.; Korszon, J.; Ionov, M.; **Robaszkiewicz, A.** (2023). I-CBP112 declines overexpression of ATP-binding cassette transporters and sensitized drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines to chemotherapy drugs. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 168, 115798.

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na zdefiniowaniu hipotezy badawczej, interpretacji wyników, opracowaniu układu figur, przygotowaniu i edycji tekstu manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów, zapewnieniu finansowania badań, sprawowaniu nadzoru merytorycznego i naukowego nad prowadzonymi badaniami.

Swój udział procentowy oceniam na 30%.

- 3) Strachowska, M.; **Robaszkiewicz, A.** (2024). Characteristics of anticancer activity of CBP/p300 inhibitors - Features of their classes, intracellular targets and future perspectives of their application in cancer treatment. *Pharmacology & therapeutics*, 257, 108636.

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na przygotowaniu koncepcji pracy, wyborze narzędzi do analizy *in silico*, wykonaniu dokowania molekularnego dla wybranych związków, a także części analiz off-targetów, farmakokinetyki oraz właściwości ADMET badanych inhibitorów CBP/p300, przygotowaniu pierwotnej oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu, a także współuczestniczeniu w odpowiedzi na recenzje.

Swój udział procentowy oceniam na 50%.

4) Kołacz, K.; Gronkowska, K.; Strachowska, M.; **Robaszkiewicz, A.** Poliploidia jako rezultat terapii przeciwnowotworowych i przyczyna braku ich skuteczności. Postępy biochemii, 325 – 335.

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na przygotowaniu koncepcji pracy przeglądowej, określeniu zakresu wymaganych informacji oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu.

Swój udział procentowy oceniam na 10%.

Agnieszka
Robaszkiewicz

Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Ogólnej
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
karolina.gronkowska@edu.uni.lodz.pl

Łódź, 09.12.2024r.

Mgr Karolina Gronkowska

OŚWIADCZENIE

Dotyczy publikacji:

1) Strachowska, M.; **Gronkowska, K.**; Michlewska, S.; Robaszkiewicz, A. (2021). CBP/p300 Bromodomain Inhibitor-I-CBP112 Declines Transcription of the Key ABC Transporters and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapy Drugs. *Cancers*, 13(18), 4614.

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na wykonaniu techniki Real-Time PCR w celu oceny zmian w ekspresji transporterów ABC po zastosowaniu I-CBP112 w linii A549 oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy oceniam na 5%.

2) Strachowska, M.; **Gronkowska, K.**; Sobczak, M.; Grodzicka, M.; Michlewska, S.; Kołacz, K.; Sarkar, T.; Korszun, J.; Ionov, M.; Robaszkiewicz, A. (2023). I-CBP112 declines overexpression of ATP-binding cassette transporters and sensitized drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines to chemotherapy drugs. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 168, 115798.

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na scharakteryzowaniu profilu ekspresji transporterów ABC oraz ocenie wrażliwości na cytostatyki komórek opornych na paklitaksel. Swój udział procentowy oceniam na 17%.

3) Kołacz, K.; **Gronkowska, K.**; Strachowska, M.; Robaszkiewicz, A. Poliploidia jako rezultat terapii przeciwnowotworowych i przyczyna braku ich skuteczności. *Postępy biochemii*, 325 – 335.

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na przygotowaniu pierwotnej oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu, wykonaniu rycin 3, a także współuczestniczeniu w odpowiedzi na recenzje. Swój udział procentowy oceniam na 25%.

Karolina Gronkowska

Łódź, 09.12.2024r.

dr n. biol. Maciej Sobczak
Klinika Chorób Wewnętrznych,
Diabetologii i Farmakologii Klinicznej,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

OŚWIADCZENIE

Dotyczy publikacji:

1) Strachowska M, Gronkowska K, Sobczak M, Grodzicka M, Michlewska S, Kołacz K, Sarkar T, Korszon J, Ionov M, Robaszkiewicz A. I-CBP112 declines overexpression of ATP-binding cassette transporters and sensitized drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines to chemotherapy drugs. Biomed Pharmacother. 2023 Dec;168:115798. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115798. Epub 2023 Oct 31. PMID: 37913733.

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na wyprowadzeniu linii A549 opornej na cisplatynę, wykonaniu techniki ChIP-qPCR obejmującej ocenę wpływu inhibitora CBP/p300 na H3K4me3, a także porównaniu działania I-CBP112 na transkrypcję ABC w kombinacji z inhibitorem LSD1 (SP2509).

Swój udział procentowy oceniam na 5%.

Maciej Sobczak

Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Pracownia Obrazowania Mikroskopowego
i Specjalistycznych Technik Biologicznych
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
sylwia.michlewska@biol.uni.lodz.pl

Łódź, 09.12.2024r.

Dr hab. Sylwia Michlewska

OŚWIADCZENIE

Dotyczy publikacji:

- 1) Strachowska, M.; Gronkowska, K.; **Michlewska, S.**; Robaszkiewicz, A. (2021). CBP/p300 Bromodomain Inhibitor-I-CBP112 Declines Transcription of the Key ABC Transporters and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapy Drugs. *Cancers*, 13(18), 4614.

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na wykonaniu i opracowaniu zdjęć z mikroskopii konfokalnej obejmujących określenie poziomu ekspresji transporterów ABC oraz akumulowaniu leków, a także przygotowaniu części metodycznej dotyczącej mikroskopii oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy oceniam na 5%.

- 2) Strachowska, M.; Gronkowska, K.; Sobczak, M.; Grodzicka, M.; **Michlewska, S.**; Kołacz, K.; Sarkar, T.; Korszun, J.; Ionov, M.; Robaszkiewicz, A. (2023). I-CBP112 declines overexpression of ATP-binding cassette transporters and sensitized drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines to chemotherapy drugs. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 168, 115798.

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na wykonaniu i opracowaniu zdjęć z mikroskopii konfokalnej obejmujących określenie poziomu ekspresji transporterów ABC, akumulowanie leków w kulturach 2D oraz 3D, a także pomiary wielkości sferoidów. Ponadto pomogłam w przygotowaniu części metodycznej dotyczącej mikroskopii oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy oceniam na 5%.



Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Ogólnej
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
marika.grodzicka@biol.uni.lodz.pl

Łódź, 09.12.2024r.

Mgr Marika Grodzicka

OŚWIADCZENIE

Dotyczy publikacji:

Strachowska, M.; Gronkowska, K.; Sobczak, M.; **Grodzicka, M.**; Michlewska, S.; Kołacz, K.; Sarkar, T.; Korszun, J.; Ionov, M.; Robaszkiewicz, A. (2023). I-CBP112 declines overexpression of ATP-binding cassette transporters and sensitized drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines to chemotherapy drugs. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 168, 115798.

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na wyizolowaniu monocytów oraz limfocytów, wykonaniu eksperymentu obejmującego pomiar hemolizy, przygotowaniu części metodycznej manuskryptu obejmującej izolowanie komórek z kożuszka leukocytarnego oraz badaniu poziomu hemolizy po zastosowaniu I-CBP112, a także edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy oceniam na 4%.

Marika Grodzicka

Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Ogólnej
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
kinga.kolacz@edu.uni.lodz.pl

Łódź, 09.12.2024r.

Mgr Kinga Kołacz

OŚWIADCZENIE

Dotyczy publikacji:

1) Strachowska, M.; Gronkowska, K.; Sobczak, M.; Grodzicka, M.; Michlewska, S.; **Kołacz, K.**; Sarkar, T.; Korszun, J.; Ionov, M.; Robaszkiewicz, A. (2023). I-CBP112 declines overexpression of ATP-binding cassette transporters and sensitized drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines to chemotherapy drugs. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 168, 115798.

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na wykonaniu pomiaru akumulowania doksorubicyny po traktowaniu komórek I-CBP112 oraz iABC z wykorzystaniem cytometrii przepływowej oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy oceniam na 1%.

2) Kołacz, K.; Gronkowska, K.; Strachowska, M.; Robaszkiewicz, A. Poliploidia jako rezultat terapii przeciwnowotworowych i przyczyna braku ich skuteczności. *Postępy biochemii*, 325 – 335.

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na przygotowaniu pierwotnej oraz edytowaniu finalnej wersji manuskryptu, wykonaniu rycin 1 oraz streszczenia graficznego, a także przygotowaniu odpowiedzi na recenzje. Swój udział procentowy oceniam na 40%.

Kinga Kołacz - Milewska

University of Kalyani
Department of Microbiology
West Bengal 741245, India
tuhinmbio21@klyuniv.ac.in

3/12/2024, West Bengal

Tuhin Sarkar

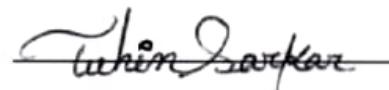
STATEMENT OF CONTRIBUTION

Refers to publication:

Strachowska M, Gronkowska K, Sobczak M, Grodzicka M, Michlewska S, Kołacz K, Sarkar T, Korszun J, Ionov M, Robaszkiewicz A. I-CBP112 declines overexpression of ATP-binding cassette transporters and sensitized drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines to chemotherapy drugs. *Biomed Pharmacother.* 2023 Dec;168:115798. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115798. Epub 2023 Oct 31. PMID: 37913733.

I hereby declare that my contribution to the above work consisted of the BOILED-Egg (Brain or Intestinal Estimated permeation method) model and bioavailability radar for the investigational inhibitor I-CBP112.

My percentage contribution is estimated as 1%.



...

Łódź, 10.12.2024r.

Mgr Joanna Korszun-Karbowniczak

OŚWIADCZENIE

Dotyczy publikacji:

Strachowska, M.; Gronkowska, K.; Sobczak, M.; Grodzicka, M.; Michlewska, S.; Kołacz, K.; Sarkar, T.; **Korszun, J.**; Ionov, M.; Robaszkiewicz, A. (2023). I-CBP112 declines overexpression of ATP-binding cassette transporters and sensitized drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines to chemotherapy drugs. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 168, 115798.

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na wykonaniu części powtórzeń dotyczących określenia ekspresji transporterów ABC pomiędzy linią bazową a oporną na dokosorubicynę MDA-MB-231, a także edytowaniu finalnej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy oceniam na 1%.

Joanna Korszun - Karbowniczak



Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Ogólnej
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
maksim.ionov@biol.uni.lodz.pl

Łódź, 09.12.2024r.

Prof. dr hab. Maksim Ionov

OŚWIADCZENIE

Dotyczy publikacji:

Strachowska, M.; Gronkowska, K.; Sobczak, M.; Grodzicka, M.; Michlewska, S.; Kołacz, K.; Sarkar, T.; Korszon, J.; **Ionov, M.**; Robaszkiewicz, A. (2023). I-CBP112 declines overexpression of ATP-binding cassette transporters and sensitized drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines to chemotherapy drugs. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 168, 115798.

Mój wkład w niniejszą pracę polegał na redagowaniu finalnej wersji manuskryptu. Swój udział procentowy oceniam na 1%.

