

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Wprowadzenie

Na Rozprawę Doktorską składa się cykl 5 artykułów opublikowanych w międzynarodowych czasopismach naukowych indeksowanych w bazie MEDLINE, uwzględnionych na liście Journal Citation Reports (JCR) oraz znajdujących się w wykazie czasopism naukowych Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN). Łączny współczynnik wpływu (*impact factor* – IF) artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi 12,952 a punktacja MEiN wynosi 480 punktów.

Rak pęcherza moczowego (*bladder cancer* – BC) jest drugim co do częstości występowania nowotworem wywodzącym się z układu moczowego. W momencie postawienia diagnozy 75% przypadków BC stanowią raki nienaciekające mięśniówki (*non-muscle-invasive bladder cancer* – NMIBC), natomiast pozostałe 25% stanowią raki naciekające mięśniówkę (*muscle-invasive bladder cancer* – MIBC). Niedoskonałość aktualnych modeli prognostycznych, opartych wyłącznie na parametrach kliniczno-patologicznych, warunkuje konieczność prowadzenia dodatkowych badań nad predyktorami wznowy oraz progresji pacjentów z NMIBC wysokiego ryzyka otrzymujących wlewki dopęcherzowe Bacillus Calmette-Guerin (BCG). Mimo pojawienia się w ostatnich kilkunastu latach nowych form leczenia MIBC w stadium zaawansowanym lub przerzutowym, pięcioletnie przeżycia chorych nie przekraczają 15 - 20%. Dlatego prowadzone obecnie badania skupiają się na poszukiwaniu nowych markerów molekularnych, mogących stanowić potencjalny cel terapeutyczny w MIBC. Jednym z obiecujących kierunków badań jest ocena wpływu zaburzeń ekspresji białek związanych z procesem deubikwitynylacji, proteaz specyficznych dla ubikwityny (*ubiquitin-specific proteases* – USP) na proces karcynogenezy oraz tworzenia przerzutów w różnych typach nowotworów. Procesy kontrolowane przez białka z rodziny USP mają kluczowe znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania szlaków komórkowych, takich jak naprawa DNA czy apoptoza komórki. Z tego względu USP mogą stanowić potencjalne cele molekularne w terapii przeciwnowotworowej.

Onkologia porównawcza jest aktualnie szybko rozwijającą się dziedziną, mającą na celu integrację badań dotyczących naturalnie występujących nowotworów u zwierząt i ludzi. Spośród różnych gatunków zwierząt za najodpowiedniejszy model BC uważany jest pies, co wynika z podobieństw anatomicznych i fizjologicznych do BC człowieka. Bardzo złe rokowanie w kontekście przeżycia u psów z BC oraz możliwość wykorzystania modelu psiego w onkologii porównawczej pozwalają na prowadzenie symultanicznych badań nad rozwojem nowych związków terapeutycznych mających potencjalne zastosowanie zarówno w medycynie człowieka, jak i medycynie weterynaryjnej. Ze względu na częste problemy natury etycznej dotyczące badań na modelach zwierzęcych *in vivo*, psie modele *in vitro* mogą stanowić cenne narzędzie badawcze, pozwalające na analizę nowych biomarkerów i środków terapeutycznych.

Cel badań

Celem badań wchodzących w skład Rozprawy Doktorskiej była analiza wybranych markerów molekularnych mających potencjalne znaczenie prognostyczne, jak i stanowiących potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu BC oraz analiza wpływu wybranych form terapeutycznych na wyniki leczenia pacjentów z BC. Celem realizacji założeń Programu „ProHum – Interdyscyplinarna Szkoła Doktorska – planowanie badań eksperymentalnych, tworzenie i

optymalizacja zwierzęcych modeli doświadczalnych z umiejętnościami transferowania ich do badań klinicznych w medycynie człowieka” w wybranych badaniach wykorzystywano zarówno modele ludzkie, jak i zwierzęce

Materiały i metody

W części teoretycznej Rozprawy Doktorskiej dokonano:

- (P1) Przeglądu systematycznego dostępnych danych literaturowych na temat psich modeli *in vitro* BC oraz ich potencjalnego zastosowania w kontekście badań nad nowymi biomarkerami oraz środkami terapeutycznymi.
- (P2) Przeglądu systematycznego dostępnych danych literaturowych na temat związku ekspresji ligandu receptora programowanej śmierci 1 (*programmed death ligand 1* – PD-L1) z parametrami onkologicznymi i odpowiedzią kliniczną na immunoterapię BCG u pacjentów z NMIBC wysokiego ryzyka.
- (P3) Przeglądu systematycznego i metaanalizy dostępnych danych literaturowych na temat wpływu chemioterapii adjuwantowej (*adjuvant chemotherapy* – AC) po cystektomii radykalnej (*radical cystectomy* – RC) poprzedzonej chemioterapią neoadjuwantową (*neoadjuvant chemotherapy* – NAC) na wyniki onkologiczne pacjentów z zaawansowaną chorobą rezydualną (obecność guza w stopniu zaawansowania T3-T4 i/lub potwierdzone histopatologicznie przerzuty do węzłów chłonnych).

W części badawczej Rozprawy Doktorskiej:

- (P4) Przeanalizowano retrospektywnie dane 590 pacjentów z potwierdzonym histopatologicznie pierwotnym NMIBC w stopniu zaawansowania T1 i wysokim stopniu złośliwości histopatologicznej. Oceniono wyniki onkologiczne w 3 podgrupach chorych otrzymujących różne szczepy BCG: Moreau, TICE oraz RIVM. Pierwszorzędowe punkty końcowe analizy stanowiły: przeżycie wolne od nawrotu (*recurrence-free survival* – RFS) oraz przeżycie wolne od progresji (*progression-free survival* – PFS).
- (P5) Oceniono ekspresję wybranych białek USP (USP5, USP9X, USP14) w modelowych liniach prawidłowego nabłonka urotelialnego człowieka (SV-HUC-1) oraz modelowych liniach BC człowieka (T24) i psa (K9TCC-PU-NK, RDSVS-TCC1). Określono potencjał działania przeciwnowotworowego selektywnego (degrasyn) oraz nieselektywnego (PR-619) inhibitora białek USP na komórki BC. Wpływ inhibitorów USP na proliferację komórek określony został za pomocą testu MTT. Nasilenie apoptozy po zastosowaniu inhibitorów USP oceniano przy użyciu testu z zastosowaniem Aneksyny V i jodku propidyny oraz poprzez analizę aktywacji kaspazy 3/7 za pomocą cytometrii przepływowej. Do oceny ekspresji wybranych białek z rodziny USP, białek związanych z uszkodzeniem DNA oraz kluczowych białek zaangażowanych w proces apoptozy wykorzystano metodę Western Blot.

Wyniki

Na podstawie danych pochodzących z 33 prac dokonano usystematyzowania dostępnej wiedzy na temat psich modeli *in vitro* BC. Ustalone linie komórkowe (hodowle dwuwymiarowe) są najczęściej wykorzystywanym materiałem do badań naukowych nad nowymi biomarkerami i lekami, jednak badania z użyciem ustalonych linii komórkowych nie odzwierciedlają w pełni warunków panujących *in vivo*, głównie z powodu braku interakcji komórek nowotworu z mikrośrodowiskiem guza. Wykorzystanie hodowli trójwymiarowych, charakteryzujących się

budową sferoidalną imitującą warunki panujące *in vivo*, zwiększa translacyjność wyników prowadzonych badań (P1).

Na podstawie danych pochodzących z 5 badań dokonano usystematyzowania dostępnej wiedzy na temat związku ekspresji PD-L1 z parametrami onkologicznymi i odpowiedzią kliniczną na immunoterapię BCG u pacjentów z NMIBC wysokiego ryzyka. Związek pozytywnej ekspresji PD-L1 z opornością na leczenie BCG u pacjentów z NMIBC wysokiego ryzyka jest niejednoznaczny. W żadnej z dostępnych prac nie wykazano prognostycznego znaczenia pozytywnej ekspresji PD-L1 w kontekście parametrów RFS i PFS (P2).

Zidentyfikowano 6 badań, które analizowały wpływ AC po RC poprzedzonej NAC na wyniki onkologiczne pacjentów z zaawansowaną chorobą rezydualną. W porównaniu do grupy kontrolnej (pacjenci poddani obserwacji), chorzy otrzymujący AC mieli istotnie wyższy wskaźnik OS. Stosowanie AC nie wpływało istotnie na OS w podgrupie pacjentów z potwierdzonymi histopatologicznie przerzutami do węzłów chłonnych (P3).

Wykazano, że stosowanie szczepu RIVM wiązało się z istotnie wyższym prawdopodobieństwem nawrotu BC w porównaniu do szczepów Moreau i TICE. Analizowane szczepy nie różniły się istotnie w kontekście wskaźnika PFS. Analiza regresji proporcjonalnego hazardu Coxa z wykorzystaniem metody ważenia odwrotnego prawdopodobieństwa (*inverse probability weighting* – IPW) nie wykazała istotnie statystycznej różnicy w odniesieniu do RFS dla szczepów Moreau i TICE, podczas gdy stosowanie szczepu RIVM było związane z istotnie niższym RFS w porównaniu do szczepu Moreau oraz szczepu TICE. Nie stwierdzono istotnych różnic w PFS pomiędzy poszczególnymi szczepami (P4).

Wykazano, że komórki modelowej linii BC człowieka (T24) charakteryzowały się wyższą ekspresją białka USP5 w porównaniu z nienowotworowymi komórkami urotelialnymi (SV-HUC-1). W teście MTT wykazano, że degrasyn hamował proliferację wszystkich badanych linii komórkowych w sposób zależny od stężenia i czasu. Analiza 24-godzinnej inkubacji wykazała istotnie mniejszą aktywność antyproliferacyjną degrasynu wobec kontrolnej ludzkiej linii komórkowej SV-HUC-1 niż wobec modelowej, nowotworowej linii komórkowej T24. Przy ocenie wszystkich czasów inkubacji (24, 48 oraz 72 godziny) komórki BC człowieka były bardziej wrażliwe na antyproliferacyjne działanie degrasynu w porównaniu do psich linii komórkowych BC (K9TCC-PU-NK i RDSVS-TCC1). Stwierdzona aktywność antyproliferacyjna degrasynu była istotnie wyższa niż drugiego zastosowanego inhibitora, PR-619. Po 24 godzinach inkubacji komórek z degrasynem w rosnących stężeniach stwierdzono znaczny wzrost odsetka komórek wczesno- i późnoapoptotycznych w liniach T24 oraz RDSVS-TCC1. W przeciwieństwie do degrasynu, PR-619 nie wykazywał istotnego działania proapoptotycznego. Wyniki analizy mechanizmu proapoptotycznego działania degrasynu wykazały, że po 24-godzinnej inkubacji pod jego wpływem w komórkach BC człowieka i psa dochodzi do zmniejszenia poziomu ekspresji białek antyapoptotycznych Bcl-xl oraz Bcl-2. Nie zaobserwowano zmian w poziomie ekspresji Bcl-xl oraz Bcl-2 po inkubacji komórek BC ze wzrastającymi stężeniami PR-619. Po 24-godzinnej inkubacji z degrasynem we wszystkich użytych liniach komórkowych zaobserwowano zwiększenie ekspresji fosforylowanej formy białka H2AX (γ H2AX) będącego markerem uszkodzenia DNA. 24-godzinna inkubacja z PR-619 nie wywoływała wyraźnego wzrostu ekspresji γ H2AX (P5).

Wnioski

1. Ustalone linie komórkowe psiego BC są wartościowym materiałem do badań naukowych nad nowymi biomarkerami i lekami, jednak nie odzwierciedlają one dokładnie warunków panujących *in vivo*. Tworzenie hodowli trójwymiarowych imitujących warunki *in vivo* jest niezwykle istotnym kierunkiem badań nad nowymi modelami BC, służącymi do badań eksperymentalnych.
2. Wartość pozytywnej ekspresji PD-L1 w przewidywaniu odpowiedzi na immunoterapię BCG oraz ryzyko nawrotu i progresji NMIBC wysokiego ryzyka jest wątpliwa. Aktualne dowody, oparte tylko na danych retrospektywnych, są wysoce heterogenne.
3. Podawanie AC pacjentom z zaawansowaną chorobą rezydualną chorobą po RC poprzedzonej NAC może mieć pozytywny wpływ na OS i DSS. Nie dotyczy to pacjentów ze stwierdzonymi przerzutami w węzłach chłonnych.
4. Stosowanie szczepu RIVM u pacjentów z NMIBC wysokiego ryzyka progresji wiąże się z istotnie niższym RFS w porównaniu do szczepów Moreau oraz TICE, co warunkuje ich preferencyjne stosowanie.
5. W komórkach BC człowieka białko USP5 jest nadekspresjonowane w porównaniu do komórek prawidłowych, co sugeruje możliwość wykorzystania selektywnych inhibitorów białka USP5 jako potencjalnych form terapii przeciwnowotworowej.
6. Degrasyn, selektywny inhibitor białek USP5, USP9X oraz USP14, wykazuje aktywność przeciwnowotworową w stosunku do komórek BC człowieka i psa. Działanie przeciwnowotworowe wywierane jest poprzez zahamowanie proliferacji komórkowej, indukcję apoptozy oraz indukcję uszkodzenia DNA.
7. Aktywność przeciwnowotworowa selektywnego inhibitora białek USP (degrasynu) jest wyższa w porównaniu do nieselektywnego inhibitora białek USP (PR-619).

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Introduction

The Doctoral Dissertation consists of a series of 5 articles published in international scientific journals indexed in the MEDLINE database and included in the Journal Citation Reports by Web of Science list, as well as in the list of scientific journals of the Ministry of Education and Science (MEiN). The total impact factor (IF) of the articles included in the doctoral dissertation is 12,952, and the MEiN score is 480 points.

Bladder cancer (BC) is the second most common malignancy of the urinary tract. At the time of diagnosis, 75% of BC cases are non-muscle-invasive bladder cancers (NMIBC), while the remaining 25% are muscle-invasive bladder cancers (MIBC). The current NMIBC prognostic models, based mainly on clinicopathological parameters, have some important limitations. Therefore, research on novel predictors of recurrence and progression in patients with high-risk NMIBC treated with Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy is highly needed. Despite the introduction of novel forms of advanced/metastatic MIBC treatment in recent years, the 5-year survival rate of patients does not exceed 15-20%. Therefore, current research is focused on new molecular markers that could be potential therapeutic targets in MIBC. One of the promising directions of research is the assessment of ubiquitin-specific proteases (USP) and

the association of their expression with carcinogenesis and the formation of metastases in various types of cancer. Processes controlled by USP are crucial for various cellular pathways, such as DNA repair or cell apoptosis. For this reason, USP could potentially be molecular targets for cancer therapy.

Comparative oncology is currently a fast-growing research field that aims to integrate data from naturally occurring cancers in animals and humans. Among the various animal species, the dog is considered the most appropriate BC model due to its anatomical and physiological similarities to the human BC. Poor survival outcomes in dogs with BC implicate an urgent need for the development of novel treatment compounds, simultaneously with human medicine. Due to the frequent ethical problems associated with *in vivo* animal research, *in vitro* canine models can be a valuable research tool for the analysis of new biomarkers and therapeutic targets.

Aim

The aim of the study was to analyze selected molecular markers with potential prognostic and therapeutic significance in BC, as well as the impact of selected therapeutic forms on the survival of patients with BC. In order to implement the assumptions of the project "ProHum - Interdisciplinary Doctoral School - planning experimental research, creating and optimizing animal experimental models with the ability to transfer them to clinical trials in human medicine", both human and animal models were used in particular studies.

Materials and methods

The theoretical part of the Doctoral Dissertation included:

- (P1) Systematic review of available literature data on *in vitro* models of canine BC and their potential applications in research on new biomarkers and therapeutic agents.
- (P2) Systematic review of available literature data on the association between the expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) and oncological parameters and BCG-response in patients with high-risk NMIBC.
- (P3) Systematic review and meta-analysis of available literature data on the impact of adjuvant chemotherapy (AC) after radical cystectomy (RC) preceded by NAC on oncological outcomes in patients with advanced residual disease (presence of tumor at T3-T4 stage and/or histopathologically confirmed metastases to lymph nodes). In the research part of the Doctoral Dissertation:
 - (P4) Data from 590 patients with histopathologically confirmed primary T1 high-grade NMIBC were retrospectively analyzed. Oncological outcomes were assessed in 3 subgroups of patients receiving different BCG strains: Moreau, TICE and RIVM. The primary endpoints of the analysis were recurrence-free survival (RFS) and progression-free survival (PFS).
 - (P5) Expression of selected USP proteins (USP5, USP9X, USP14) was assessed in human normal urothelium (SV-HUC-1) and cell lines of human (T24) and canine BC (K9TCC-PU-NK, RDSVS-TCC1). The anticancer activity of a selective (degrasyn) and a non-selective (PR-619) inhibitor of USP proteins against BC cells was determined. The effect of USP inhibitors on cell proliferation was determined using the MTT assay. The level of apoptosis after inhibition with USP inhibitors was assessed using the Annexin V and propidium iodide assay and analysis of the activation of caspase 3/7 by flow cytometry. The Western Blot method was used to assess

the expression of selected proteins from the USP family, proteins associated with DNA damage, and key proteins involved in the process of apoptosis.

Results

Based on data from 33 articles, the available evidence regarding canine *in vitro* models of BC has been summarized. Established cell lines (two-dimensional cultures) are the most commonly used *in vitro* models of BC for research on new biomarkers and therapeutic agents. However, studies using established cell lines do not faithfully reflect conditions prevailing *in vivo*, mainly due to the lack of available interactions between tumor cells and tumor microenvironment. Use of three-dimensional cultures, with a spheroidal structure imitating the conditions prevailing *in vivo*, increases the translational value of the experiments (P1).

Based on data from 5 studies, the available evidence regarding the association between PD-L1 expression and oncological outcomes and clinical response to BCG immunotherapy in patients with high-risk NMIBC was summarized. The association between positive PD-L1 expression and resistance to BCG treatment in patients with high-risk NMIBC is ambiguous. None of the available studies demonstrated the prognostic significance of positive PD-L1 expression in terms of RFS and PFS (P2).

Six studies examined the effect of AC on oncological outcomes in patients with advanced residual disease after NAC followed by RC. Compared to the control group (observation), patients receiving AC had a significantly higher OS. The use of AC did not significantly affect OS in the subgroup of patients with histopathologically confirmed lymph node metastases (P3).

It was demonstrated that the use of the RIVM strain could be associated with a significantly higher probability of BC recurrence compared to the Moreau and TICE strains. The analyzed strains did not differ significantly in terms of PFS. Cox proportional hazard regression analysis using the inverse probability weighting (IPW) method showed no statistically significant difference in RFS for the Moreau and TICE strains, while the use of the RIVM strain was associated with significantly lower RFS. There were no significant differences in PFS between analyzed strains (P4).

Compared to control non-tumorigenic urothelial cells (SV-HUC-1), higher expression of USP5 protein was observed in human BC cell line (T24). MTT assay demonstrated that degrasyn inhibited the proliferation of all cell lines used in the present study in a concentration- and time-dependent manner. Relative to 24-hours incubation time, significantly less cytotoxicity of degrasyn on the human control SV-HUC-1 cell line compared to the T24 cell line was observed. Relative to all incubation times (24, 48 and 72 hours), human BC cells were more sensitive to the antiproliferative effect of degrasyn compared to canine BC cell lines (K9TCC-PU-NK and RDSVS-TCC1). The antiproliferative activity of degrasyn was significantly higher than that of the second inhibitor used, PR-619. After 24-hours incubation with degrasyn at increasing concentrations, a significant increase in the number of early and late apoptotic cells was detected in the T24 and RDSVS-TCC1 cell lines. In contrast to degrasyn, PR-619 did not show a significant pro-apoptotic effect. After 24-hours incubation, the expression level of anti-apoptotic proteins Bcl-x1 and Bcl-2 was reduced in human and canine BC cells. No changes in Bcl-x1 and Bcl-2 expression levels were observed after incubation with increasing concentrations of PR-619. After 24-hour incubation with degrasyn, an increase in the expression of the phosphorylated form of the H2AX protein (γ H2AX), which is a marker of

DNA damage, was observed in all BC cell lines. 24-hour incubation with PR-619 did not induce a marked increase in γ H2AX expression (P5).

Conclusions

1. Established canine BC cell lines are valuable tools for *in vitro* research on new biomarkers and therapeutic agents, but they do not accurately reflect the conditions prevailing *in vivo*. Creating three-dimensional cultures that mimic *in vivo* conditions is an extremely important direction of research on new models for *in vitro* experiments.
2. The value of positive PD-L1 expression in predicting the response to BCG immunotherapy and the risk of NMIBC recurrence and progression is questionable. The current evidence, based only on retrospective data, is highly heterogeneous.
3. OS and DSS may benefit from the administration of AC to patients with advanced residual disease following RC preceded by NAC. This does not apply to patients with lymph node metastases.
4. The use of the RIVM strain in patients with high-risk NMIBC is associated with a significantly lower RFS compared to the Moreau and TICE strains, which determines their preferential use.
5. USP5 protein is overexpressed in human BC cells compared to normal urothelial cells, suggesting the possibility of using selective USP5 protein inhibitors as potential forms of anticancer therapy.
6. Degrasyn, a selective inhibitor of USP5, USP9X, and USP14, shows anticancer activity against human and canine BC cells. The anticancer effect is exerted by inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis, and induction of DNA damage.
7. The anticancer activity of selective USP inhibitor (degrasyn) is higher compared to the non-selective USP inhibitor (PR-619).