



WROCLAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE SCIENCES

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY

Beatriz Hernández Suárez MSc

The role of tumor associated proteins in DNA damage and Unfolded Protein Responses and their use as target for the development of novel canine cancer therapy

Supervisor

Aleksandra Pawlak DVM PhD, associate professor

Second supervisor

David A. Gillespie PhD, FRSE

Wroclaw 2023

Abstract

Cancer is a genetic disease that affects both humans and dogs. To minimize the risk of cancer almost all body cells have different mechanisms and pathways to protect themselves from neoplastic transformation. Two particularly important mechanisms are referred to as the DNA damage response (DDR) and Unfolded Protein Response (UPR) pathways respectively. Unfortunately, little is known about those two pathways in dogs, despite their potential importance and expected similarity to humans. Therefore, the aim of the research presented in this thesis was to determine methods and validate reagents that can be used to study the DDR and UPR pathways in canine cells. To achieve this goal, RNA sequencing analysis was performed in CLBL-1 and GL-1 cell lines to prove the presence of transcripts for major players in both pathways in canine cells. Further, a panel of lymphoma and leukemia cell lines (CLBL-1, CLB70, CNK-89, and GL-1) was analyzed by western blotting using a selection of antibodies to study protein expression levels and qPCR to study the mRNA level of ATR and Claspin proteins. To determine replication dynamics DNA combing assay was used, and finally, flow cytometry analysis was performed to study apoptosis.

So far, in studies using canine cells, only proteins such as BRCA1, BRCA2, p53, TopBP1, or Rad51 from the DNA damage response pathway have been investigated, while there is no information on the ATR-Chk1 pathway in dogs. In our research on the DDR pathway, we found a high degree of homology in key DDR components between dogs and humans. The expression levels of the DDR proteins varied between the cancer cell lines we studied, being generally higher in CLBL-1 and CLB70 than in GL-1. After activation of the DDR pathway through the use of a DNA-damaging drug – etoposide - increased activatory phosphorylation of Chk1 was observed in the tested cancer cell lines together with a marked accumulation of Rad51 protein. A high increase of Rad51 was observed after only 2 hours of treatment with etoposide, it was the reason to analyze replication dynamics in the canine cancer cell lines by pulse-labelling with thymidine analogues followed by a DNA combing assay. The results of this analysis showed that DNA replication forks synthesize DNA more rapidly in GL-1 cells than CLBL-1, but that both cell lines have a tendency to asymmetric fork progression.

Similar to the DDR pathway, we found a high degree of homology between key UPR components in humans and dogs. The expression of UPR markers p-eIF2 α and CHOP increased after treating the canine cancer cells with the endoplasmic reticulum stress inducers thapsigargin and MG132. Because UPR activation can lead to cell apoptosis, the level of apoptosis in thapsigargin and MG132-treated canine cancer cell cultures was examined using flow cytometry. Despite a clear induction of endoplasmic reticulum stress evidenced by an increase in the level of CHOP expression, no significant increase in the low basal rate of spontaneous apoptosis was found under the conditions tested.

The presented results for the first time initially characterize the DDR and UPR pathways in canine cells as well as provide information about the tools and techniques that can be used to study these pathways in dogs. We observed that the regulation of these pathways in dogs is similar to that which has been described in humans and other species. This, together with our validation in dogs of reagents originally designed for use in human or mouse cells, will facilitate research on the role of DNA damage and endoplasmic reticulum stress in carcinogenesis in dogs. The availability of appropriately verified research tools will also enable the development of new targeted therapies in veterinary oncology.

Streszczenie

Nowotwór jest chorobą genetyczną, która dotyka zarówno ludzi, jak i psy. Aby zminimalizować ryzyko rozwinięcia się nowotworu, prawie wszystkie komórki organizmu wyposażone są w wyspecjalizowane mechanizmy molekularne mające zapewnić ochronę przed rozwojem nowotworu. Jednymi z takich mechanizmów są szlak reakcji w odpowiedzi na uszkodzenia DNA (ang. *DNA damage response, DDR*) i szlak odpowiedzi na niesfałdowane białka (ang. *Unfolded protein response, UPR*). Niestety, niewiele wiadomo o tych dwóch szlakach u psów, poza ich potencjalną rolę i oczekiwanym podobieństwem do mechanizmów obserwowanych u ludzi. Dlatego, celem prezentowanej pracy było opracowanie metod badawczych i walidacja odczynników, które można zastosować w badaniach szlaków DDR i UPR w komórkach psa. Aby osiągnąć ten cel, najpierw wykonano sekwencjonowanie RNA z użyciem psich linii komórkowych CLBL-1 i GL-1, aby udowodnić obecność transkryptów dla głównych białek biorących udział w obu badanych szlakach sygnałowych. Następnie, panel linii komórkowych chłoniaika i białaczki psa (CLBL-1, CLB70, CNK-89 i GL-1) analizowano metodą Western blotting przy użyciu wybranych przeciwciał w celu zbadania poziomów ekspresji białek zaangażowanych w badane szlaki oraz zastosowano technikę qPCR w celu określenia poziomu mRNA dla białek ATR i klaspiny. Do oceny dynamiki replikacji wykorzystano test DNA combing assay, a na koniec przeprowadzono analizę metodą cytometrii przepływowej w celu zbadania poziomu apoptozy.

Do tej pory w badaniach z wykorzystaniem psich komórek, ze szlaku odpowiedzi na uszkodzenie DNA, badano jedynie takie białka jak: BRCA1, BRCA2, p53, TopBP1 czy Rad51, podczas gdy brak jest danych literaturowych na temat szlaku ATR-Chk1 u psów. W prezentowanych badaniach w odniesieniu do szlaku DDR stwierdzono wysoki odsetek homologii pomiędzy poszczególnymi elementami tego szlaku u człowieka i psa. Poziomy ekspresji białek szlaku DDR różniły się między badanymi liniami komórkowymi i były wyższe w liniach komórkowych CLBL-1 i CLB70 niż w linii GL-1. Po aktywacji szlaku DDR poprzez zastosowanie leku uszkadzającego DNA – etopozydu przez 2 godziny, w testowanych psich liniach komórkowych zaobserwowano wzrost poziomu fosforylacji kinazy Chk1 i ekspresji białka Rad51. Tak duży wzrost w tak krótkim czasie był powodem do podjęcia analizy dynamiki replikacji metodą DNA combing assay. Badanie wykazało, że linia GL-1 replikuje szybciej niż CLBL-1, ale obie linie komórkowe mają tendencje do asymetrii.

Podobnie jak w przypadku szlaku DDR, stwierdzono wysoki procent homologii pomiędzy komponentami szlaku UPR między ludźmi i psami. Poziom ekspresji jednych z ważniejszych białek szlaku UPR: p-eIF2 α i CHOP wzrósł zgodnie z oczekiwaniami po potraktowaniu komórek induktorami stresu retikulum endoplazmatycznego - tapsygarginą i MG132. Ponieważ aktywacja UPR może prowadzić do apoptozy, poziom apoptozy komórek traktowanych tapsygarginą i MG132 zbadano za pomocą cytometrii przepływowej. Pomimo wyraźnej indukcji stresu retikulum endoplazmatycznego obserwowanego jako wzrost poziomu ekspresji białka CHOP w badanych komórkach, w badaniu nie stwierdzono istotnego stopnia indukcji procesu apoptozy.

Przedstawione wyniki po raz pierwszy wstępnie charakteryzują szlaki DDR i UPR w komórkach psów oraz dostarczają informacji o narzędziach, które można wykorzystać w badaniu tych szlaków u psów. Podobieństwo opisanych szlaków u psów i ludzi oraz możliwość zastosowania odczynników dedykowanych do pracy z komórkami ludzkimi rzuca nowe światło na możliwość wykorzystania psa jako modelu do badań mechanizmów związanych z uszkodzeniem DNA i stresem retikulum endoplazmatycznego. Dostępność odpowiednio zweryfikowanych narzędzi badawczych umożliwi w przyszłości opracowanie nowych terapii celowanych w onkologii weterynaryjnej.