

## ABSTRACT

Leukemia is a group of blood cancer deriving from bone marrow, in which hematopoietic stem/progenitor cells are malignantly transformed into leukemia stem/progenitor cells by activation of oncogenes or inactivation of tumor suppressor genes. Typically, activation of oncogenic tyrosine kinase (TK) receptor FLT3(ITD) occupies approximately 23% cases of acute myeloid leukemia (AML) and oncogenic tyrosine kinase BCR-ABL1 in Philadelphia fusion chromosome is observed in around 95% of chronic myeloid leukemia (CML). Treatment of these leukemias by TK inhibitor (TKi) individually or in combination with standard chemotherapies has obtained initial remission. However the disease relapse has been acquired rapidly after delaying this strategic therapy, leading to urgent requirement for more efficient therapeutic approach.

Poly ADP-ribose polymerase inhibitor (PARPi)-induced synthetic lethality is one of the current promising anticancer strategies, which has been successfully used in *BRCA1/2*-mutated breast/ovarian cancer cells. This also resulted in a promising effects in leukemia despite of lacking *BRCA1/2* mutations in the hematopoietic malignancy, which has been shown by different groups including ours. We found that several oncogene-positive leukemias (eg. AML1-ETO, BCR-ABL1, IDH1/2) led to deficiencies in *BRCA1/2*, resulting in sensitivity to PARPi. Moreover, specific tyrosine kinase inhibitor such as FLT3(ITD) inhibitor (AC220) induced "BRCAness" phenotype, enhancing efficacy of PARPi against FLT3(ITD)-positive AML both *in vitro* and *in vivo*. However, in spite of effective potency of PARPi in *BRCA1/2*-deficient cancers, resistance to PARPi-mediated synthetic lethality has been reported in both preclinical research and clinical trials.

In this study, we discovered a novel mechanism of resistance against PARPi in *BRCA*-deficient leukemias mediated by the stromal cells-dependent bone marrow microenvironment (BMM), mediated by the transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) – TGF $\beta$  receptor (TGF $\beta$ R) signaling pathway. Genetic/pharmacological targeting of TGF- $\beta$  signaling pathway restored sensitivity of leukemia cells to PARPi in BMM *in vitro*. Remarkably, TGF $\beta$ R serine/threonine kinase inhibitor (SB435142) enhanced anti-leukemia effect of [PARPi + TKi] in the leukemia-engrafted mice *in vivo*, therefore, prolonging the survival of leukemia-bearing mice. In conclusion, as the strategic therapy did not caused cytotoxic effect on the bone marrow healthy cells, we propose that the FDA-approved TGF $\beta$ R kinase inhibitors are good candidates for clinical trials and treatment of leukemia patients currently receiving [PARPi +/- TKi] to enhance drug response as well as improve therapeutic efficiency.

## STRESZCZENIE

Białaczki to nowotwory krwi wywodzące się ze szpiku kostnego, w których dochodzi do przekształcenia hematopoetycznej komórki macierzystej / progenitorowej w białaczkowe komórki macierzyste / progenitorowe, poprzez aktywację onkogenów lub inaktywację genów supresorowych nowotworu. Przykładowo, aktywacja onkogenego receptora kinazy tyrozynowej (TK) FLT3 (ITD) występuje w około 23% przypadków ostrej białaczki szpikowej (AML), a onkogennej kinazy tyrozynowej BCR-ABL1 na skutek powstania fuzyjnego chromosomu Philadelphia występuje w około 95% przypadków przewlekłej białaczki szpikowej (CML). Leczenie tych białaczek inhibitorami kinaz tyrozynowych (TKi), zarówno w terapii pojedynczej jak i skojarzonej, w połączeniu ze standardowymi chemioterapiami daje korzystne efekty terapeutyczne i prowadzi do początkowej remisji. Jednak nawroty choroby i pojawienie się oporności jest częste, co prowadzi do konieczności poszukiwania nowych strategii leczenia i pilnego zapotrzebowania na bardziej skuteczne podejście terapeutyczne.

Syntetyczna letalność indukowana przez inhibitory polimerazy ADP-rybozy (PARPi) jest jedną z obiecujących i aktualnie intensywnie badanych nowych strategii przeciwnowotworowych. Dotychczas stosowano ją z powodzeniem w komórkach raka piersi/jajnika, niosących mutacje genów BRCA1/2. Nasze wcześniejsze badania oraz badania innych grup wykazały, że zastosowanie inhibitorów PARP wykazuje również obiecujący wpływ terapeutyczny w przypadku białaczek, mimo iż nie należą one do nowotworów związanych z mutacjami BRCA1/2. Stwierdziliśmy, że ekspresja białaczkowych onkogenów (np. AML1-ETO, BCR-ABL1, IDH1/2) prowadziła do niedoborów BRCA1/2, co skutkowało wrażliwością na inhibitory PARP. Ponadto, specyficzny inhibitor kinazy tyrozynowej - FLT3(ITD) indukował fenotyp "BRCAness", zwiększając skuteczność inhibitorów PARPi w komórkach białaczki, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Jednak pomimo skutecznego zastosowania PARPi w nowotworach z niedoborem BRCA1/2, zarówno w badaniach przedklinicznych, jak i klinicznych zaobserwowano pojawiającą się oporność. W naszych badaniach odkryliśmy nowy mechanizm oporności na PARPi w białaczkach z niedoborem BRCA1/2, związany z mikrośrodowiskiem szpiku kostnego (BMM) oraz regulowany przez szlak sygnałowy: transformujący czynnik wzrostu beta 1 (TGF- $\beta$ 1) - receptor TGF $\beta$  (TGF $\beta$ R). Genetyczne/farmakologiczne zahamowanie tego szlaku sygnałowego przywracało wrażliwość komórek na PARPi w mikrośrodowisku szpiku *in vitro*. Co ważne, w badaniach *in vivo* wykazaliśmy, że inhibitor receptora TGF $\beta$ R (SB435142) nasilał działanie przeciwbiałaczkowe [PARPi + TKi] i przedłużał przeżycie myszy z białaczką. Ponieważ badana przez nas strategia terapeutyczna nie powodowała działania cytotoksycznego na zdrowe komórki szpiku kostnego, proponujemy, że inhibitory kinazy receptora TGF $\beta$ R, zatwierdzone przez FDA, mogą być kandydatami do badań klinicznych nad łączoną terapią pacjentów z białaczką, obecnie otrzymujących [PARPi +/- TKi], w celu zahamowanie oporności i poprawy odpowiedzi na lek, a także poprawy skuteczności terapii.