

STRESZCZENIE

Chłoniaki nieziarnicze (ang. *non-Hodgkin lymphoma*; NHL) to wysoce heterogenna grupa nowotworów krwi. Szybka diagnoza i zastosowanie odpowiedniego leczenia może zapewnić 5-letnie przeżycie nawet do 90%, ale różni się ono znacznie w zależności od typu NHL i stopnia zaawansowania choroby. Złożony proces rozwoju i różnicowania sprawia, że limfocyty B są szczególnie podatne na aberracje genetyczne. Locus genu łańcucha ciężkiego przeciwciał (ang. *immunoglobulin heavy chain*, IGH) podlega rekombinacji VDJ, hipermutacji somatycznej i rekombinacji prowadzącej do przełączania klas immunoglobulin, które są niezbędne do powstania szerokiego spektrum przeciwciał o wysokim powinowactwie. Ekspresja z locus *IGH* jest kontrolowana przez jego sekwencje wzmacniające: E μ oraz regiony regulatorowe 3'RR1 i 3'RR2. Przebudowa locus *IGH* obejmuje pęknięcia podwójnej nici DNA, które stwarzają zagrożenie powstania nieprawidłowych rearanżacji. Rzeczywiście, cechą charakterystyczną NHL są translokacje, w wyniku których onkogeny przenoszone są w pobliże sekwencji wzmacniających transkrypcję (enhancerów) *IGH*. Chłoniak rozlany z dużych komórek B (ang. *diffuse large B-cell lymphoma*; DLBCL) jest najczęściej rozpoznawanym podtypem NHL i często charakteryzuje się obecnością t(14;18)(q32;q21) IGH/BCL2 zestawiając regulator apoptozy – BCL2 – z sekwencjami wzmacniającymi ekspresję *IGH*. Chłoniak Burkitta (ang. *Burkitt lymphoma*; BL) należy do szybko proliferujących NHL. Jest to rzadszy podtyp, w większości przypadków powiązany z t(8;14)(q24.1;q32) MYC/IGH. Podobnie jak w przypadku DLBCL, w BL MYC jest zestawiany z sekwencjami wzmacniającymi *IGH*, co prowadzi do jego zwiększonej ekspresji. MYC jest czynnikiem transkrypcyjnym zaangażowanym w kontrolę kilku procesów komórkowych, takich jak wzrost, proliferacja i apoptoza. Deregulacja onkogenu przez sekwencje wzmacniające *IGH* jest wczesnym zdarzeniem patogennym, które nakierowuje komórkę B na drogę transformacji nowotworowej. Przeżycie i proliferacja komórek chłoniaków często zależy od ekspresji translokowanego onkogenu. Pomimo szerokiej wiedzy na temat roli sekwencji wzmacniających transkrypcję *IGH* w normalnych komórkach B, nasze obecne rozumienie ich funkcjonowania w chłoniakach B-komórkowych jest ograniczone.

Badania podjęte w tej rozprawie doktorskiej poszerzają wiedzę na temat roli sekwencji wzmacniających ekspresję *IGH* w NHL. W artykule przeglądowym **Enhancing B-Cell Malignancies—On Repurposing Enhancer Activity towards Cancer** (Kasprzyk ME, Sura W, Dzikiewicz-Krawczyk A, 2021) opisałam, w jaki sposób sekwencje wzmacniające transkrypcję mogą być zaangażowane w powstawanie nowotworów z komórek B. Szczególnie skupiłam się na enhancerach genu *IGH*, przedstawiając podsumowanie aktualnych doniesień literaturowych na temat ich roli w normalnym rozwoju komórek B i w komórkach chłoniaków. Na podstawie dostępnej wiedzy opisałam interakcje

między E μ i 3'RR oraz wymieniłam modele mysie wykorzystane w badaniach. W artykule oryginalnym **CRISPRi screen identifies core regions in IGH enhancers essential for non-Hodgkin lymphoma cells survival** (Kasprzyk ME i in., w przygotowaniu) potwierdziłam wyniki uzyskane za pomocą naszego badania przesiewowego CRISPR/Cas9 ukierunkowanego na sekwencje wzmacniające transkrypcję genu *IGH* w BL i DLBCL. Badanie przesiewowe CRISPRi pozwoliło na identyfikację precyzyjnych regionów w E μ i 3'RR, które są niezbędne do przeżycia komórek NHL. Wykazałam, że inhibicja tych istotnych regionów w sekwencjach wzmacniających *IGH* obniża proliferację komórek chłoniaka i zmniejsza ekspresję translokowanych onkogenów. W BL udało mi się częściowo odwrócić obserwowany fenotyp przez nadekspresję MYC. Ponadto wykazałam, że zablokowanie regionu istotnego dla E μ prowadzi do utraty receptora komórek B (BCR) na powierzchni komórek, który jest istotny dla funkcjonowania i przeżywalności limfocytów B. Przeprowadziłam również sekwencjonowanie RNA (RNA-Seq) pochodzącego z frakcji chromatynowej i potwierdziłam aktywną transkrypcję z sekwencji wzmacniających *IGH* i z ich istotnych regionów. Potwierdziłam ekspresję enhancerowych RNA (eRNA) z istotnych regionów sekwencji wzmacniających *IGH* w szerokim panelu chłoniaków z komórek B, a także w próbkach pochodzących od pacjentów. W drugim artykule oryginalnym **7-[[[4-methyl-2-pyridinyl)amino](2-pyridinyl)methyl]-8-quinolinol (compound 30666) inhibits enhancer activity and reduces B-cell lymphoma growth – A question of specificity** (Kasprzyk ME i in., 2021) przetestowałam związek 30666, zaproponowany niedawno jako specyficzny inhibitor sekwencji wzmacniających genu *IGH*. Moje badania wykazały, że związek 30666 rzeczywiście zmienia aktywność enhancerów genu *IGH*, na co wskazuje obniżona ekspresja translokowanych onkogenów, zróżnicowana ekspresja eRNA i globalne zmiany poziomu modyfikacji histonów specyficznych dla enhancerów. Chociaż związek 30666 negatywnie wpływał na przeżywalność komórek, wykazałam, że efekt ten nie był ograniczony tylko do chłoniaków B-komórkowych.