

Doktori értekezés tézisei

**ABCB1 transzporterek vizsgálata
multidrog rezisztens patkány hepatoma
sejtekben**

Sike Ádám



Témavezető:
Prof. Dr. Boros Imre Miklós
Tanszékvezető egyetemi tanár

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

2014

BEVEZETÉS

Az emberiség egyik súlyos egészségügyi problémája a rákos megbetegedések számának folyamatos növekedése. A sikeres rákterápia kulcsa az alkalmazott kemoterápiás szerek hatékonysága, akár egyedül, akár sugárterápiával, vagy sebészeti eljárással kombinálva alkalmazzák azokat. A daganatos betegek kemoterápiás kezelése azonban gyakran kudarcba fullad, aminek fő oka a tumorok citotoxikus szerekkel szemben mutatott úgynevezett multidrog rezisztencia, (MDR) fenotípusa. A szerzett multidrog rezisztencia kialakulásáért számos sejtes mechanizmus tehető felelőssé. A szerzett MDR klasszikus, transzport alapú kialakulása során a kemoterápiás szereket különböző, energia-függő membrán transzporter fehérjék távolítják el a rákos sejtéből, biztosítva ezáltal, hogy a drogok nem érik el a terápiás koncentrációjukat a sejtben belül. Ezek a pumpák az ABC-transzporter (ATP-Bindig Casette) fehérje szupercsalád tagjai. Ezen fehérjék fiziológiás szerepe többek között a sejtekbe bejutott különböző mérgező anyagok gyors és hatékony eltávolítása, ezáltal a sejt túlélésének biztosítása. Groteszk módon a rákos sejtek ezt a természetes védekező mechanizmust kihasználva, azt a maguk javára fordítva, biztosítják saját túlélésüket. Ezért a jelenségért elsősorban az ABC transzporter családba tartozó ABCB1/MDR1/P-gp fehérje fokozott aktivitása tehető felelőssé. A megnövekedett ABCB1 aktivitást számos mechanizmus előidézheti. A drog-rezisztens sejtekben génamplifikáció, kromoszóma-

transzlokáció és mRNS-stabilizáció gyakran közreműködik a megemelkedett ABCB1 szint létrehozásában. Ezen faktorok mellett fontos szerepet játszanak az ABCB1 gén transzkripciójának aktivitásában bekövetkezett változások is. Az MDR1 génkifejeződését számos transzkripció faktor, tumorszuppresszor és onkogén szabályozza, valamint egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak az epigenetikai faktorok (hiszton acetiláció, DNS metiláció) szabályozó szerepének is.

Munkám során multidrog rezisztens patkány hepatoma sejtvonalakat használtam a MDR fenotípus kialakulásának hátterében álló molekuláris mechanizmusok, különös tekintettel a hiszton acetiláció szerepének a felderítésére. A közepesen (col500) és az erősen (col1000) multidrog rezisztens sejtvonalakat a dexametazon-rezisztens anyai sejtvonalat (D12) növekvő koncentrációjú kolhicinnal kezelve szelektálták. Az így létrejött col500 és col1000 sejtek keresztrezisztenciát mutattak számos, szerkezetileg különböző droggal szemben. Kimutatták, hogy az anyai sejtvonalhoz képest jelentősen megemelkedett bennük az MDR1 mRNS és fehérje szintje.

CÉLKITÚZÉSEK

Munkám céljának tűztem ki a multidrog rezisztens patkány hepatoma sejtekben megfigyelt megemelkedett ABCB1 expresszió hátterében álló mechanizmusok, különös tekintettel a hiszton acetiláció szerepének a feltérképezését. Ennek érdekében a következő kérdésekre kerestem választ:

1. Az MDR fenotípus kialakulásában az ABCB1a és/vagy az ABCB1b transzporterek megemelkedett aktivitása játszik-e fontos szerepet? Esetleg az ABCC1-nek is szerepe van benne?
2. Az ABCB1 megnövekedett aktivitásában szerepet játszik-e
 - az *Abcb1a* és *Abcb1b* gének amplifikációja,
 - az *Abcb1a* és *Abcb1b* génekről képződött mRNS-ek stabilitásának megváltozása,
 - az *Abcb1a* és *Abcb1b* gének transzkripciójának megváltozása?
3. Megfigyelhető-e az *Abcb1* gének transzkripciójának olyan változása, ami összefüggésben áll a kromatin szerkezetét befolyásoló hiszton módosítások változásával?
4. A hisztonok acetilációját befolyásoló szerek (hiszton deacetiláz gátlók) hatással vannak-e az *Abcb1* gének expressziójára?

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- Transzporter-fehérjék aktivitásának meghatározása calcein-assay módszerrel
- Génexpresszió meghatározása kvantitatív valós idejű PCR (QPCR) módszerrel
- ABCB1 fehérjék mennyiségének meghatározása Western blot analízissel
- RNS stabilitás meghatározása
- Az *Abcb1* gén szabályozó régióinak vizsgálata szekvenálással
- Riporter plazmidok transziens transzfekciója és luciferáz aktivitásmérés
- H3K9 acetiláció meghatározása genomi régiókban, kromatin immunoprecipitáció módszerrel

EREDMÉNYEK

1. Patkány hepatoma sejtek MDR fenotípusának kialakításában szerepet játszó transzporterek

Első lépésben a sejtvonalak transzporter aktivitását határoztam meg. Ennek során alátámasztottam azokat a korábbi eredményeket, hogy rezisztens sejtekben az ABCB1 transzporter aktivitása jelentősen megemelkedett. Meglepő módon az ABCC1 transzporter aktivitása ezzel ellentétesen változott: a szenzitív sejtekben aktívabb pumpa a rezisztens sejtekben szinte inaktiválódott. Mivel a rágsálók genomja két ABCB1 transzporter izoformát kódol, és a korábbi vizsgálatok során a sejtvonalak létrehozói nem különítették el ezek működését a sejtvonalakban, ezért következő lépésben meghatároztam a két ABCB1 transzporter aktivitását. A kapott eredmények alapján a két izoforma aktivitási mintázata között jelentős különbség fedezhető fel. A D12 sejtekben mért ABCB1a aktivitás kb. fele az ABCB1b esetén mért értéknek, a rezisztens sejtekben ez az alacsony aktivitás még tovább csökken, míg ezzel párhuzamosan a magasabb aktivitást mutató 1b izoforma aktivitása tovább nő a col500 és col1000 sejtekben. A fenti eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a vizsgált rezisztens sejtek MDR-fenotípusa az ABCB1b transzporter fokozott működésének köszönhető.

2. Az ABCB1 megnövekedett aktivitásában szerepet játszó mechanizmusok

Az aktivitás-vizsgálatok során felfedezett különbségeket látva megfogalmazódott a kérdés, hogy vajon az *Abcb1* génnek expressziójában történtek-e olyan változások, melyek megmagyarázhatják a fent leírt megfigyeléseket. Quantitatív PCR módszerrel mindegyik vizsgált sejtvonalban jelentősen magasabb *Abcb1a* mRNS szintet detektáltam, mint *Abcb1b*-t. A rezisztens sejtekben a szenzitív sejtekhez képest mindkét mRNS mennyisége megnőtt, és az *Abcb1b* esetében a növekedés mértéke jóval magasabb volt, mint az *Abcb1a* esetében. Annak érdekében, hogy megvizsgáljam, vajon az mRNS-szintben mérhető különbségek a fehérjék szintjében is kimutathatók-e, ABCB1a- és ABCB1b-specifikus ellenanyagokat használva Western-blot kísérletet végeztem. Ennek során megállapítottam, hogy míg az ABCB1b fehérje mennyisége a drog-rezisztens sejtvonalakban kis mértékben megemelkedett a szenzitív sejtekben detektált mennyiséghez képest, addig az ABCB1a esetén számottevő eltérést nem sikerült kimutatnom a sejtvonalak között.

Drog-rezisztens sejtekben a megemelkedett *Abcb1* mRNS szint létrehozásában több faktor is szerepet játszhat. Ezek közül gyakran megfigyelték a transzportereket kódoló génnek amplifikációját. A D12 és a rezisztens sejtek között mindkét gén tekintetében a kópiaszámban csupán minimális (kevesebb, mint kétszeres) eltérést fedeztem fel. A col500 és col1000 sejtekben

kimutatott magas mRNS-szintet tehát a bennük kimutatható kismértékű génamplifikáció, ha egyáltalán van ilyen, egyedül aligha magyarázza. Ezért felmerült a kérdés, hogy vajon az *Abcb1* mRNS-ek stabilitásának megnövekedése szerepet játszik-e a megemelkedett mRNS-szint létrehozásában? Azt tapasztaltam, hogy míg az *Abcb1a* mRNS-ek esetén nem mutatható ki jelentős különbség azok fél-életidejében a szenzitív és a rezisztens sejtek között, addig az *Abcb1b* mRNS-ek fél-életideje kismértékben ugyan, de megnövekedett a col500 és col1000 sejtekben. A növekedés azonban közel sem olyan jelentős mértékű, hogy az magyarázatot adhatna a sejtvonalak között detektált 5-20-szoros nagyságrendű mRNS-mennyiségbeli különbségekre.

Mivel sem a génamplifikáció, sem az RNS-stabilitás vizsgálatával kapott eredmények nem szolgáltak teljes magyarázattal a megnövekedett mRNS-mennyiség kialakulására, a következő lépésben az *Abcb1* gének transzkripcióját vettem górcső alá. A génekről képződő éretlen (pre-) mRNS-ek vizsgálatával sikerült kimutatnom, hogy a rezisztens sejtekben mind a pre-*Abcb1a*, mind a pre-*Abcb1b* mRNS nagyobb mennyiségben van jelen, mint a szenzitív sejtvonalban. Ez a megfigyelés azt sugallja, hogy a drog-rezisztens sejtekben az *Abcb1* gének transzkripciója fokozottabb, mint a szenzitív sejtekben. A megfigyelés magyarázattal szolgálhat a col500 és col1000 sejtekben kimutatott szignifikánsan magasabb mRNS-szintek kialakulására is.

3. Az *Abcb1* gének expresszióját befolyásoló hiszton módosítások

Az epigenetikai tényezők több úton is befolyásolhatják az *Abcb1* gének kifejeződését. A DNS-metiláció és a hiszton acetiláció szerepét az *Abcb1* gének szabályozásában évek óta kitüntetett figyelemmel követik nyomon. A kromatinszerkezet befolyásolhatja az *Abcb1* expresszióját szabályozó transzkripciós faktorok hozzáférését is kötőhelyeikhez. Drog-szenzitív és drog-rezisztens humán emlőkarcinóma sejtek vizsgálata során kimutatták, hogy a rezisztens sejtekben intenzíven átíródó *MDR1* gén promóter régiójában jelentősen megemelkedett az acetilált H3K9 mennyisége. Az általam vizsgált a drog-rezisztens sejtek esetében, annak ellenére, hogy az *MDR1* gének expressziója jelentősen megemelkedett, meglepő módon, egyik gén iniciátor régiójában sem sikerült a sejtvonalak között jelentős különbséget kimutatnom a H3K9ac mennyiségében. Ebből arra következtethetünk, hogy a col500 és col1000 sejtekben az *Abcb1* gének transzkripció aktivációja nem jár együtt a H3K9 acetiláció megemelkedésével. Az a megfigyelés, hogy az *Abcb1a* iniciátor régiójában mindhárom sejtvonal esetén magasabb a H3K9ac mennyisége, mint az *1b* iniciátor régiójában, egybevág a róluk képződött mRNS-ek mennyiségével. Ezek az eredmények azt sugallják tehát, hogy a H3K9 acetilációnak mindhárom sejtvonalban szerepe van az *Abcb1a* gén *Abcb1b*-hez képest fokozottabb transzkripciójában, azonban a sejtvonalak között kimutatott expresszió-különbségek létrehozásában nem vesz részt.

4. A hisztonok acetilációját befolyásoló szerek (hiszton deacetiláz gátlók) hatása az *Abcb1* génnek expressziójára

Egy széles körben elfogadott modell szerint a DNS-metiláció és a hiszton fehérjék acetilációja között hierarchikus viszony áll fenn, oly módon, hogy a metiláció domináns az acetiláció felett. E modell alapján az a várakozás, hogy a három hepatoma sejtvonalban az *Abcb1* génnek promóter régióinak metilációs foka alacsony, hiszen mindegyik sejtvonal kifejezi a szóban forgó géneket. Ezért várható, hogy a sejteket hiszton deacetiláz inhibitorral kezelve, mindegyik sejtvonalban az *Abcb1* génnek transzkripciójának aktivációja lesz tapasztalható. A fenti hipotézis tesztelésére a sejteket hiszton deacetiláz gátló TSA-val kezeltem. Az *Abcb1b* esetén a TSA kezelés várt hatását sikerült kimutatnom: mindhárom sejtvonalban a kezelt sejtekben megnőtt a génről képződött mRNS mennyisége a kezeletlen sejtekhez képest. Az *Abcb1a* gén esetén teljesen váratlanul ennek épp az ellenkezőjét tapasztaltam, azaz a kezelt sejtekben csökkent a génről képződött mRNS mennyisége. Amennyiben a TSA valóban közvetlenül a génnek transzkripcióját befolyásolta, akkor a tapasztalt különbségek a pre-mRNS-ek vizsgálata során is felszínre kell, hogy jöjjenek. Valóban, az *Abcb1a* pre-mRNS-ek mennyisége csökkent, míg az *Abcb1b* pre-mRNS-ek mennyisége nőtt a trichostatin A-val kezelt sejtekben. Ez a megfigyelés tehát azt sugallja, hogy a HDACi-kezelés az általam vizsgált sejtvonalakban eltérően hat az MDR1 génnek transzkripciójára: az *Abcb1a* átírását csökkenti, ezzel párhuzamosan az *Abcb1b* transzkripcióját pedig fokozza.

ÖSSZEFOGLALÁS

Multidrog rezisztens patkány hepatoma sejtek megemelkedett ABCB1 expressziójának hátterében álló mechanizmusok

A dolgozatomban bemutatott eredmények rámutatnak a rákos sejtek MDR fenotípusának kialakításában kulcsszerepet játszó ABCB1 transzporter fehérjék képződésének bonyolult és összetett szabályozására. Az általam vizsgált drog-rezisztens patkány hepatoma sejtekben az *Abcb1* génekről képződött mRNS-ek mennyisége jelentősen megemelkedett a szenzitív sejtekben detektált mennyiséghez képest. Ennek hátterében nem a kérdéses gének kópiaszámának megnövekedése áll, *Abcb1b* esetén azonban a róla képződött mRNS megnövekedett stabilitása szerepet játszik benne. A col500 és col1000 sejtekben az *Abcb1* gének átírása fokozott intenzitással folyik, ami magyarázattal szolgál a bennük detektált magas mRNS-szintek létrejöttére. A H3K9 acetilációnak mindhárom sejtvonalban szerepe van az *Abcb1a* gén *Abcb1b*-hez képest fokozottabb transzkripciójában, azonban a sejtvonalak között detektált expresszió-különbségek létrehozásában ez a módosítás nem vesz részt. A HDACi-kezelés az általam vizsgált sejtvonalakban eltérően hat az MDR1 gének transzkripciójára: az *Abcb1a* átírását csökkenti, ezzel párhuzamosan az *Abcb1b* transzkripcióját pedig fokozza, azonban ez a hatás a transzporter-aktivitások szintjén már nem jelenik meg.

KÖZLEMÉNYEK

A disszertáció alapjául szolgáló publikáció:

Ádám Sike^{1*}, Enikő Nagy^{1*}, Balázs Vedelek¹, Dávid Pusztai¹, Anikó Venetianer³ and Imre M. Boros^{1, 2, #} **mRNA levels of related *Acb* genes change opposite to each other upon histone deacetylase inhibition in drug-resistant rat hepatoma cells** PLOS ONE 9:(1) pp. 1-12. (2014) **IF: 3,730**

Egyéb publikációk:

Ildikó Huliák^{1*}, **Ádám Sike**^{1*}, Sevil Zencir^{2*} and Imre M. Boros^{1, 3, #} **The objectivity of reporters: interference between physically unlinked promoters affects reporter gene expression in transient transfection experiments** DNA and Cell Biology 31:(11) pp. 1580-1584. (2012) **IF: 2,344**

Sevil Zencir¹, **Adam Sike**[†], Melanie Dobson[‡], Ferhan Ayaydin[§], Imre Boros^{†, ||}, and Zeki Topcu^{¶, 1} **Identification of transcriptional and phosphatase regulators as interaction partners of human ADA3, a component of histone acetyltransferase complexes** BJ Gene 450:(2) pp. 311-320. (2013) **IF: 4,654**

*Osztott elsőszerző

Összesített impakt faktor: 10,728