

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Az MDRI gén kromatin szerkezetének tanulmányozása
gyógyszerérzékeny és gyógyszerrezisztens humán sejtekben**

Tóth Mónika

Témavezet : Dr. Bálint Éva

SZTE TTIK
Biológia Doktori Iskola

Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány
BAYGEN Intézet

Szeged

2012

BEVEZETÉS

A DNS, hiszton és nem-hiszton fehérjék alkotta kromatin szerkezetét a citozin bázisok és a hiszton fehérjék kémiai módosításai befolyásolják, ezáltal megváltoztatják a DNS-hez való hozzáférést. A transzkripció, mint kromatin alapú folyamat szabályozásához számos specifikus hiszton módosítás kombinációja szükséges. A hiszton fehérjék N-terminálisán lévő lizin aminosavak poszttranszlációs acetilációja többnyire pozitívan korrelál a génkifejezéssel. A kromatin hiszton acetilációs állapotát két, egymással ellentétesen ható enzimsz csoport, a hiszton acetiltransferázok (HAT) és hiszton deacetilázok (HDAC) szabályozzák.

Munkánk során a többszörös gyógyszerrezisztencia kialakulásának epigenetikai szabályozását tanulmányoztuk. A multidrog rezisztens tumoros sejtekben a leggyakrabban leírt mechanizmus szerint megnövekszik a plazmamembránon diffúzióval átjutó hidrofób anyagok energiaigényes kipumpálásának mértéke. Ennek jól ismert esete az ABC (ATP binding cassette) családba tartozó ABCB1/MDR1 (multidrug resistance gene 1) gén által kódolt transzporter fokozott működése. A vizsgálatok szerint a kemoterápia során megemelkedik az MDR1 gén kifejezésének mértéke. Az MDR1 gén transzkripciójának epigenetikus szabályozásában kulcsszerepe van a kromatin acetiláltsági állapotának. A PCAF (p300/CBP associated factor), p300 és CBP (CREB binding protein) HAT-ok aktiválják az MDR1 promótert; az enzimek jelenlétét az

aktívan átíródó gén promóter régiójában *in vivo* is kimutatták, ezek egymáshoz való viszonya azonban nem tisztázott.

Mivel az MDR1 transzporterfehérje magas szintjével csökken a tumoros beteg túlélési ideje, így hosszú ideje vizsgálatok folynak a többszörös gyógyszerrezisztencia leküzdésére. Mivel az MDR1 gén transzkripciójának szabályozásában több hiszton acetiltranszferáz és hiszton deacetiláz részt vesz, ezért ezek aktivitásának befolyásolása HDAC illetve HAT inhibitorokkal lehet séget adhat a gén kifejezésének gátlására.

CÉLKIT ZÉSEK

Célunk az MDR1 génkifejezés epigenetikus szabályozásának vizsgálata volt doxorubicin kemoterápiás szerre érzékeny és rezisztens MCF7 humán eml karcinóma sejtvonalakban.

A következ kérdésekre kerestük a választ:

1. A drogrezisztens sejtvonal doxorubicin rezisztenciája összefüggésbe hozható-e az MDR1 gén megemelkedett expressziójával? Ha kimutatható az MDR1 mRNS szint növekedés, ez génamplifikációnak, magas promóter aktivitásnak vagy az mRNS megváltozott stabilitásának köszönhet ?
2. Magas MDR1 promóter aktivitás esetén annak fenntartásában milyen szerepe van a hiszton acetilációnak? A promóter kromatinjára és a gén egyéb régióira milyen specifikus hiszton acetilációs módosítás jellemz ?

3. Hogyan befolyásolja az MDR1 gén expressziós szintjét a hiszton acetilációs mintázat módosítása HDAC és HAT inhibitorok segítségével? Lecsökkenthet a drogrezisztens sejtvonalban a magas MDR1 mRNS szint a hiszton acetilációt befolyásoló kezelésekkel?

4. Az MDR1 gén specifikus hiszton acetilációs mintázatának fenntartásában milyen szerepet töltenek be a p300, GCN5 és PCAF hiszton acetiltransferázok? Utóbbiak mely HAT komplex részeként vesznek részt az esetleges transzkripció szabályozásban?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

- humán sejtek tenyésztése, kezelése inhibitorokkal
- sejtek életképességének vizsgálata MTT assay-vel
- drog akkumuláció vizsgálata FACS analízis segítségével
- mRNS izolálása és reverz transzkripciója
- kvantitatív polimeráz láncreakció (QPCR)
- MDR1 gén kópiaszámának QPCR alapú meghatározása
- Western blot
- kromatin immunprecipitáció (ChIP)
- kis interferáló RNS (siRNS) alapú géncsendesítés

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Az MDR1 gén amplifikációjának és megnövekedett kifejezésének szerepe a magas mRNS szint kialakításában.

A doxorubicin rezisztens MCF7-KCR sejtvonalban nagy mértékben megemelkedett az MDR1 mRNS mennyisége a doxorubicin érzékeny MCF7 sejtvonalhoz képest. A drogrezisztens sejtekben a magas transzkriptum szinthez hozzájárul a MDR1 gén egy nagyságrendbeli amplifikációja. Az mRNS mennyiségének öt nagyságrendbeli megemelkedése magas MDR1 promóter aktivitásra utal. Az MDR1 gén transzkripciója két alternatív transzkripciós start helyt 1 iniciálódhat. A f transzkripciós start hellyel, a downstream promóterrel ellentétben, az upstream promóter aktivitásában az MCF7 és MCF7-KCR sejtek nem mutatnak különbséget. Az MCF-KCR sejtvonalban a fehérje kifejezését az mRNS stabilitásának módosulása nem befolyásolja.

Az aktív MDR1 génm kötéshez epigenetikai változások járulnak hozzá.

Az MDR1 génkifejezés epigenetikai szabályozását tanulmányozva, meghatároztuk az acetil H3K4, H3K9, H3K14, H4K8 és H4K12 lizinek mennyiségét a génlókus transzkripció szabályozó régióiban és az átíró génszakaszok kromatinjában. A drogrezisztens MCF7-KCR sejtekben a gén downstream promóterében és az els exon régiójában nagymértékben megemelkedett az acetil H3K9 mennyisége. Aktív transzkripció során az MDR1 transzkripciós start helyének környezetében kis

mérték emelkedés mutatható ki az acetil H3K4 szintjében; a géntest kromatinjában az acetil H3K4 és H4K8 lizin módosítás mértéke magasabb. Eredményeink összefüggnek a nemrégiben leírt megfigyeléssel, ami szerint a gének 5' kódoló szakaszában nemcsak a H3K4 lizin metilációjának, hanem acetilációs módosításának mértéke is korrelációt mutat a gén transzkripciós aktivitásával.

Az egyes acetil lizinek globális mennyiségét vizsgálva azt találtuk, hogy a drogrezisztencia kialakulása során nemcsak az MDR1 gén kromatinjában, hanem a teljes genomban megemelkedett a hiszton acetiláció mértéke. Az MCF7-KCR sejtek megváltozott hiszton acetilációs szabályozására utal a sejtvonalak trichostatin A (TSA) hiszton deacetiláz gátló kezelése is. TSA hatására a drogrezisztens sejtekben a vizsgált lizinek acetilációjának mértéke a drogérzékeny sejtekkel szemben tovább nem növelhet .

Hiszton deacetiláz gátlás hatása eltér a drogérzékeny és - rezisztens sejtvonalakban.

Az MDR1 gén kifejezésében a hiszton acetiláció szabályozó szerepére mutat rá, hogy a trichostatin A kezelés a doxorubicin érzékeny MCF7 sejtekben indukálta a génexpressziót. Ezzel szemben az MCF7-KCR sejtek génexpressziós mintázatára nem volt hatása a HDAC gátlásnak. Az MCF7 sejtekben az acetil H3K4 és H3K9 lizinek mennyiségének emelkedése kísérte az MDR1 transzkripciós indukcióját, az átíró géntest kromatinjában illetve a gén promóter régióiban és azokat követő első exonokban. A HDACi hatására MDR1 expresszióváltozást nem mutató MCF7-KCR

sejtekben valamennyi vizsgált MDR1 specifikus régióban több acetyl H4K12 lizin volt kimutatható.

Egyes HAT enzimek gátlásának következményei eltérnek a drogérzékeny és –rezisztens sejtvonalakban.

A hiszton deacetylázok gátlása mellett vizsgáltuk, hogy a GCN5/PCAF katalitikus alegység hiszton acetyltransferáz komplexek hiányában, melyek *in vivo* vizsgálatok eredménye alapján az acetyl H3K9 módosítás kialakításában részt vesznek, hogyan változik az MDR1 gén expressziója. A drogérzékeny sejtvonal alapszint MDR1 expressziója lecsökkent a PCAF HAT illetve az ADA2B HAT-komplex alegység specifikus lecsendesítésével. Ez arra utal, hogy az MCF7 sejtekben a PCAF és ADA2B tartalmú HAT komplexnek az alapszint MDR1 transzkripcióban szabályozó szerepe van, illetve hogy a homológ HAT komplexek hasonló katalitikus aktivitásuk ellenére eltérő target géneket szabályozhatnak. A MCF7-KCR sejtek MDR1 mRNA szintje nem csökkent le a PCAF, az ADA2B vagy a GCN5 fehérjék hiányában. Ugyanakkor a két homológ HAT egyidejű gátlásával alacsonyabb transzkriptum szintet mutattunk ki. Ez arra utal, hogy a drogrezisztens sejtekben a magas MDR1 mRNA mennyiség és ezzel egyidejűleg a H3K9 lizin megemelkedett acetylációs szintjének kialakításában és/vagy fenntartásában a PCAF és a GCN5 egymást helyettesítve vesznek részt.

A p300 HAT szerepének vizsgálatához az enzim működését a HATi II vegyülettel gátoltuk. A HATi II kezelés következtében mindkét sejtvonalban lecsökkent a H3K9, H3K14, H3K18 és H4K12

lizinek genomi acetiláltságának mértéke. A drogérzékeny sejtekben a HATi II csökkentette az MDR1 expressziót. Ez a PCAF mellett a p300 transzkripció szabályozó szerepére utal az MCF7 sejtvonalban. A gén vizsgált kromatin régióiban nem változott szignifikánsan a specifikus acetil lizinek mennyisége a genomi szinten tapasztalt csökkenés ellenére.

A drogerezisztens sejtvonalban a drogérzékennyel szemben az MDR1 átírása indukálódott a HATi II kezelésre. A genomi hiszton acetiláltság csökkenésével egyidejűleg az acetil H3K4 szintje MDR1 specifikus régiókban megemelkedett.

Az általános elképzelés szerint a kromatin acetiláltságának mértéke korrelál az onnan átíródó transzkriptumok mennyiségével. Eredményeink arra utalnak, hogy a génextpresszió során csak specifikus lizinek acetiláltsági szintje emelkedik meg. Azonban az acetil lizinek mennyiségének emelkedése nem feltétlenül vezet a transzkripció mértékének további növekedéséhez. Emellett a génkifejezés csökkenésével egyidejűleg az acetil lizinek szintje változatlan maradhat.

A drogerezisztens sejtvonalban megváltozott az acetil lizinek kialakításának és fenntartásának szabályozása.

A specifikus acetil lizinek genomi szint vizsgálatának eredménye a drogerezisztens sejtek módosult hiszton acetilációs szabályozására utal. Ezt okozhatja a megemelkedett HAT aktivitás, azonban a sejtvonalak között jelentős eltérés nem mutatható ki a vizsgált enzimek expressziójában. A magas globális hiszton acetilációs szintet kiválthatja a hiszton deacetilázok lecsökkent

aktivitása is. Valószínű, hogy a megfigyelt eltérés - a HDAC5 expressziójának indukciója, a SIRT7 kifejezésének repressziója mellett egyéb, a hiszton deacetilázok működését szabályozó mechanizmusok is eltérnek az MCF7-KCR sejtekben az MCF7 sejtekhez képest.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. A drogrezisztens MCF7-KCR sejtvonalban az MDR1 gén magas expressziós szint, mely részben a gén amplifikálódásának köszönhető. A megemelkedett transzkriptum szint kialakításában az mRNS stabilitásának megváltozása nem játszik szerepet.
2. Az MCF7-KCR sejtekben a drogérzékeny MCF7 sejtekhez képest megemelkedett az acetil H3K4, H3K9, H3K14, H3K18, H4K8 és H4K12 lizinek genomi mennyisége.
3. Az MCF7-KCR sejtekben az acetil H3K9 szintje az MDR1 downstream promóterén és az azt követő exon kromatinjában nagy mértékben, a H3K4ac és H4K8ac szintje a gén átírt régióiban kis mértékben megnövekedett.
4. Egyes HDAC gének, illetve a PCAF és GCN5 HAT gének expressziós szintjében eltérés mutatható ki a drogérzékeny és rezisztens sejtvonalak között.

5. Az MCF7 sejtekben HDAC gátló TSA kezelést követően fokozódott számos lizin globális acetiláltsági szintje. A kezelés hatására indukálódó MDR1 expressziót a gén kromatinjában megemelkedett acetil H3K4 és H3K9 szint kísérte.
6. Az MCF7-KCR sejtekben TSA hatására nem változott meg az acetil lizinek globális szintje. Az MDR1 mRNA mennyisége változatlan maradt, azonban a gén kromatinjában megemelkedett a H4K12 lizin acetiláltsági szintje.
7. Az MCF7 sejtekben a PCAF és ADA2B csendesítése gátolta, a GCN5 specifikus siRNA kezelés nem változtatta meg az MDR1 transzkripcióját. Az MCF7-KCR sejtekben a PCAF, az ADA2B illetve a GCN5 gátlása nem befolyásolta az MDR1 kifejeződését, azonban a PCAF és GCN5 együttes csendesítésével lecsökkenthet a magas MDR1 mRNA szint.
8. A HATi II kezelés hatására mindkét sejtvonalban egyaránt lecsökkent a vizsgált acetil lizinek genomi mennyisége.
9. A HATi II kezelés az MCF7 sejtekben kis mértékben csökkentette az MDR1 mRNA mennyiségét, de nem okozott változást a gén kromatinjának acetiláltságában. Ezzel szemben az MCF7-KCR sejtekben fokozta az MDR1 kifejeződését és növelte a H3K4 lizin acetilációját a gén downstream promóterén.

PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemény

Toth M., Boros I., Balint E.. *Elevated level of lysine 9-acetylated histone H3 at the MDR1 promoter in multidrug-resistant cells.* Cancer Science, 2012 Apr; 103(4): 659-69 IF: 3,869

Folyóiratban megjelent, idézhet összefoglalók

Tóth M., Gyenis Á., Bálint É.: *Hisztón acetiltranszferáz inhibitor II (HATi II) kezelés hatása az egyes hisztón-lizinoldalléncok acetiláltságára.* Biokémia 34(3): 32. (2010)

Tóth M.: *Studying the chromatin structure of MDR1 gene in drug-sensitive and drugresistant human cells.* Acta Biologica Szegediensis 54(1): 71. (2010)

Tóth M., Molnár J., Boros I., Bálint É.: *A hisztón acetilációs mintázat vizsgálata a többszörös gyógyszer-rezisztenciát okozó MDR1 gén szabályozó régióiban.* Biokémia 33(3): 34. (2009)

Tóth M., Újfaludi Z., Molnár J., Boros I., Bálint É.: *A többszörös gyógyszer-rezisztenciát okozó MDR1 gén expressziójának összehasonlítása és hisztón acetiláció vizsgálata humán sejtvonalakban.* Biokémia 32(3): 72. (2008)

Absztrakt kötetben megjelent összefoglalók

Toth M, Gyenis A, Balint E. *Effect of histone acetyl transferase inhibitor II (HAT II) treatment on acetylation of specific histone lysine residues.* EMBO Transcription and Chromatin 2010, Heidelberg, Germany

Toth M, Molnar J, Boros I, Balint E. *Histone H3 K9 acetylation is highly elevated in the first exon of multidrug resistance 1 (MDR1/ABCB1) gene in a drug resistant cell line.* Epigenetics World Congress, 2009, Berlin, Germany

Toth M., Molnar J., Boros I., Balint E. *Examination of the histone acetylation pattern in the regulatory regions of the human MDR1 gene causing multidrug resistance* EMBO Chromatin and Epigenetics 2009, Heidelberg, Germany,

Egyéb, a disszertáció témájához nem kapcsolódó közlemények

Farkas Z, Kocsubé S, Tóth M, Vágvölgyi C, Kucséra J, Varga J, Pfeiffer I. *Genetic variability of Candida albicans isolates in a university hospital in Hungary.* Mycoses, 2009; 52(4): 318-325, IF: 1,402

Kocsubé S, Tóth M, Vágvölgyi C, Dóczy I, Pesti M, Pócsi I, Szabó J, Varga J. *Occurrence and genetic variability of Candida parapsilosis sensu lato in Hungary.* J Med Microbiol, 2007 Feb;56(Pt 2):190-5., IF: 2,091

Összes impakt faktor: 7,362

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott felelős szerző igazolom, hogy a Jelölt doktori értekezését ismerem. Az abban foglalt tudományos eredményeket fokozat megszerzéséhez más szerző nem használta fel. A Jelölt a társszerzős közleményében közölt adatok létrehozásában és eredmények elérésében jelentős mértékben résztvett.

Szeged, 2012. április 2.

Dr. Bálint Éva
Tudományos munkatárs
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet