

A *PSMB7* gén mint a doxorubicinnal szembeni rezisztencia prognosztikus markere az emlőrák terápiájában

Doktori tézisek

Munkácsy Gyöngyi

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Gyórfy Balázs, tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Barta Péter, egyetemi tanársegéd, Ph.D.
Dr. Mersich Tamás, főorvos, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Herszényi László, egyetemi tanár,
az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kulka Janina, egyetemi tanár, Ph.D.
Dr. Tóth László osztályvezető főorvos,
Ph.D.

Budapest
2011

1. BEVEZETÉS

A daganatos betegek hatékony kezelését jelentősen megnehezíti a **kemoterapeutikumokkal szembeni rezisztencia**, amely a kezelés során igen gyorsan kialakulhat. Kemorezisztencia létrejöttében három ismert celluláris mechanizmust különíthetünk el, amelyek a következők:

1. a gyógyszer *intracelluláris koncentrációját csökken,*
2. *a kemoterápia célpontjául szolgáló molekula megváltozik,*
3. *megváltozik a celluláris sejtválasz.*

PhD munkám során **microarray** vizsgálatokkal rezisztens, szenzitív és 24 órán át kezelt szenzitív sejtvonalak génexpressziós mintázatát hasonlítottam össze a rezisztencia hátterének vizsgálatára. A rezisztens sejtekben felülexpresszált *PSMB7* gén szerepét ezután mint a doxorubicinnal szembeni rezisztencia létrejöttében szerepet játszó gént vizsgáltam.

A ***PSMB7* gén** kódolja a sérült és szükségtelenné vált fehérjék lebontásért felelős eukarióta sejtalkotó, a proteaszóma egy alegységét. A **proteaszóma** egy ún. multikatalitikus proteínáz komplex, amely egy jól elrendezett gyűrűalakú 20S *magi struktúrával* és két végén egy-egy 19S *regulációs egységből* áll. A magját hengerszerűen 4 gyűrű alkotja; két külső gyűrűt hét α , a belső kettőt hét β alegység alkotja. A belső gyűrűben elhelyezkedő β -alegységek katalitikus aktivitással rendelkezve hasítják a gyűrűn végighaladó fehérjéket. Ezen a β -gyűrűn három proteolitikus hely van, ezek

közül a $\beta 2$ alegység (*PSMB7* gén) felel a savas részek lebontásáért. A két regulációs alegység feladata, hogy megnyissa a 20S központi csatornája felé vezető utat. ATP megkötésével és hidrolizálásával kicsavarja az ubikvitinálódott fehérjét, amely áthalad a csatornán és a β -alegységek révén progresszív degradáción megy keresztül. A lebontásra ítélt fehérjék ubikvitinálódása egy szigorúan szabályozott és sokoldalú folyamat.

Bár léteznek proteaszómagátlók, amelyek révén a proteaszómáról alkotott ismeretek jelentősen bővültek az elmúlt években, *máig nem tudjuk, hogy milyen kapcsolatban van a doxorubicin-rezisztenciával, és hogy a proteaszóma alegységek között találunk-e olyat, amely prognosztikus vagy prediktív szereppel bír a rezisztenciában.*

Doktori munkámban a *PSMB7* gén kemorezisztenciában betöltött szerepét vizsgáltam RNS interferencia és gyógyszeres kezelés kombinációjával. Az **RNS interferencia** olyan molekuláris mechanizmus, amelynek során rövid, specifikus RNS molekulák elnyomják a gének kifejeződésében kulcsszerepet játszó mRNS-ek működését. A létrejövő posztranszkripciós géncsendesítés során a DNS-ről mRNS-re átíródó információ a gén által kódolt fehérje szintézisének megkezdődése előtt egy időre gátlódik. A gén funkciójának kiesésével egyidőben **gyógyszeres kezelést** adva a rezisztens sejteknek vizsgálhatóvá válik a gén rezisztenciában betöltött szerepe a sejtek vitalitásának megváltozása alapján.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. *In vitro* vizsgálat rákos sejtvonalakon

A rezisztencia genetikai hátterének vizsgálatához különböző szöveti eredetű tumoros sejtvonalak szenzitív és rezisztens származékait használtam. **Feltételeztem, hogy amennyiben a rezisztens sejtekben a gének expressziója eltér a szenzitív sejtekéhez képest, úgy az a gén rezisztenciában betöltött szerepére utalhat.** Az expressziós vizsgálatához microarray vizsgálatokat végeztünk. Hogy kiküszöböljük a rövidtávú gyógyszeres kezelés okozta genetikai változásokat, rezisztens, szenzitív és 24 órán át kezelt szenzitív emlőrák sejtvonalakon egyaránt elvégeztük a microarray vizsgálatot.

Feltételeztem, hogy azok a gének, amelyek a rezisztens vs. szenzitív sejtekben igen, de a szenzitív és az egy napig kezelt szenzitív sejtvonalakban nem felülexpresszáltak, azok oki szereppel bírhatnak a hosszútávú rezisztencia kialakulásában. Ennek igazolására kiválasztottam a kapott génlistáról a *PSMB7* gént, amelynek doxorubicin-rezisztenciában betöltött szerepét RNS interferenciával vizsgáltam. **Feltételeztem, hogy a rezisztens sejteken felülexpresszált *PSMB7* gént elcsendesítve, a sejtek szenzitizálódnak a gyógyszerre.** Az elcsendesítés után a sejtek gyógyszeres kezelést kaptak, hogy a rezisztencia változása kimutatható legyen.

2. *In silico* vizsgálat emlőrákos betegeken

Az *in vitro* vizsgálat után megvizsgáltam, hogy a sejtvonalakon kapott eredmények klinikai mintán is igazolhatóak-e. A vizsgálathoz a GEO microarray adatbázisából letölthető összes, nyilvánosan elérhető Affymetrix HG-U133A és A+ génchippel mért emlőrákos beteg génexpressziós adataival dolgoztam. E vizsgálat során **feltételeztem, hogy a rezisztens sejtekben felülexpresszált *PSMB7* expresszió a klinikai mintákon prognosztikus jelleggel bír: a magas *PSMB7* expresszió jelzi az antraciklinnel szembeni rezisztenciát.**

3. MÓDSZEREK

1. Sejtvonalak

A vizsgálatokhoz négyféle sejtvonalat használtam: EPG85-257P humán gyomor karcinóma, EPP85-181P hasnyálmirigy-rák, HT-29 vastagbél-rák és MCF-7 emlőrák sejtvonalakat, valamint ezek doxorubicin/daunorubicin-rezisztens származékait. A rezisztens sejtek médiuma daunorubicint vagy doxorubicint tartalmazott. A 24 órán át gyógyszerrel kezelt szenzitív sejtek a kezelést a rezisztens származéknak megfelelő koncentrációban kapták. A rezisztens sejtek gyógyszerre való érzékenységének megállapítására sejtproliferációs esszé készült, amelynek vizsgálata a gyártó által javasolt protokoll alapján történt.

2. RNS izolálás

Az RNS izolálást 1×10^7 logaritmusos növekedési fázisban lévő sejtéből végeztem el a Qiagen RNeasy Mini Kit reagenszerekkel a gyártó által javasolt protokoll alapján. A kész RNS mennyiségét és minőségét NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel mértem meg, majd felhasználásig -80°C -on tároltam.

3. Microarray hibridizáció és adatfeldolgozás

Minden sejtvonalhoz három Affymetrix HG-U133A microarray-t használtunk fel a szenzitív, rezisztens és 24 órán át kezelt szenzitív vonalaknak megfelelően, így összesen 12 hibridizáció történt. A hibridizációs intenzitások normalizálásához Robust Multichip Average-t (RMA) használtunk. A rezisztens, kezelt és szenzitív csoportok különbségét meghatározó géneket a Prediction Analysis for Microarrays (PAM v.1.23) programcsomaggal végeztük. Mindegyik összehasonlításból kiemeltük a 100 legszignifikánsabb gént, hogy megkapjuk a csoportokat leginkább meghatározó géneket. A *PSMB7* gén rezisztens sejtekben való felülexpresszióját immunhisztokémiával is igazoltuk.

4. siRNSoligok tervezése, szintetizálása

A *PSMB7* gén elcsendesítéséhez használt siRNSoligok célszakaszait a siRNA Target Finder (<http://www.ambion.com>)

és siDESIGN Center (<http://www.dharmacon.com>) programok közös találataiból választottam ki. A választott három cél mRNS-hez (amelyek a 200., az 548. és az 562. bp-nál hasítanak) páronként a szenz és antiszenz DNS oligonukleotid templátokat rendeltem, majd ezekből Silencer siRNA Construction Kitet használva előállítottam az siRNS oligokat a gyártó által javasolt protokoll alapján.

A saját tervezésű és szintetizálású siRNS oligok előnye, hogy nagyobb mennyiségben is előállíthatóak, így költséghatékony módszer. Azonban mivel nem ún. validált siRNS-ekkel dolgoztam, ezért először a génhez tervezett oligok hatékonyságát kellett megvizsgálni és igazolni, valamint beállítani az RNS interferencia körülményeit (oligo koncentrációja, sejtszám, kezelés időtartama, reagensek optimális mennyiségei). Ez az optimalizálás tette ki a géncsendesítéssel összefüggő vizsgálatok legnagyobb hányadát.

5. Az siRNS oligok hatékonyságának vizsgálata

A tervezett és szintetizált siRNS oligok hatékonyságának vizsgálatához siRNS transzfekciót végeztem a gént felülexpresszáló doxorubicin-rezisztens MCF-7 emlőrák sejteken (MCF-7-RAdr). 230.000 sejtet ülepítettem egy 6-lyukú lemez egyes kísérleti tereibe, majd 5 µl SiPORT *NeoFX* transzfekciós reagenssel 10 nM végső koncentrációjú siRNS-t transzfektáltam 2,5 ml szérum- és antibiotikummentes médiumban. Egynapos inkubáció után a médiumot kétszeres steril PBS-sel való lemosást követően normál növekedési

médiumra cseréltem. Ezt a transzfekeció után 48 órával az RNS kivonás követte Qiagen RNeasy Mini Kit-tel, a korábban ismertetett módon. A cDNS-szintézis és DNS-amplifikációhoz OneStep RT-PCR Kit-et és génspecifikus primereket használtam. A PCR primereket a Primer3 programmal terveztem, a primerek kizárólagos génnel való homologitását az Pubmed adatbázis BLAST programjával igazoltam (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Az amplifikációhoz 24 ciklust végeztem, pozitív kontrollnak a β -aktin gént vettem. A PCR terméket etídium-bromiddal festett 2%-os agaróz gélen futtattam. Az siRNS oligok hatékonyságát RT-PCR-rel vizsgáltam. Három szintetizált siRNS oligoból egyetlen csendesítette hatékonyan (>80%) a *PSMB7* gént.

6. Transzfekeció és gyógyszeres kezelés

A választott gén kemorezisztenciában betöltött szerepének vizsgálatára ötvöztem a géncsökkentést a gyógyszeres kezeléssel. A rezisztens sejtekben felülexpresszált *PSMB7* gént MCF-7-RAdr sejtvonalban elcsökkentettem, majd transzfekeció után 24 órával, médiumcserével megállítottam a reakciót. Az újonnan hozzáadott normál növekedési médium 0,2 μ g/ml koncentrációban tartalmazta a gyógyszert. A sejteket a 3. napon tripszinizáltam és számoltam meg CASY DT sejt számlálóval. Kontrollnak negatív siRNS-sel kezelt MCF-7-RAdr sejteket, siRNS-sel nem kezelt MCF-7-RAdr sejteket és siRNS-sel nem kezelt MCF-7 sejteket használtam, a doxorubicinnal kezelt párjukkal. A statisztikai analízishez a kísérlet végén élő sejtek számát vettem figyelembe minden

egy-egy kísérlet során. A teljes vizsgálatot háromszor végeztem el, és minden kísérleti körülmény sejtszámát is háromszor határoztam meg. A statisztikai analízishez a gyógyszerrel kezelt sejtek számát normalizáltam a kezeletlen párjuk számával, majd a csoportok közti különbség meghatározására t-tesztet végeztem. A szignifikanciaszintet $p=0,05$ -nél húztam meg.

7. A gén jelentőségének igazolása klinikai mintákon

A gén *in silico* validálásához egy, a kutatócsoportunk által létrehozott, microarray mintákat tartalmazó adatbázist használtunk fel. Az adatbázis használata során először kiszűrtem a proteaszóma alegységeket tartalmazó géneket ($n=62$), majd megnéztük mindegyik probe set túlélési analízisét. Az adatbázis segítségével a *PSMB7* expressziók mediánjánál nagyobb ill. kisebb csoportba sorolt betegekre Kaplan-Meier túlélési analízist végeztem.

4. EREDMÉNYEK

1. A sejtek doxorubicinnal szembeni rezisztenciájának igazolása

A rezisztenciavizsgálatot minden vizsgált sejtvonalra elvégeztem és bizonyítottam, hogy a doxorubicinnal szemben rezisztens sejtek klinikai gyógyszerkoncentráció mellett a szenzitív párjukhoz képest proliferációt mutatnak.

2. Gének azonosítása

A microarray-ek nyers adatait tartalmazó adatbázis, és az Affymetrix .CEL fájlok a GEO adatbázisból letölthetőek (GSE3926). A microarray-ek predikciós analíziséhez kiválasztottuk az első 100 gént, amelyek expressziója szövettípustól függetlenül eltér az egyes kísérleti körülmények között. Az expressziós eltérések megjelenítésére a legfőbb géneket csoportokba rendeztük. Ezekben 3 olyan proteaszóma alegységet jelölő probe set volt, amelynek expressziója a doxorubicin-rezisztens sejtvonalakban nagyobb volt, de a doxorubicinnal 24 órán át kezelt szenzitív sejtekben nem (PSMB7 és PSMD13).

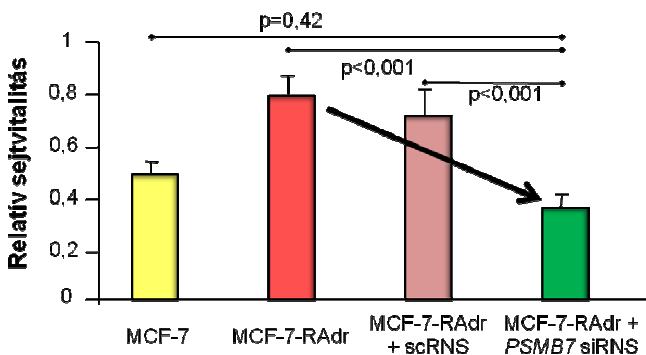
3. Proteaszóma alegységek prognosztikus jellege

A GEO adatbázisból letöltött, túlélési adattal rendelkező 1592 emlőrákos minta normalizált génexpressziójából kiszűrtem a HG-U133A és A+ microarray-en jelenlévő proteaszóma alegységeket. A 62 alegység probe set-jeinek prognosztikus potenciálját úgy határoztuk meg, hogy a mediánhoz képest a betegeket alul- ill. felülexpresszált csoportokba soroltuk, így 796 beteg került minden csoportba. Az analízis eredményeképpen 12 szignifikáns gént kaptam $FDR < 0,05$ mellett. Ezek közül egyetlen alegységet mutatott ki a microarray analízis, a *PSMB7*-et, amit így tovább vizsgáltunk. A gén felülexpresszióját immunhisztokémiai vizsgálat is igazolta.

4. A sejtek túlélése a géncsendesítés és doxorubicin-kezelés után

A *PSMB7* doxorubicin-rezisztenciában betöltött szerepének vizsgálatához a géncsendesítést ötvöztem a gyógyszeres kezeléssel, hogy megállapítsuk a sejtek túlélésére gyakorolt hatását. A sejtek életképessége doxorubicin-kezelés nélkül mind a siRNS-kezeletlen és az siRNS-kezelt körülmények között jobb volt, a doxorubicinnal kezelt megfelelőjükhöz viszonyítva. A negatív kontrollnak használt siRNS citotoxikus hatása elhanyagolható volt a génspecifikus siRNS hatásához képest.

A normalizálás után kapott adatokat az 1. ábra mutatja be. A doxorubicin-kezelést a rezisztens sejtek $79,8 \pm 13,3\%$ -a, a géncsendesítés és kezelés kombinációját a sejtek csupán $31,8 \pm 6,4\%$ élte túl. Az siRNS-kezelt és -kezeletlen MCF-7-RAdr sejtek elsődleges hibája doxorubicin kezelést követően $p < 0,001$ volt. Gyógyszeres kezelés után a szenzitív sejtek $48,3 \pm 8,1\%$ -a, a negatív kontrol siRNS-sel kezelt sejtek $73,3\%$ -a maradt életben.



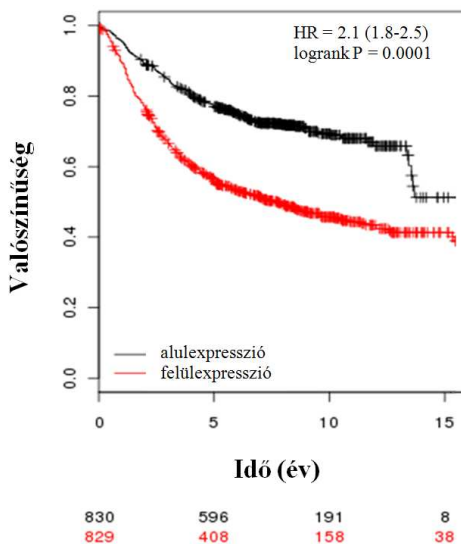
1. ábra: A *PSMB7* gén csendesítésének hatása a doxorubicin-rezisztens sejtekre. A rezisztens és géncsendesített rezisztens sejtek túlélése között szignifikáns különbséget kaptam ($p < 0,001$), míg a szenzitív és géncsendesített rezisztens sejtek túlélése között különbséget nem találtam ($p = 0,42$).

5. *PSMB7* gén mint biomarker klinikai mintákon

A *PSMB7* gén rezisztenciában való prognosztikus jellegének kimutatására klinikai mintákon igazoltam a sejtkultúrán bemutatott modellt. A betegek közül 1220-ból 968 beteg ER pozitív, 1156-betegből 190 nyirokcsomó pozitív volt. Az átlagos visszaesésmentes túlélés 6,42 év volt.

A *PSMB7* gén Affymetrix HG-U133A microarray 200786_at azonosítójú probe set-jének expressziója alapján az 1592 emlőrákos beteget 2 csoportba osztottam aszerint, hogy a mediánál nagyobb vagy kisebb a *PSMB7* expressziójuk. Az eredmény szerint azoknak a betegeknek, akik a mediánál magasabb expressziójú csoportba kerültek, szignifikánsan

rövidebb volt a túlélésük, mint a mediánnál alacsonyabb csoportba kerülteknek ($p < 0,001$, 2. ábra).



2. ábra: 1592 emlőrákos beteg Kaplan-Meier predikciós túlélése a PSMB7 expresszió alapján, medián alatt (piros) vagy felett (fekete) csoportosítva (200786_at probe set). Az eredmények szerint a gént magasan expresszáló betegek túlélése szignifikánsan rövidebb az alacsony expressziójúakhoz viszonyítva ($p < 0,001$).

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A PhD munkám során a proteaszóma PSMB7 alegységének szerepét vizsgáltam a gyógyszerrezisztenciában négy, különböző szöveti eredetű sejtvonalon valamint

emlőrákos betegeken. Sejtkultúramodellen RNS interferencia és gyógyszeres kezelés kombinálásával vizsgáltam a gén kemorezisztenciában betöltött szerepét, majd az eredményeket 1592 emlőrákos beteg adatán igazoltam.

A vizsgálat kezdő lépéseként összehasonlítottam 4 pár, különböző szöveti eredetű – gyomor, hasnyálmirigy, vastagbél és emlő - tumoros sejtvonal **expressziós mintázatát**. Affymetrix HG-U133A microarray-en azonosítottuk a doxorubicin-/daunorubicin-rezisztenciával igen, de a rövidtávú kezelésre adott válasszal nem összefüggő géneket. A vizsgálat során kaptuk a *PSMB7* gént is, amelynek funkcióját a rezisztencia-mechanizmusban eddig nem írták le.

A gén funkcióját RNS interferenciával vizsgáltam tovább MCF7 emlőtumoros sejtvonalon. Ehhez saját tervezésű és szintetizálású siRNS oligokat használtam, amelyek közül a hatékonysági vizsgálat során eggyel lehetett megfelelő csendesítést elérni.

A rezisztens sejtekben felülexpresszált *PSMB7* gén elcsendesítése után a sejtek doxorubicin kezelést kaptak. A gyógyszer hatását követően a rezisztens sejtek túlélése jelentősen csökkent a nem-géncsendesített sejtekéhez képest. *Ezen eredmény szerint tehát a rezisztens sejtek a PSMB7 gén elcsendesítésével szenzitizálhatók, vagyis a gén felülexpressziója jelentős szereppel bírhat a doxorubicinnal szembeni rezisztencia meglétében.*

Az *in vitro* megközelítés igazolására a *PSMB7* expressziójának megkülönböztetett szerepét 1592 nyilvánosan is elérhető microarray adaton vizsgáltam tovább. A gént felülexpresszáló betegek túlélése jóval rövidebb lett a gént alulexpresszáló betegcsoporthoz képest. *Az eredmény szerint tehát a PSMB7 felülexpresszió rossz prognózisra utal, és az antraciklin-rezisztencia markere lehet.*

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

- **Munkácsy Gy, Abdul-Ghani R, Mihály Zs, Tegze B, Tchernitsa O, Surowiak P, Schäfer R, Győrffy B:** PSMB7 is associated with anthracycline resistance and is a prognostic biomarker in breast cancer. (Br J Canc. 2010 Jan 19;102(2):361-8. IF: 4,831)
- **Fekete T, Rásó E, Pete I, Tegze B, Liko I, Munkácsy Gy, Sipos N, Rigó J., Győrffy B:** Meta-analysis of gene expression profiles associated with histological classification and survival in 829 ovarian cancer samples. (2011, in press, IF: 4,926)
- **Győrffy A, Baranyai Zs, Cseh Á, Munkácsy Gy, Jakab F, Tulassay Zs, Győrffy B:** Promoter analysis suggests the implication of nf b/c-rel transcription factors in biliary atresia. (Hepatogastroenterology. 2008 Jul-Aug; 55(85):1189-92. IF: 0,68)
- **Munkácsy Gy, Tulassay Zs, Győrffy B:** RNS interferencia és klinikai alkalmazása. (Orv Hetil. 2007 Nov 25;148(47):2235-40.)

Független közlemények:

- **Győrffy B, Rosivall L, Prohászka Z, Falus A, Füst Gy, Munkácsy Gy, Tulassay T:** Danubian Biobank Konzorcium: a Duna-menti egyetemek „biobanking” tevékenységének az összehangolása. (Orv Hetil. 2007 Oct 21;148(42):1999-2002.)

ΣIF: 10,437