

A FÜGGETLENÜL KIALAKULÓ REZISZTENCIA VIZSGÁLATA 29 REZISZTENS SEJTVONALON

Doktori tézisek

Dr. Tegze Bálint

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók:

Dr. Döme Balázs, osztályvezető főorvos, Ph.D.

Dr. Szijártó Attila, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Losonczy György, egyetemi tanár, Ph.D.

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Masszi András, klinikai orvos, Ph.D.

Dr. Réz Gábor, Ph.D.

Budapest

2012

Bevezetés

Világszerte évente több mint 1 000 000 új emlőrákos beteget diagnosztizálnak és 370 000-en halnak meg következtében. Hazánkban nők esetében az emlőrák a leggyakoribb daganat, évente több mint 2300 halálesetet okoz. Az emelkedő gyakoriság ellenére a betegségre specifikus halálozás a legtöbb fejlett országban csökkent, a javulás a szisztémás kezelés fejlődésének és az emlőrák szűrésnek köszönhető. A legfontosabb rizikótényezők a kor, a nem, a szülési anamnézis, hormonális faktorok és a családi kórelőzmény. Családi halmozódás is előfordulhat emlőrákos betegek körében, a betegek körülbelül 10%-a hordoz csírasejtes mutációt. Kezelésében a sebészeti ellátás, radioterápia, kemoterápia, endokrin és célzott terápia is szerepet kap.

Az emlőrák kezelése során alkalmazott kemoterápiával szembeni rezisztencia egy komplex multifaktoriális probléma, melyben számos tényező egyidejűleg szerepet játszhat, melyek a kezelés sikertelenségéhez vezetnek. Az emlőrák kemoterápiás kezelésében a doxorubicin és a paklitaxel központi szerepet játszik.

A doxorubicin elsődleges hatásmechanizmusa a DNS-sel való interkaláció. A DNS-hez kötődött doxorubicin a topoizomeráz II enzim működését gátolja, hatására képtelen lesz a DNS törések egyesítésére. Doxorubicin rezisztenciát okozhat a P-glikoprotein, az LRP (lung resistance protein) fokozott aktivitása, a proteaszóma alegységek és az

antioxidáns enzimek megváltozott kifejeződése, a megváltozott apoptotikus válaszreakció és a megváltozott topoizomeráz aktivitás.

A paklitaxel a mikrotubulusok stabilizálása révén megakadályozza a kromoszómák szegregációját az utódsejtekbe. Rezisztenciát okozhat vele szemben az ABC-transzporterek (pl.: MDR1), a tubulin izoformák és a mikrotubulus asszociált proteinek kifejeződésének változása, és a tubulin gén mutációja.

Egy adott daganatellenes szer hatékonyságát, illetve az elsődleges és a másodlagos rezisztencia jelenlétét, kialakulását hatékonyan lehet *in vitro* (sejtkultúrák) modellek segítségével vizsgálni. Voskoglou-Nomikos és munkatársai bebizonyították, hogy az *in vitro* és xenograft vizsgálatokat megfelelően végezve az eredmények alkalmasak a fázis II vizsgálatok eredményének előrejelzésére.

Humán daganatok esetében daganaton belüli heterogenitás figyelhető meg génexpresszió, sejtmorfológia, anyagcsere, motilitás, proliferatív, érképző, immunogén és áttétképző képesség tekintetében. A daganat növekedésekor a sejtek osztódása során törvényszerűen keletkeznek genetikai hibák, illetve az egyes daganatokban megfigyelhető genetikai instabilitás is hozzájárul a daganatok genetikai heterogenitásához. A heterogén sejtpopuláció a kezelés során, szelekción megy keresztül, mely során kiszelektálódnak a rezisztens sejtpopulációk. Mivel több mechanizmussal is létrejöhet a rezisztencia, a különböző rezisztencia-mechanizmusokkal jellemezhető

sejtpopulációk száma fogja meghatározni a rezisztenciáért felelős eltérések számát az adott daganatban.

Vizsgálatom során a kemoterápia rezisztencia kialakulását modelleztem olyan módon, hogy a korábbiaknál több rezisztens sejtvonalat hoztam létre, melyek azonos eredetűek. Feltételezésem szerint több sejtvonalon azonosíthatók a lényeges rezisztencia-mechanizmusok, ezáltal azonosítható lehet egy klinikailag lényeges rezisztencia mintázat.

Célkitűzések

Vizsgálataim során arra a kérdésre kerestem választ, hogy több rezisztens sejtvonal létrehozása egy sejtvonalból egy daganatellenes szerrel szemben megfelelőbb modell-e a szerzett rezisztencia modellezésére, mint egy rezisztens és az eredeti sejtvonal összehasonlítása. Ennek a modellnek a segítségével a multidrog rezisztencia jelenségét is vizsgáltam. A következő kérdéseket akartam megválaszolni:

- 1 Több, egy sejtvonalból származó rezisztens sejtvonal vizsgálatával **lehetséges-e több doxorubicinnal és paklitaxellel szembeni szerzett rezisztenciában szerepet játszó rezisztencia-mechanizmus azonosítása?**

- 2 Több, egy sejtvonalból létrehozott rezisztens sejtvonal esetén **a rezisztencia az egyes rezisztens sejtvonalakban azonos módon alakul ki doxorubicin vagy paklitaxel kezelés hatására?**
- 3 Egy kemoterápiás szerrel történő hosszú távú kezelés során **kialakul-e multidrog rezisztencia?**

Módszerek

Sejtvonalak, gyógyszeres kezelés, sejtszám és sejtproliferáció meghatározása

Vizsgálatom során két humán emlőrák sejtvonalat, az MCF-7-et és az MDA-MB-231-et használtam. A sejtvonalakat két gyógyszerrel, doxorubicinnal (EBEWE Pharma, Unterach, Ausztria) és paklitaxellel (Sigma-Aldrich, Steinheim, Németország, katalógusszám: T7402) kezeltem.

A sejtvonalak IC_{50} értékét MTT sejtproliferációs assay segítségével határoztam meg. A koncentrációsor a klinikai dózis 0,0001-szeresétől az 1000-szereséig terjedt. A klinikai dózis doxorubicin esetén 0,02 $\mu\text{g/ml}$, paklitaxel esetén 0,1 $\mu\text{g/ml}$ volt. A sejtek 24 óra alatt letapadtak, majd 72 órás gyógyszeres kezelés követően 10 μl MTT festéket pipettáztam a sejtekre, majd 4 óra múlva

100 µl szolubilizáló oldatot adtam hozzájuk. A keletkező formazán termék mennyiségét 24 órával később Multiscan FC spektrofotométerrel mértem le 595 nm-es (formazán elnyelési maximuma) és 690 nm-es (háttér) hullámhosszon. Minden koncentráció esetén háromszoros ismétléssel végeztem a méréseket. A további számításokat a három mérés átlagával végeztem. Adott sejtvonal koncentrációértékeihez tartozó abszorbancia értékekre görbét illesztettem, és meghatároztam az IC_{50} értéket GraphPad Prism szoftver segítségével. A rezisztens sejtvonalak kereszt-rezisztenciáját is meghatároztam doxorubicin, paklitaxel, 5-fluorouracil és ciszplatin kezelés esetén. 5-fluorouracil esetén a klinikai koncentráció (1x es kezelési koncentráció) 64,65 µg/ml ciszplatin esetében 14,3 µg/ml volt.

Rezisztens sejtvonalak kialakítása

Sejtvonalanként és gyógyszerenként tíz szubpopulációt különítettem el. A sejtvonalakat doxorubicinnal vagy paklitaxellel kezeltem, a gyógyszer fokozatosan emelkedő dózisaival. A konfluenciát hetente többször becsültem meg. Ha a konfluencia 50% alatti volt egy hetes kezelést követően, a kezelést felfüggesztettem: ha a 50% és 70% között volt, a kezelést folytattam médiumcsere után; 70 % feletti konfluencia esetén a sejtek egy részét fagyasztottam, a kezelést folytattam. Ha az adott sejtvonal az adott koncentrációjú kezelés mellett 3 hétig megfelelően nőtt (nem kellett a kezelést felfüggeszteni), akkor a

kezelés dózisát emeltem. A koncentrációemelések előtt MTT sejtproliferációs vizsgálatot végeztem a kezelt sejtek érzékenységének meghatározására. A kezelés időtartama alatt a gyógyszerek oldószerével kezelt sejtvonalat is fenntartottam, melyeket kontrollként használtam vizsgálataimhoz.

Nukleinsav izolálás

A minták homogenizálása Qiashredder segítségével, az RNS izolálás Qiagen RNEasy Mini kittel történt a felhasználói útmutató alapján. Az RNS mennyiségét és minőségét Nanodrop 1000 segítségével határoztam meg, ezt követően $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam a mintákat.

RT-PCR

TaqMan valós idejű polimeráz láncreakciót használtunk a kiválasztott gének mRNS expressziójának meghatározásához. Micro Fluidic Card (Applied Biosystems) rendszert használtunk a 31 minta (29 rezisztens sejtvonal, és a két kontroll sejtvonal) leméréséhez. A méréseket ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection rendszerrel végeztük, a felhasználói útmutatónak megfelelően. A géneket irodalmi adatok alapján választottam ki. Olyan gének kerültek be a listába, melyekről korábban leírták, hogy doxorubicin vagy paklitaxel rezisztenciával összefügghet az expresszió-változásuk. Ezeken kívül a

hormonreceptorok és prognózissal összefüggő gének expresszióját vizsgáltuk meg.

Citogenetika

A kontroll és a kezelt MDA-MB-231 sejt vonalakat 3-5 napig tenyésztettem. A ~80%-os konfluencia elérésekor kolcemiddel inkubáltam 24 órán át. A sejtek 1x tripszin-EDTA-val történő leválasztása után a kromoszómapreparálás standard technika szerint zajlott. Kromoszóma vizsgálatot metafázisban levő G-sávozott, tripszinizált és Wright Giemsa festékkel festett sejteken végeztük. A mintákat Cytovision 3.6 és Mac Ktype 5.6 (Scientific Systems, UK) kariotípus elemző szoftver segítségével értékeltük. A Shannon diverzitási index segítségével az eltérő citogenetikai tulajdonságokkal jellemezhető sejt populációk számát és gyakoriságát felhasználva meghatároztam az egyes rezisztens MDA-MB-231 sejt vonalak genetikai instabilitását.

Áramlási citometria

A sejtek P-glikoprotein (Pgp) aktivitását a Pgp szubsztrát rhodamin 123 segítségével vizsgáltam. 5×10^5 sejtet pipettáztam hatlyukú lemezek mélyedéseibe, majd a sejtek 24 óra alatt letapadtak. Ezt követően rhodamin 123-at adtam a sejtekhez és 30 percig inkubáltam a sejteket, majd hideg PBS pufferrel történő mosást

követően áramlási citométerrel mértem az egyes sejtek rhodamin intenzitását.

Eredmények

Sejtvonal fejlesztés

18 hónapig tartó fokozatosan emelkedő koncentrációjú kezelés során 29 rezisztens sejtvonal alakult ki (10 doxorubicin és 4 paklitaxel rezisztens MCF-7, 6 doxorubicin és 9 paklitaxel rezisztens MDA-MB-231 sejtvonal).

Bár egyes sejtvonalak esetén nagyfokú kereszt-rezisztenciát mutattam ki, nem találtam szignifikáns összefüggést a relatív rezisztencia szint és az IC_{50} értékek között. A legkisebb mértékű keresztrezisztencia ciszplatinnal szemben alakult ki. Négy sejtvonal esetén nagyfokú rezisztenciát mutattam ki 5-fluorouracillal szemben.

RT-PCR

A doxorubicin rezisztens sejtvonalakban a TOP2A gén és két tubulin izoforma expressziója mutatott összefüggést a sejtvonalak IC_{50} értékeivel. A paklitaxel rezisztens sejtvonalakban a MVP, négy tubulin izoforma és a mikrotubulus-asszociát protein 4 gén expressziója függött

össze a rezisztenciával. Az ABCB1 gén p értéke 0,03 és 0,07 volt a doxorubicin és paklitaxel rezisztens sejtvonalakban. Összefoglalva: a doxorubicin rezisztens sejtvonalak esetén egy, míg a paklitaxel rezisztens sejtvonalak esetén 6 rezisztenciához társuló gént sikerült azonosítani ennek a modellnek a segítségével.

Citogenetika

Citogenetikai vizsgálatot végeztünk az eredeti és a rezisztens MDA-MB-231 sejtvonalakon. A rezisztens sejtvonalakban számos citogenetikai változás következett be, a rezisztens sejtvonalaknak 60-110 kromoszómájuk volt. Az átlagos ploiditás és a kromoszómális aberrációk száma hasonló mértékű volt a rezisztens és az eredeti sejtvonalakban két tetraploid sejtvonal kivételével. A legnagyobb mértékű variabilitás a 3-as, 7-es, 17-es, 20-as és 21-es kromoszómán volt megfigyelhető, míg az X, a 10-es, a 13-as és a 16-os kromoszómák bizonyultak a legstabilabbnak. Leggyakrabban a 15-ös, 18-as és 21-es kromoszómán tapasztaltam állománynyerést, a leggyakoribb elvesztett szakasz a 9p21 és a 18q21 volt. Két sejtvonal, a doxorubicin rezisztens MDA-MB-231-R5 és a paklitaxel rezisztens MDA-MB-231-R11 közel tetraploid kromoszómakészlettel rendelkezett. A fő különbség a rezisztens és az eredeti sejtvonalak között az új típusú strukturális átrendeződések nagyobb száma volt.

A Shannon diverzitási index segítségével az eltérő citogenetikai tulajdonságokkal jellemezhető sejtpopulációk számát és gyakoriságát felhasználva meghatároztam az egyes rezisztens MDA-MB-231 sejtvonalak genetikai instabilitását. Az eredeti sejtvonal Shannon indexe 2,05 volt, az átlag 2,03 volt. Kromoszómális instabilitás 4 sejtvonalban volt megfigyelhető. A kromoszómális instabilitással jellemezhető sejtvonalak esetén nagyobb mértékű kereszt-rezisztencia volt megfigyelhető paklitaxel kezelés, ciszplatin kezelés, illetve 5-fluorouracil kezelés esetén, azonban ezek a különbségek nem bizonyultak szignifikánsnak Mann-Whitney teszt alkalmazása esetén.

Áramlási citometria

A sejtvonalak P-glikoprotein funkcióját a Pgp szubsztrát rhodamin 123 akkumuláció áramlási citometriai vizsgálatával határoztam meg. A paklitaxel kezelt MCF-7-R20 sejtvonal mutatta a legnagyobb mértékű kereszt-rezisztenciát doxorubicinnal szemben. A paklitaxel kezelt MDA-MB-231-R19 sejtvonal mutatta a legnagyobb mértékű rezisztenciát paklitaxellel szemben, ugyanakkor nagyfokú rhodamin 123 effluxot is tapasztaltam ennél a két sejtvonalnál. Két paklitaxel rezisztens sejtvonal (MCF-6-R5 és MCF-7-R7) doxorubicinnal és ciszplatinnal szemben is rezisztensnek bizonyult. Bár nem volt megfigyelhető összefüggés a rhodamin 123 efflux és a rezisztencia között, az áramlási citometriai mérések eredményei arra

utalnak, hogy egyes sejtvonalakban nagy szerepe lehet a rezisztencia kialakulásában a Pgp funkció megváltozásának, míg másokban egyáltalán nem játszik szerepet a rezisztencia létrejöttében.

Következtetések

Célom a szerzett rezisztencia vizsgálata volt egy újszerű sejtkultúra alapú modell segítségével. Korábbi irodalmi adatok alapján feltételeztem, hogy több azonos eredetű, rezisztens sejtvonal vizsgálatával hatékonyabban lehet klinikailag igazolt rezisztencia-mechanizmusokat azonosítani.

Az eredményeim alapján levonható **következtetések**:

- 1. Több, egy sejtvonalból származó rezisztens sejtvonal vizsgálatával lehetséges több klinikailag igazolt rezisztencia-mechanizmus azonosítása.** Ezen túlmenően, a paklitaxel rezisztens sejtvonalak esetén több korábban leírt rezisztencia-mechanizmust sikerült azonosítani ezzel az *in vitro* modellel, míg korábbi közlemények rendszerint egy-egy rezisztencia-mechanizmust írtak le.

2. **A multidrog rezisztencia kialakulása egy daganatellenes szerrel történő kezelés esetén ritka.** Mindössze két sejtvonalban alakult ki legalább kétszeres rezisztencia három szerrel szemben. Az eredmények alapján elmondható, hogy a szelekciós hatás eredménye révén az egy szerrel szembeni kereszt-rezisztencia gyakori, azonban a valódi multidrog rezisztens fenotípus kialakulása jóval ritkább.

3. **A rezisztencia nagyfokú heterogenitást mutat.** Az áramlási citometriai mérések alapján egyes rezisztens sejtvonalak esetén transzportpumpa aktivitás-növekedés következett be, míg más rezisztens sejtvonalak esetén az eredeti sejtvonallal megegyező aktivitást mutattam ki. A TaqMan mérések hasonló eredményeket mutattak ki más rezisztencia-mechanizmusok esetén is.

Saját publikációk jegyzéke

Disszertációhoz kapcsolódó publikációk jegyzéke

1. Tegze B, Szállási Z, Haltrich I., Péneváltó Z, Tóth Z, Likó I, Gyórfy B: **Parallel evolution under chemotherapy pressure in 29 breast cancer cell lines results in dissimilar**

mechanisms of resistance. *PLoS ONE* 2012, 7(2):e30804.

IF:4,411

2. Munkácsy G, Abdul-Ghani R, Mihály Z, Tegze B, Tchernitsa O, Surowiak P, Schäfer R, Gyórfy B: **PSMB7 is associated with anthracycline resistance and is a prognostic biomarker in breast cancer. *Br J Cancer*. 2010, 102(2):361-8. IF: 4,831**

Disszertációtól független publikációk jegyzéke

1. Fekete T, Rásó E, Pete I, Tegze B, Liko I, Munkácsy Gy, Sipos N, Rigó J. jr., Gyórfy B: **Meta-analysis of gene expression profiles associated with histological classification and survival in 829 ovarian cancer samples. *Int J Cancer*.2011,** közlésre elfogadva. **IF: 4,926**
2. Tegze B, Tulassay Z, Gyórfy B: **Chemotherapy agents, response rates and mechanisms of resistance in the therapy of the colorectal carcinoma. *Magy Onkol*. 2006;50(4):315-23.**

Összesített impakt faktor:14,168