

XXXII. OTDK Biológia Szekció

**Drog rezisztens sejtek célzott elpusztítása és
„átprogramozása” MDR-szelektív vegyületekkel**

Nagy Veronika

Biológus szak, MSc II.

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar

Biológiai Intézet, Ökológiai Tanszék

Magyar Tudományos Akadémia, Enzimológiai Intézet

Membrán Fehérje Lendület Kutatócsoport

Témavezető: Dr. Szakács Gergely, M.D, Ph.D., Tudományos főmunkatárs

és Füredi András, Ph.D. hallgató,

MTA, EI, Membrán Fehérje Lendület Kutatócsoport

Belső konzulens: Szabó Krisztián, biológus

SzIE, Állatorvos-tudományi kar, Biológiai Intézet

Ökológiai Tanszék

Budapest

2015

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	2
2. BEVEZETÉS.....	3
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	8
4. ANYAG ÉS MÓDSZEREK.....	9
4.1. Sejtmodellek, sejttenyésztés.....	9
4.2. Alkalmazott vegyületek.....	9
4.3. Sejtek kezelése vegyületekkel.....	10
4.4. Citotoxicitási esszé.....	10
4.5. Calcein esszé.....	10
4.6. Immunfestés.....	11
4.7 RNS izolálás, átírás cDNS-sé, real time PCR analízis.....	12
5. EREDMÉNYEK.....	13
5.1. A P-glycoprotein az MDR fő mechanizmusa a MES-SA/Dx5 sejtekben. Fenotípus (MDR és kollaterális szenzitivitás) igazolása MES-SA/Dx5 sejteken.....	13
5.2. Az MDR-szelektív vegyületek hatására a rezisztens sejtek elveszítik Pgp expressziójukat.....	15
5.3. Az MDR-szelektív vegyületekkel kezelt sejtek szelekciója doxorubicinnel.....	18
5.4. Az MDR-szelektív vegyületek által kiváltott fenotípus váltás epigenetikai gátlószerekkel befolyásolható.....	19
6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....	21
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	25
8. SUMMARY.....	26
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	27
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	30
11. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS.....	31

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC	ATP-binding cassette
BSA	Bovine Serum Albumin= Borjú szérum albumin
Calcein-AM	Calcein-acetoxymethyl ester
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxid
DOX	Doxorubicin
FACS	Fluorescens Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum= újszülött borjúsavó
IC50	Megmutatja, hogy adott vegyület mely koncentrációja pusztítja el a sejtek felét.
MDR	Multidrog rezisztencia
MES-SA	Humán uterus sarcoma sejtvonal
MES-SA/Dx5	A MES-SA sejtvonal Pgp expresszáló, multidrog rezisztens párja
Pgp	P-glycoprotein
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid
TQ	Tariquidar
TSA	Tichostatin A

2. Bevezetés

A malignus daganatok kezelésének a mai napig három alapvető eszköze a sebészeti-, a sugár-, és a kemoterápia. A sebészeti eljárással történő kezelés, mely a daganatok végleges eltávolításának legfőbb és leggyakoribb módja, azonban csak akkor jelentheti a gyógyulásra való legjobb esélyt, ha a tumor még nem képezett áttéteket a környező szövetekben, valamint műtéti úton hozzáférhető. A radio- vagy kemoterápiás kezelés a beavatkozás előtt gyakran csökkentheti a tumor méretét, növelve annak hozzáférhetőségét, így a műtét hatékonyságát is [1]. Másrészt a műtéti beavatkozás után sok esetben javasolhatják a radio- vagy kemoterápiát, mivel bizonyítottan csökkenti a tumor kiújulásának lehetőségét, valamint javítja a beteg gyógyulási esélyeit [2]. A sugárterápia alkalmazása akkor a leghatékonyabb, ha a daganat egy jól behatárolható területre korlátozódik, ekkor a nagy energiájú ionizáló sugárzás a tumorsejtek összességének elpusztítását célozza meg [3]. Hipoxia, valamint a megemelkedett áramlásiellenállás azonban a radioterápia elleni rezisztencia kialakulásához vezethet [4]. A kemoterápia a gyorsan és kontrollálatlanul osztódó daganatos sejteket célozza meg citotoxikus szerekkel, amelyek a tumorsejtek különböző, osztódásban résztvevő folyamatait gátolják [5]. A kemoterápiás szerek a szervezet számos más, osztódásban lévő, ép sejtjét is károsíthatják, ezzel különböző mellékhatásokat idézve elő. A kemoterápia máig a legfontosabb kezelési stratégiának számít az előrehaladt, metasztázisos tumoros megbetegedések esetében, valamint olyan kombinált kezelések részeként, melyeknél az áttétek kialakulásának esélyét jelentősen csökkentheti, vagy palliatív kezelésként, amely során a páciens életminőségének javítása a cél. A jelenleg széles körben alkalmazott kemoterápiás szerek között megtalálhatók a különböző alkiláló szerek (ciszplatin, ciklofoszfamid), antraciklinek (doxorubicin, daunorubicin), illetve számos növényi eredetű szer (vinkrisztin) és antimetabolit (metotrexát, trimetoprin) [6]. Ezek a vegyületek különböző hatásmechanizmusokon keresztül a gyorsan osztódó sejtek pusztulásához vezetnek.

Általános klinikai tapasztalat, hogy a kemoterápiás kezelés nem éri el a kívánt célt. A gyógyszerek különböző abszorpciós képessége vagy metabolikus jellemzői [7, 8], valamint a páciensek egyéni különbségei is (metabolizáló enzimek genetikai polimorfizmusainak együttes jelenléte, eltérő sejtfelszíni és intracelluláris receptorok, transzporterek) növelik a terápiás szerek hatásának kiszámíthatatlanságát. Ezek az egyéni különbségek okozzák a terápiás ablak (vérplazmában a drogkoncentráció tartomány, ami megfelelő terápiás választ vált ki) viszonylagos szűk mivoltát is, így a terápiás szerek hatásos koncentrációja nehezen

behatárolható, a túl magas dózis elérheti a betegre káros szintet, míg az alacsonyabb dózis nem éri el a kívánt tumorelles hatást [6]. A kemoterápia hatékonyságát ronthatja a tumor lokalizációja is, ha a gyógyszerek számára nehezen hozzáférhető helyen van; de védhetik a daganatot olyan körülmények is, mint a tumorsejteket övező szövetekben megnövekedett hidrosztatikai nyomás [4, 9, 10]. Egyes tumor típusok érzékenysége is eltérő az egyes kemoterápiás szerekre. Mivel ezek a vegyületek a gyorsan osztódó sejtekre fejtenek ki nagymértékű toxikus hatást, így az olyan gyorsan növő tumoroknál vethetőek be a leghatékonyabban, mint a leukémiák és az agresszív hematológiai neopláziák [5]. Idővel a kezelések gyakran hatástalanná válnak, a sejtek rezisztenciát mutatnak nem csupán az alkalmazott vegyületre, hanem már több, különböző szerkezetű és hatásmechanizmusú ágensre is. Ezt a jelenséget nevezzük multidrog rezisztenciának (MDR) [11]. A malignus daganatok kemoterápiás kezelésének gyakori sikertelenségét első sorban a terápiás szerekre mutatott MDR gyors megjelenése okozza. A folyamatot ugyan le lehet lassítani, amit mi sem mutat jobban, mint hogy a modern klinikai onkológia több, eltérő szerkezetű, különböző hatásmechanizmussal bíró gyógyszer szekvenciális, vagyis egymást követő használatát javallja a protokolljaiban, hogy késleltessék az MDR megjelenését, azonban a keresztrezisztenciát kiküszöbölni ezzel a módszerrel sem lehet.

A tumorelles drogokkal szemben megjelenő sejtes rezisztenciát kialakító mechanizmusok közül az egyes ATP-kötő membránfehérje (ABC) családba tartozó transzporterek (P-glycoprotein, ABCG2, ABCC1) megnövekedett expressziója a leginkább ismert. Ezek az evolúciósan konzervatív proteinek, számos anyag (lipidek, aminosavak, peptidek, szerves ionok, toxinok) szállítását végzik a sejtek membránjából az extracelluláris térbe ATP hidrolízis segítségével. Jelentőségükről árulkodik az is, hogy előfordulásuk egészen a prokariótáktól az emlősökig jellemző [12]. Az emberi genomban 48 gén kódol ABC transzportert, ezek szekvenciahasonlóságuk alapján hét alcsaládba sorolhatók, A-tól G-ig. Fő szerepük a méregtelenítésben, valamint a testidegen anyagok elleni védelemben van, gátat szabva számtalan ágens membránon való átjutásának, így érthető a nagyfokú expressziójuk a fontos szöveti barrierekből (vér-agy gát, kefeszegély, epeutak, placenta, vér-here gát stb.). A rezisztencia kialakításában résztvevő ABC transzporterek számos vegyületet ismernek fel szubsztátjukként a természetes anyagoktól a kemoterápiás szerekg. Ezek a sejt felszíni proteinek a felismert vegyületeket az extracelluláris térbe szállítják mielőtt még azok a citoplazmába juthatnának [7, 12]. Jelenleg 12 ABC transzporterről ismert, hogy efflux-transzporterként működve csökkentik a terápiás szereket

sejtbe jutását, ezáltal azokat a tumorsejtekre toxikus szint alatt tartva, így szerepet vállalva a sejtes rezisztencia kialakításában [8, 12].

A multidrog rezisztencia kialakításában résztvevő transzporterek közül (ABCB1, ABCC1, ABCG2) jelentőségében kiemelkedik az ABCB alcsalád egyik tagja, a P-glycoprotein (Pgp, ABCB1, MDR1) transzporter, hiszen számtalan vegyületet ismer fel szubsztátjaként, köztük megannyi kemoterápiás vegyületet [12] [13], ezzel biztosítva a legerősebb, legáltalánosabb rezisztenciát az ABC transzporterek közül a legtöbb, klinikumban alkalmazott szer ellen [7]. A kezelést követően a Pgp transzporter nagymértékű expressziója tapasztalható a tumorsejteken. Akut non-limfocitás leukémiával (ANLL) diagnosztizált betegeknél állapították meg a Pgp expresszió mértéke és a kemoterápia hatékonyságának összefüggését, és emelték ki a Pgp-t, mint prognosztikai faktort: a kezelés hatására történő tumor sejtszám csökkenés mértéke összefüggött a Pgp expresszióval. Azoknál a betegeknél, akiknél a tumorsejteken nagyfokú Pgp expressziót mértek, a kemoterápia nem bizonyult hatákonynak [14].

A Pgp expresszió számos humán daganat esetében megfigyelhető, beleértve gasztrointesztinális daganatokat, a vérképző rendszer tumoros megbetegedéseit, vese-, méh-, here- és tüdőrákot [11]. Megoldásként merült fel különböző Pgp-inhibitorok alkalmazása a citotoxikumokkal kombinációban. Az inhibitorok meggátolják a terápiás gyógyszerek Pgp általi effluxát [8], vagyis az MDR-t, ezáltal növelve a terápia hatékonyságát [7]. Az *in vitro* kísérletek során alkalmazott gátlók drámaian megnövelték a rezisztens sejtek drogérzékenységét és a további eredmények is kecsegtetőek voltak. *In vitro* és *in vivo* P388/VCR vinkrisztin rezisztens sejtek gyógyszer érzékenységét állították helyre verapamillal, amely hatékonyan gátolta a vinkrisztin-effluxot, elősegítve annak felhalmozódását a sejtekben [15]. Ennek ellenére az inhibitorok csak *in vitro* bizonyultak hatékony megoldásnak, klinikai alkalmazásuk során számtalan szövődmény lépett fel. A legtöbb gátlószer esetében felmerült az a súlyos probléma, hogy interakcióba léptek a fiziológiai barrierek felszínén (vér-agy gát, vér-here gát, bélnyálkahártya sejtjei) expresszáldó P-glikoprotein transzporterekkel megakadályozva a xenobiotikumok kiürülését a szervezetből, ami súlyos mellékhatások kialakulásához vezetett. Több évtizednyi gyógyszertervezés után egyik gátlószer sem hozta meg a várt sikert. [7]. A multidrog rezisztencia problémájának megoldására újabb stratégiákat kellett keresni.

Egy ígéretes, új megoldásként tűnt fel a váratlan felfedezés, mely szerint a Pgp-transzporter általi rezisztencia egyben bizonyos vegyületek elleni hiperszenzitivitást is eredményez, tehát a multidrog transzporter jelenléte a sejteken nem megakadályozza bizonyos vegyületek bejutását a sejtekbe, hanem éppen ellenkezőleg, növeli azok toxikus hatását [16] [13]. A jelenség hasonló a baktériumoknál megfigyelthez, ahol a mutációk folyamatos felhalmozódása antibiotikum kezelés hatására egyúttal megnövelheti az egyéb antibiotikumokra mutatott érzékenységet. Ezt a jelenséget hívjuk kollaterális szenzitivitásnak [17]. A kollaterális szenzitivitás csak olyan antibiotikum-párok esetében figyelhető meg, amelyek különböző sejtes mechanizmusokat támadnak. A rezisztencia és a hiperszenzitivitás kialakulásának megértése kiemelkedő jelenséggel bír a terápiás stratégiák tervezésében [18].

Egy tanulmányban az expressziós szint és a drogérzékenység szoros kapcsolatát jellemezték 60 különböző humán tumorból létrehozott sejtvonalon (NCI60), bizonyítva az ABC transzporterek kiemelt szerepét a multidrog rezisztenciában. A Pgp-transzporter a vegyületek sejtől történő kipumpálását végzi, így feltételezhető volt, hogy a transzporter magasabb fokú expressziója a sejt nagyobb mértékű rezisztenciájával társul. Ezt mutatta az első körben vizsgált vegyületek nagy része is, azonban két vegyületnél az összefüggés fordítottnak mutatkozott, a transzporter expresszió mértéke pozitívan korrelált a vegyület aktivitásával, azaz ezek a vegyületek toxikusabbnak bizonyultak a rezisztens, Pgp-transzportert nagymértékben expresszáló sejtekre, mint a kemoterápiás drogokra szenzitív, Pgp-mentes sejtvonalakra [16].

Egy másik tanulmányban a kollaterális szenzitivitás és a Pgp expresszió mértékét vizsgálták, és megállapították, hogy a magas rezisztencia fokú sejtek mutatják a legnagyobb szintű kollaterális szenzitivitást, tehát a kollaterális szenzitivitás mértéke összefüggött a Pgp expressziós szinttel [19].

Ezeket az új, ígéretes, máig ismeretlen mechanizmussal működő Pgp-mediált MDR sejteket célzó terápiás szereket MDR-szelektív vegyületeknek nevezték el. Az első ízben felfedezett MDR-szelektív vegyület egy NSC73306 nevű tioszemikarbazon molekula volt. Működése egyértelműen a Pgp-transzporter jelenlétéhez köthető, azok a sejtek, amelyek magas Pgp expressziót mutattak, hiperszenzitívnek bizonyultak a tioszemikarbazon NSC73306 vegyületre. A funkcióképes Pgp meglétének szükségét bizonyította az is, hogy a transzporter gátlása, valamint az expresszió siRNS-ekkel történő csendesítése megszüntette a vegyületre mutatott érzékenységet [19]. Tehát az NSC73306 nem Pgp-inhibitor, viszont biokémiai

vizsgálatok alapján nem is szubsztrátja a Pgp-nek [19] [13]. Tehát az NSC73306 Pgp-expresszáló sejtekre mutatott megnövekedett toxicitása, habár Pgp-specifikus, mégsem abból adódik, hogy szubsztrátja a transzporternek [20].

A későbbi vizsgálatok során további Pgp-szubsztrát, és nem szubsztrát MDR-szelektív aktivitással rendelkező vegyületek azonosítására került sor. Habár a vegyületek eltérő kémiai szerkezettel rendelkeznek (tioszemikarbazonok, fenantrolin és 8-hydroxi-quinolin típusú vegyületek), valószínűleg a mechanizmus mégis egy közös motívumhoz köthető, ugyanis a Pgp-expresszáló sejtek iránt megnövekedett toxicitást mutató vegyületekben gyakran megfigyelhető a fémkelátion jelenléte [13].

Az NSC73306 vegyület által okozott Pgp-mediált hiperszenzitivitás jelenségének vizsgálata során létre kívántak hozni egy olyan sejtvonalat, amely rezisztens az NSC73306 MDR-szelektív vegyületre. 3 hetes NSC73306 szelekciót követően a sejtek rezisztenssé váltak a NSC73306 vegyületre, úgy hogy Pgp expressziójuk nagyságrendekkel csökkent és ezzel együtt MDR-fenotípusuk is megszűnt. Az NSC73306 vegyületre rezisztens sejtvonal doxorubicinre, egy hagyományos kemoterápiás szerre újbóli szenzitivitást mutatott. Ezt a Pgp expressziójának és funkciójának megszűnése magyarázza. A jelenség több, különböző sejtvonalon is megfigyelhető volt [19].

A rezisztens populációk kialakulását általában a rezisztens mutáns tumorsejtek szelekciójával magyarázzák [21]. E szerint a feltételezés szerint a kezelést követően rövid időn belül megjelenő MDR a rezisztenciát biztosító genetikai variánsok szelekciós előnyéből származtatható [21, 22]. Egy másik elképzelés szerint a fenotípusos heterogenitás dinamikus szabályozás alatt áll, azaz a drogkezelésre rezisztens fenotípus átmeneti [23] [24]. Megfigyelhető, hogy az *in vitro* szelektált tumorsejtek drogmentes tenyésztő médiumban történő tenyésztés során többnyire elvesztik rezisztenciájukat, ami arra enged következtetni, hogy a rezisztencia kialakulásához és megszűnéséhez nem feltétlenül szükségesek a stabil, öröklődő genetikai változások. Epigenetikai folyamatok tanulmányozása is igazolja, hogy a klasszikus genetikai dogmák önmagukban nem magyarázzák a tumorsejt populációk fenotípusos heterogenitását [25] [26] [24]. A mutációhoz nem köthető mechanizmusok tehát fontos szerepet tölthetnek be a rezisztencia kialakításában [23] [27].

3. Célkitűzések

Kísérleteink céljaul a multidrog rezisztens fenotípus kialakulása és megszűnése mögött álló mechanizmus vizsgálátát tűztük ki. A következőket vizsgáltuk:

- A különböző in vitro kezelési stratégiák hogyan befolyásolják a Pgp-vesztés dinamikáját, hogyan változik a Pgp funkció és expresszió.
- Az MDR-szelektív vegyületekkel kezelt sejtek szelekciója doxorubicinnel.
- Epigenetikai szabályozás szerepe a tumorsejtek multidrog fenotípusának kialakulásában és megszűnésében, vagyis a fenotípus váltásban.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Sejtmodellek, sejtenyésztés

Kísérleteinkben a MES-SA humán uterus sarcoma sejtvonalat, valamint annak doxorubicin szelektált (folyamatos doxorubicin kezeléssel Pgp-expresszállóvá, multidrog rezisztenssé vált), Pgp-expresszálló, multidrog rezisztens párját (MES-SA/Dx5) vizsgáltuk. A sejteket szövettenyésztő edényben, 37°C-on, 5%-os CO₂- és 100%-os páratartalom mellett, DMEM-ben (Dulbecco's Modified Eagle Medium) tenyésztettük, amelyet kiegészítettünk 10% FBS-sel (újszülött borjúsavó), 5mmol/l glutaminnal és 50 unit/ml penicillinnel és sztreptomocinnel.

4.2. Alkalmazott vegyületek

BB090 és SZ1079 MDR-szelektív vegyületeket (az MTA TTK EI Membrán Fehérje Lendület munkacsoport által szintetizált vegyületek) DMSO-ban (dimethyl sulfoxid) oldva különböző hígításokban használtunk fel.

Kísérleteink során egy klinikumban alkalmazott kemoterápiás szer, a doxorubicin (Sigma-Aldrich) hatását vizsgáltuk. A doxorubicin egy antraciklin típusú topoizomeráz gátló vegyület, ami a sejtbe jutva interakcióba lép a DNS-sel, és megakadályozza a DNS és RNS szintézist, így kifejtve citotoxikus hatását.

A Pgp-transzporterek specifikus gátlásához Tariquidart (XR-9576, Dr. Susan Bates, NCI, NIH ajándéka) és verapamilt (Sigma-Aldrich) használtunk.

Az epigenetikai vizsgálatok során hét, különböző mechanizmust célzó epigenetikai gátlószert alkalmaztunk. A hiszton acetyl-transzferáz gátlók közül Anacardic acidot; a hiszton demetiláz gátló vegyületek közül daminozidot, IOX1-t és JIB04-t; hiszton metiltranszferáz inhibitoroként 3-deazaneplanocint; míg a hiszton deacetyláz inhibitorok közül SAHA-t (suberoylanilide hydroxamic acid) és TSA-t (Trichostatin A) használtunk. Az epigenetikai gátlószereket a Tocris Bioscience-től szereztük be.

A Calcein esszé során a fluoreszcencia méréshez Calcein-AM (Calcein-acetoxymethyl ester, Life Technologies) vegyületet használtunk.

4.3. Sejtek kezelése vegyületekkel

A szelekciós kísérletek során a BB090 különböző koncentrációkban került a sejtekre, közel 10%-os konfluenciánál (a tenyésztőedényben rendelkezésre álló felület 10%-át fedik élő sejtek). A tenyésztőmedium cseréje minden ötödik nap történt, szelektáló drogot nem tartalmazó médiummal.

A kombinált kezelések során a BB090 IC80 koncentrációban, míg az adott epigenetikai gátlószer szubtoxikus koncentrációban került a sejtekre.

4.4. Citotoxicitási esszé

A vegyületek IC₅₀ értékét (adott vegyület mely koncentrációja pusztítja el a sejtek felét) citotoxicitási PrestoBlue (PB) esszével határoztuk meg. 96 lyukú lemezen tenyésztettük a sejteket, lyukanként 5000 sejtet tartottunk 100µl DMEM-ben, 37°C-on, 5%-os CO₂ és 100% páratartalom mellett. 24 óra elteltével az adott drogból hígítási sort készítettünk, és ennek megfelelően kezeltük a sejteket 9 különböző koncentrációval hat ismételtsben. 120 órás inkubálás után eltávolítottuk a médiumot, majd 100µl PBS-ben 5%-os PrestoBlue oldatot mértünk a sejtekre és 1,5 óra inkubálás után a festéket 560nm-es gerjesztés mellett 590nm-en olvastuk le egy Perkin Elmer Enspire monokromátoros mikrolemez olvasón (Perkin Elmer). A PB vegyület a sejtekbe jutva erősen fluoreszcens molekulává redukálódik, ha a sejt intakt és képes a metabolizmusra, így lehetővé válik a sejtpopuláció viabilitásának meghatározása. A sejteken mért IC₅₀ értékeket GraphPad Prism 5.0 szoftverrel határoztuk meg.

4.5. Calcein-esszé

A Calcein esszé során a sejtek Pgp-funkcióját állapítjuk meg fluoreszcencia alapján. A Calcein-AM csupán a Pgp-vel nem rendelkező sejtekbe tud bejutni, átalakulni és felhalmozódni, mivel a Pgp a hidrofób acetoxi metilészter formát felismeri és kipumpálja a sejtekből. A sejtekben a Calcein-AM-et észterázok hasítják, ennek hatására zölden fluoreszkáló szabad Calceinné alakul, a fluoreszcencia intenzitását áramlási citometriával mérjük. A Pgp-aktivitásra a fluoreszcencia mértékéből lehet következtetni: aktív transzporter jelenléte esetén alacsony fluoreszcencia mérhető, míg a Pgp-funkció specifikus gátlása esetén, vagy az expresszió hiányában magas intenzitású Calcein jelet detektálhatunk.

Minden mérés során $2,5 \cdot 10^5$ sejt kerül 100µl mennyiségű tápoldatot tartalmazó FACS-csőbe. Mintánként 3 FACS-csövet készítünk elő, mivel a Calcein-mérésen kívül két kontroll

mérést is végzünk: az egyiket verapamillal (Sigma-Aldrich), a Pgp specifikus gátlószerével, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a Calcein akkumulációjának hiánya valóban a Pgp aktivitásból adódik. A másik csőbe csak oldószert teszünk (DMSO), hogy a sejtek jelölés nélküli autofluoreszcenciáját is rögzíthessük.

A mintákat 15 percig 37 °C-os vízfürdőben előinkubáltuk, majd hozzáadtuk az első csőhöz a DMSO-t, 15 másodperc elteltével a másik csőhöz az 50µl 100µM-os végkoncentrációjú verapamil oldatot, majd ebbe a két csőbe 15 másodperces eltérésekkel hozzámértük a Calcein-AM oldatot, melynek végkoncentrációja 250nM volt. Ezután 10 percig 37 °C-os vízfürdőben inkubáltuk a sejteket, majd azonos sorrendben 1ml HPMI hozzáadásával állítottuk le a reakciót. A Centrifugálást követően a felülúszót leöntöttük a sejtekről, majd felszuszpendáltuk a sejteket 300µl PBS-ben. A mérésig jégben tartottuk a sejteket. A mérés előtt közvetlenül 0,8µl, 1µM végkoncentrációjú Topro3 oldatot mértünk a sejtekre. A fluoreszcencia intenzitást egy Fluorescens Activated Cell Sorting (FACS) Canto áramlási citométerrel (Becton-Dickinson) határoztuk meg, a Topro3-at az FL4, a Calceint az FL1 csatornán.

4.6. Immunfestés

Lyukanként tíz ezer sejtet helyeztünk 400µl tenyésztő médiumban 8 lyukú, üveg aljú kamrába, majd a sejteket 48 óráig inkubáltuk 37°C-on. A médium eltávolítása és DPBS-sel történő mosás után a sejteket 4%-os PFA-val fixáltuk 15 percig szobahőmérsékleten. Újabb DPBS-es mosás után a sejteket 0,5%-os BSA-t tartalmazó PBS és 0,1% TritonX-100 keverékével inkubáltuk 24 órán át. Az oldat eltávolítása után az elsődleges ellenanyag, MRK16 monoklonális antitest (Kamiya Biomedical Company) került a sejtekre, ami a Pgp fehérje egy extracelluláris epitopját ismeri fel. Az elsődleges antitestek 1:250 hígításban kerültek a sejtekre.

Egy óra szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a másodlagos ellenanyag, GAM (Goat-antimouse)-PE IgG2a antitest (Life Technologies) került a sejtekre 1:250 hígításban. Egy óra szobahőmérsékleten, sötétben történő inkubálás után a sejtmagot 1:10000 hígítású DAPI-val (Life Technologies) festettük.

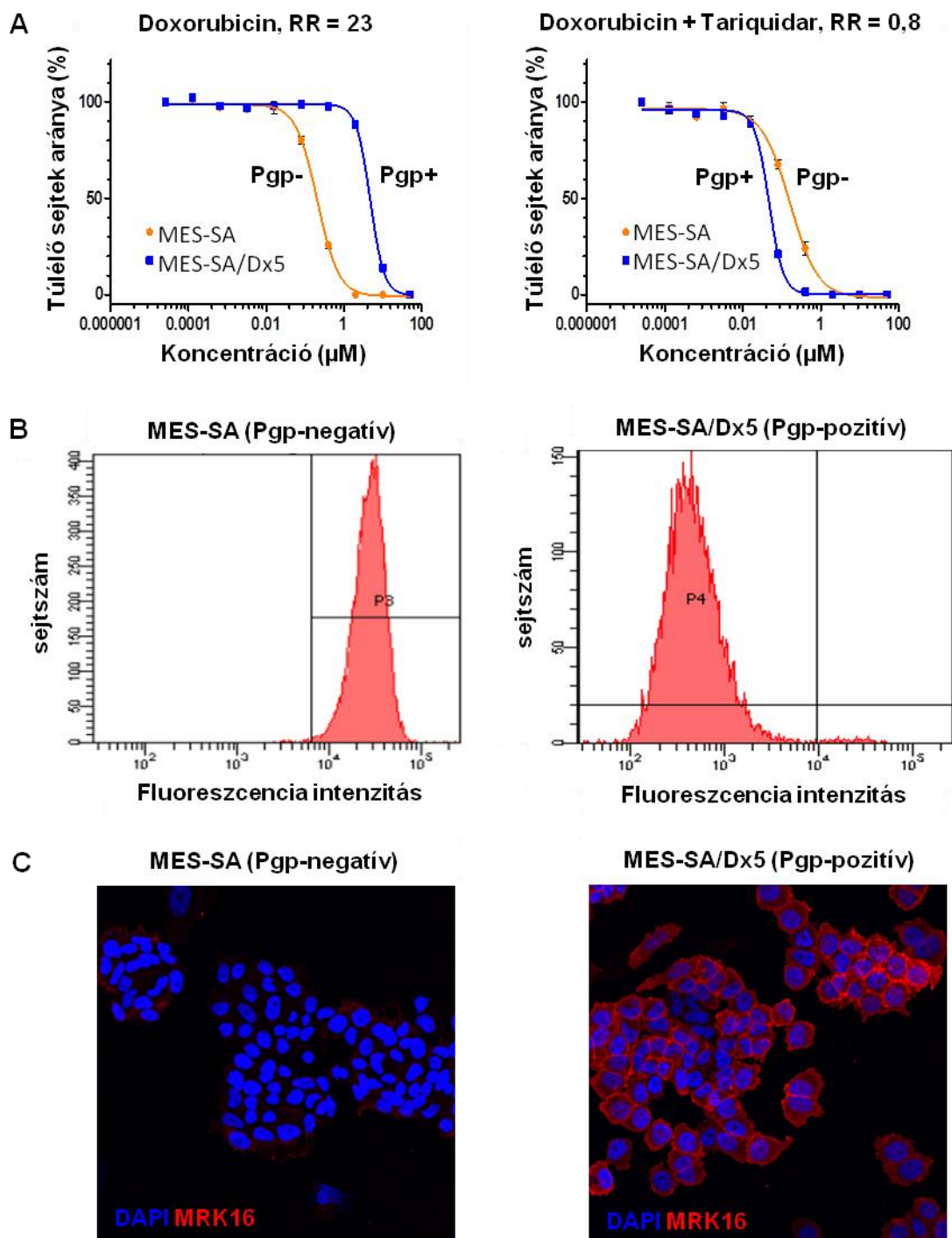
4.7. RNS izolálás, átírás cDNS-sé, real time PCR analízis

2-4*10⁶/ml sejtet TriFast (PeqLab) oldatban vettük fel. Az RNS-t a Zymo Research Direct-zol™ RNA MiniPrep kittel izoláltuk a gyártói protokoll szerint. Az mRNS cDNS-sé való átírása a Promega Reverse Transcriptase segítségével történt. A kívánt szakaszokat PCR-rel, TaqMan® esszé alkalmazásával amplifikáltuk.

5. Eredmények

5.1. A P-glycoprotein az MDR fő mechanizmusa a MES-SA/Dx5 sejtekben. Fenotípus (MDR és kollaterális szenzitivitás) igazolása MES-SA/Dx5 sejteken.

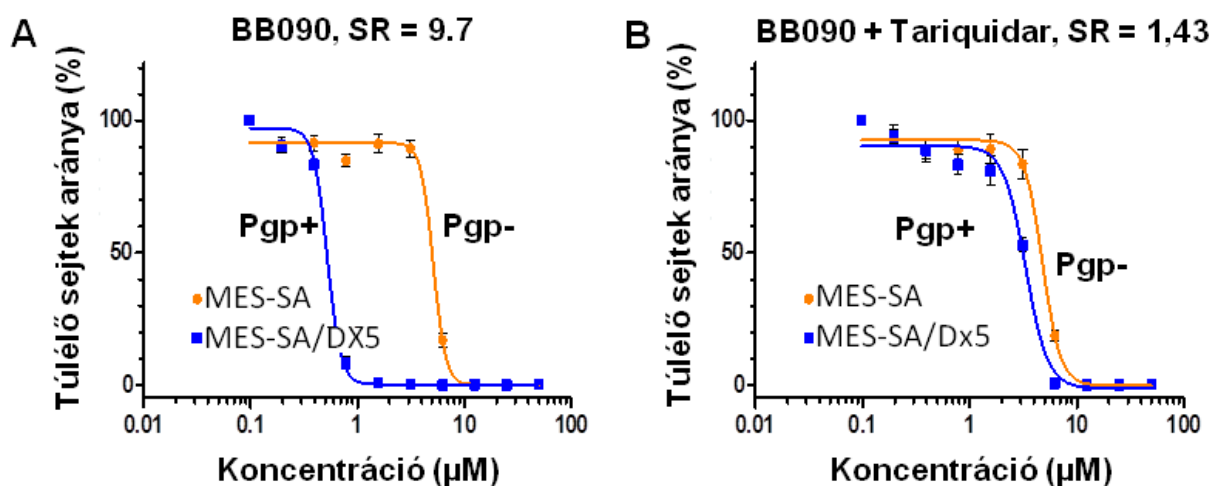
Ahhoz, hogy ellenőrizzük, hogy a kísérleteinkben használt sejtek valóban multidrog rezisztensek-e, doxorubicinnel (DOX) szembeni érzékenységüket citotoxicitási esszével határoztuk meg (1. ábra, A panel). Ahhoz, hogy biztosak legyünk benne, hogy a hatás eléréséhez szükség van funkcióképes transzporterre, a citotoxicitási esszét tariquidar (TQ) jelenlétében is elvégeztük, mely specifikusan gátolja a Pgp-t. A MES-SA sejtvonal doxorubinre vonatkoztatott érzékenysége ($IC_{50} = 0,25\mu M$) kb. 25-ször alacsonyabb, mint a Dx5 sejteké ($IC_{50} = 5,4\mu M$). A két sejtvonal közti különbség TQ jelenlétében eltűnik, ami bizonyítja, hogy a rezisztencia kialakításához szükség van funkcióképes Pgp-re. A funkcionális Pgp jelenlétét Dx5 sejteken Calcein esszével és MRK16 antitest is igazoltuk (1. ábra, B és C panelek). A funkcionális és immunfestési esszék egyértelműen igazolják, hogy a MES-SA nem fejezi ki a Pgp fehérjét, míg a Dx5 sejtek magas Pgp expressziót és funkciót mutatnak.



1. ábra A P-glycoprotein az MDR fő mechanizmusa a MES-SA/Dx5 sejtekben. **(A)** A két sejtvonal doxorubicinnel szembeni érzékenysége tariquidar nélkül $RR = 23$ (bal oldali panel), illetve a tariquidar jelenlétében (jobb oldali panel) $RR = 0,8$. **(B)** Pgp-funkció vizsgálata Calcein esszével. **(C)** Pgp expresszió vizsgálata immunfestéssel.

A magas Pgp expresszió, ami hagyományos esetben a rezisztens sejtek túlélését biztosítja, az MDR-szelektív vegyületek ellen Achilles-saroknak tekinthető. A BB090 MDR-szelektív vegyület már kis koncentráció ($IC_{50} = 0,52 \mu\text{M}$) is erősen toxikusnak bizonyult a Pgp

transzportert expresszáló MES-SA/Dx5 sejtekre, ezzel szemben a MES-SA sejtek csak közel tízszer nagyobb koncentráció ($IC_{50} = 5,1\mu M$) mellett pusztultak el (2. ábra, A panel). Pgp funkció gátlásával az MDR-szelektív vegyületek hatása is megszüntethető (2. ábra, B panel) [13, 19].



2. ábra Fenotípus (MDR és kollaterális szenzitivitás) igazolása MES-SA/Dx5 sejteken. **(A)** A két sejtvonal BB090 vegyülettel szembeni érzékenysége tariquidar nélkül $RR = 9,7$. **(B)** A két sejtvonal BB090 vegyülettel szembeni érzékenysége tariquidar jelenlétében $RR = 1,43$.

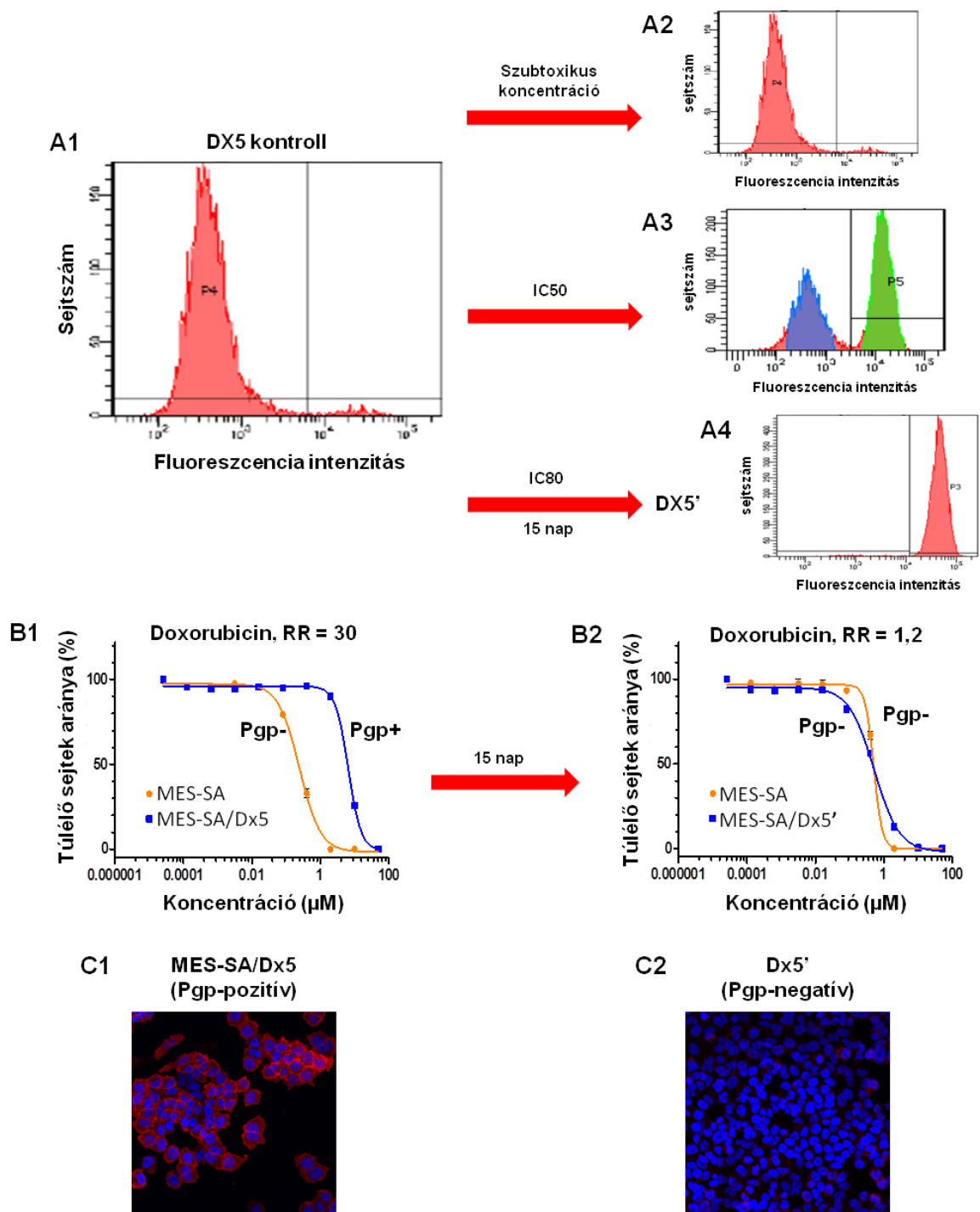
5.2. Az MDR-szelektív vegyületek hatására a rezisztens sejtek elveszítik Pgp expressziójukat.

Mivel egyik tanulmányukban Ludwig és kollégái olyan sejtvonalakat mutatnak be [19], melyek folyamatos MDR-szelektív vegyületekkel történő kezelés hatására 3 hét alatt elveszítik Pgp expressziójukat és újra szenzitívvé válnak a konvencionális kemoterápiás kezelésekre, szerettük volna megvizsgálni, hogy a különböző *in vitro* kezelési stratégiák hogyan befolyásolják a Pgp-vesztés dinamikáját. Ehhez a multidrog rezisztens MES-SA/Dx5 sejtvonalat 3 különböző protokoll szerint kezeltük BB090 MDR-szelektív vegyülettel és meghatározott időpontokban Calcein esszével vizsgáltuk a P-glycoprotein funkcióját a sejtekben. Az első esetben a sejteket szubtoxikus (olyan koncentráció, amely nem vagy csak kismértékben eredményez sejthalált), a másodikban IC_{50} (a populáció 50%-a elpusztul a kezeléstől), míg a harmadikban IC_{80} koncentrációval (a sejtek 80%-a pusztul el) kezeltük 5 napig, majd médiumot cseréltünk és a sejtek Pgp expresszióját, illetve funkcióját 80%-os

konfluenciánál megmértük (3. ábra, A panelek). A kezdeti szelekciót követően az MDR-szelektív vegyület (BB090) nem volt jelen a médiumban.

A szubtoxikus koncentrációval való kezelés mellett a Dx5 sejtek változatlan sebességgel osztódtak (a 80%-os konfluenciát ugyan annyi idő alatt érték el, mint a kontroll sejtek); Pgp expressziójuk változatlan maradt (3. ábra, A2. panel). A sejteket IC50 koncentrációval kezelve egy heterogén, Pgp-pozitív és -negatív sejteket egyaránt tartalmazó stabil (a megfigyelés egy hónapja alatt) populációt figyeltünk meg (3. ábra, A3. panel). A heterogén populáció drogmentes környezetben is stabilan fennmaradt. Magas MDR-szelektív koncentráció (IC80) mellett a MES-SA/Dx5 sejtvonal osztódása jelentősen lelassult, a sejtek a 80%-os konfluenciát 4 nap helyett 16 nap alatt érték el. A kezelést túlélő sejteken a Pgp nem volt kimutatható (3. ábra, C1. és C2. panel). Az így létrejött Pgp-mentes Dx5 sejtvonalat Dx5'-nek neveztük el. Az MDR-szelektív vegyület hatására létrejött Pgp-mentes populáció stabilan, 40 passzázs (~6 hónap) után is fennmaradt. A Dx5' sejtvonal doxorubicinnel szemben érzékennyé vált (3. ábra, B. panelek). Az érzékenység mértéke megegyezett a MES-SA sejtvonalával (3. ábra, B2. panel).

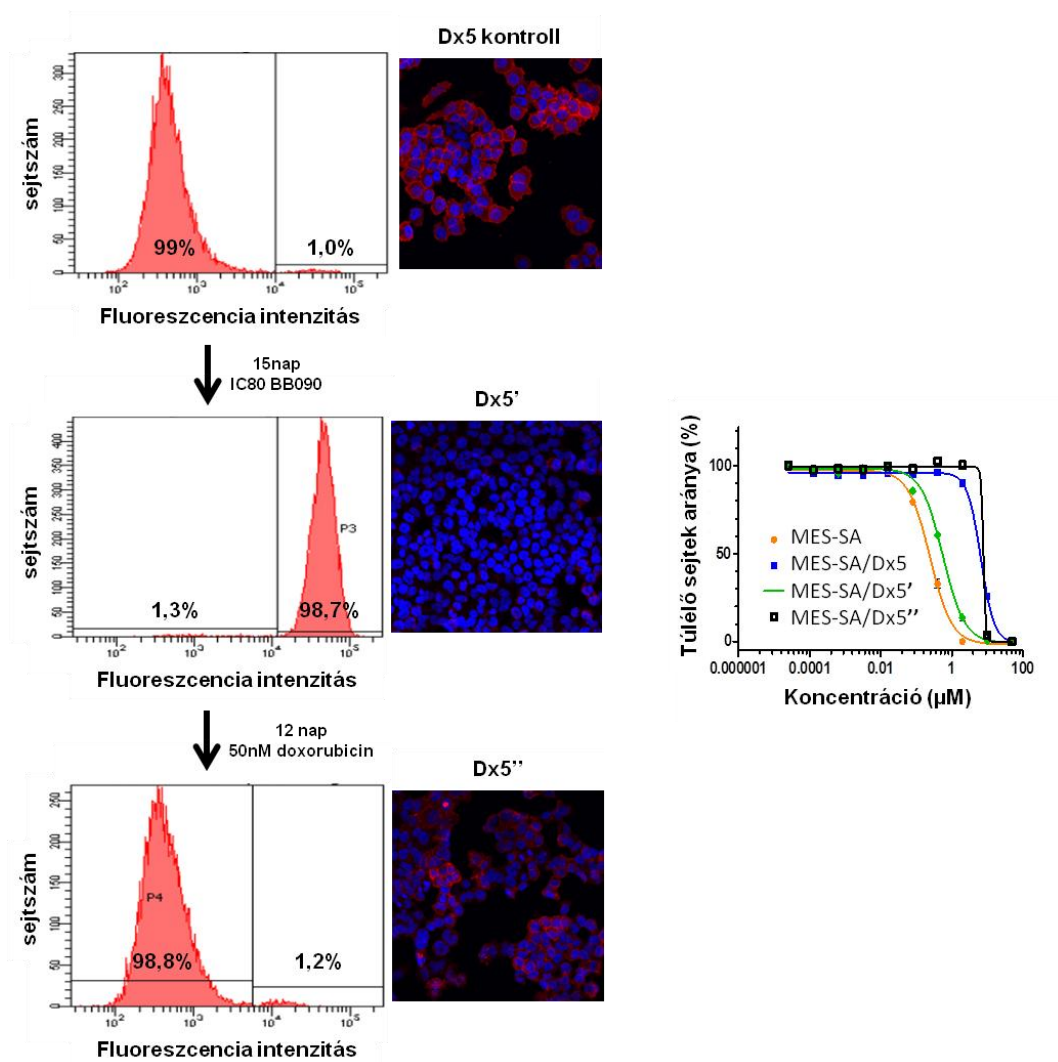
Az MDR szelektív vegyületek által indukált fenotípus váltást más sejtvonalon is tapasztaltuk. A HCT15 humán vastagbél daganatból származó Pgp-t expresszáló sejtekből létrehozott multidrog rezisztens sejtvonal a kutatócsoport laboratóriumában MDR-szelektív vegyület hatására már egyetlen kezelés (IC80) hatására stabil Pgp-mentes populációt eredményezett (Kanta Eszter, OTDK 2012.).



3. ábra Az MDR-szelektív vegyületek hatására a rezisztens sejtek elveszítik Pgp expressziójukat. **(A)** BB090 vegyülettel történő kezelés különböző kezelési stratégiák mellett. **(B1)** A két sejtvonal drogérzékenysége hagyományos kemoterápiás vegyületre (doxorubicin). **(B2)** A Dx5 sejtvonal doxorubicin-érzékenysége BB090 vegyülettel történő kezelés után. **(C1-C2)** A MES-SA/Dx5 és Dx5' sejtvonalak Pgp expressziójának vizsgálata immunfestési eljárással.

5.3. Az MDR-szelektív vegyületekkel kezelt sejtek szelekciója doxorubicinnel

Ugyan a Dx5' sejtvonal érzékenyvé vált a doxorubicinre (3. ábra, B2. panel), de kíváncsiak voltunk, hogy miként reagálnak ezek a sejtek egy hosszú távú kemoterápiás kezelésre. A sejtvonalat az MDR-szelektív kísérletek mintájára, 5 napig tartottuk különböző koncentrációjú DOX-ban, majd médiumcserét követően hagytuk a sejteket felnőni és 80%-os konfluenciánál lemértük a Pgp funkciójukat. A vártan megfelelően a magas koncentrációjú kezelések hatására (100, 150, 250 és 500nM) a sejtek napok alatt elpusztultak, azonban meglepő módon az egyszeri, szubtoxikus szintű (IC₂₀= 50nM) DOX kezelés hatására a Dx5' sejtek osztódtak. Az alkalmazott doxorubicin koncentráció mellett felnövő sejtek 100%-osan Pgp expressziót mutattak (Dx5'' sejtvonal, 4. ábra).



4. ábra A BB090 vegyülettel kezelt sejtek szelekciója doxorubicinnel (jobb oldal) és doxorubicin érzékenységük vizsgálata citotoxicitási esszével (bal oldal).

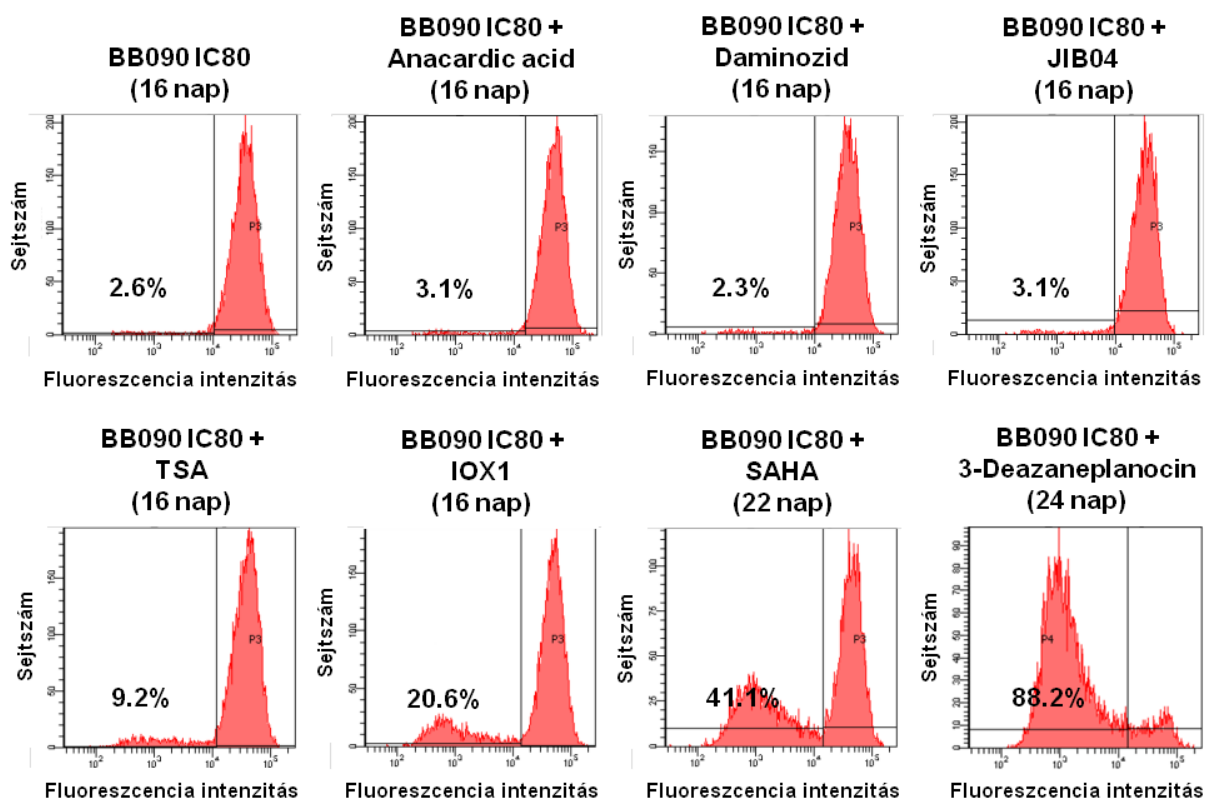
5.4 Az MDR-szelektív vegyületek által kiváltott fenotípus váltás epigenetikai gátlószerekkel befolyásolható.

Ez a gyors és ismételt fenotípus váltás, melynek révén a Pgp-pozitív, rezisztens Dx5 sejtekből egyetlen BB090 kezelés hatására napok alatt Pgp-negatív Dx5' sejtek lesznek, majd a sejtek DOX hatására újra visszanyerik Pgp expressziójukat (Dx5'') felvetette az epigenetikai szabályozás szerepét. Az epigenetikai szabályozás szerepét különböző epigenetikai gátlószerekkel vizsgáltuk. Arra voltunk kíváncsiak vajon befolyásolják-e az epigenetikai gátlószerek a fent ismertetett fenotípus váltást.

A hiszton acetil-transzferáz gátló Anacardic acid, a hiszton demetiláz gátló daminozid és JIB04 vegyületek közül egyik használata esetén sem tapasztaltunk változást, azaz a MES-SA/Dx5 sejtek IC80 koncentrációjú BB090 MDR-szelektív vegyület hatására elvesztették Pgp expressziójukat (5. ábra). Ezzel szemben a hiszton demetiláz gátló IOX1 mellett az IC80 koncentrációjú BB090 kezelés ellenére a 16. napon a sejtek 20,6%-án Pgp expresszió volt kimutatható (5. ábra). Hasonlóképpen, a hiszton deacetiláz inhibitorok, vagyis a SAHA és TSA is befolyásolták a BB090-indukálta fenotípus váltást. A TSA-val és BB090-el egyidejűleg kezelt sejtek 16 nap alatt nőttek fel, a populáció 9,2%-a expresszált Pgp-t, míg a SAHA-val való kombináció esetén 22 nap alatt felnövő populáció 41,1%-ában volt a Pgp expresszió kimutatható.

A hiszton metiltranszferáz gátló 3-deazaneplanocin kombinációban a BB090-el egy olyan populációt eredményezett, amely 24 nap alatt nőtt fel és a populáció 88,2%-a expresszált Pgp-transzportert.

Egy kontroll kísérletben megvizsgáltuk önmagában is az epigenetikai gátlószerek hatását a sejtekre. Az inhibitorokkal kezelt sejtenyészetek azonos idő alatt nőttek fel, mint a kezelésben nem részesülő sejtek. A Calcein-esszé során a MES-SA/Dx5 sejtek Pgp expressziós szintje nem változott, a kontroll, kezelésben nem részesült sejtekével megegyezett.



5. ábra Az MDR-szelektív vegyületek által kiváltott fenotípus váltás epigenetikai gátlószerekkel befolyásolható.

6. Eredmények megvitatása

A tumorellenes drogokkal szemben megjelenő sejtes rezisztenciát kialakító mechanizmusok közül az ABC membránfehérje transzporter családba tartozó Pgp-mediált MDR mechanizmusát vizsgáltuk.

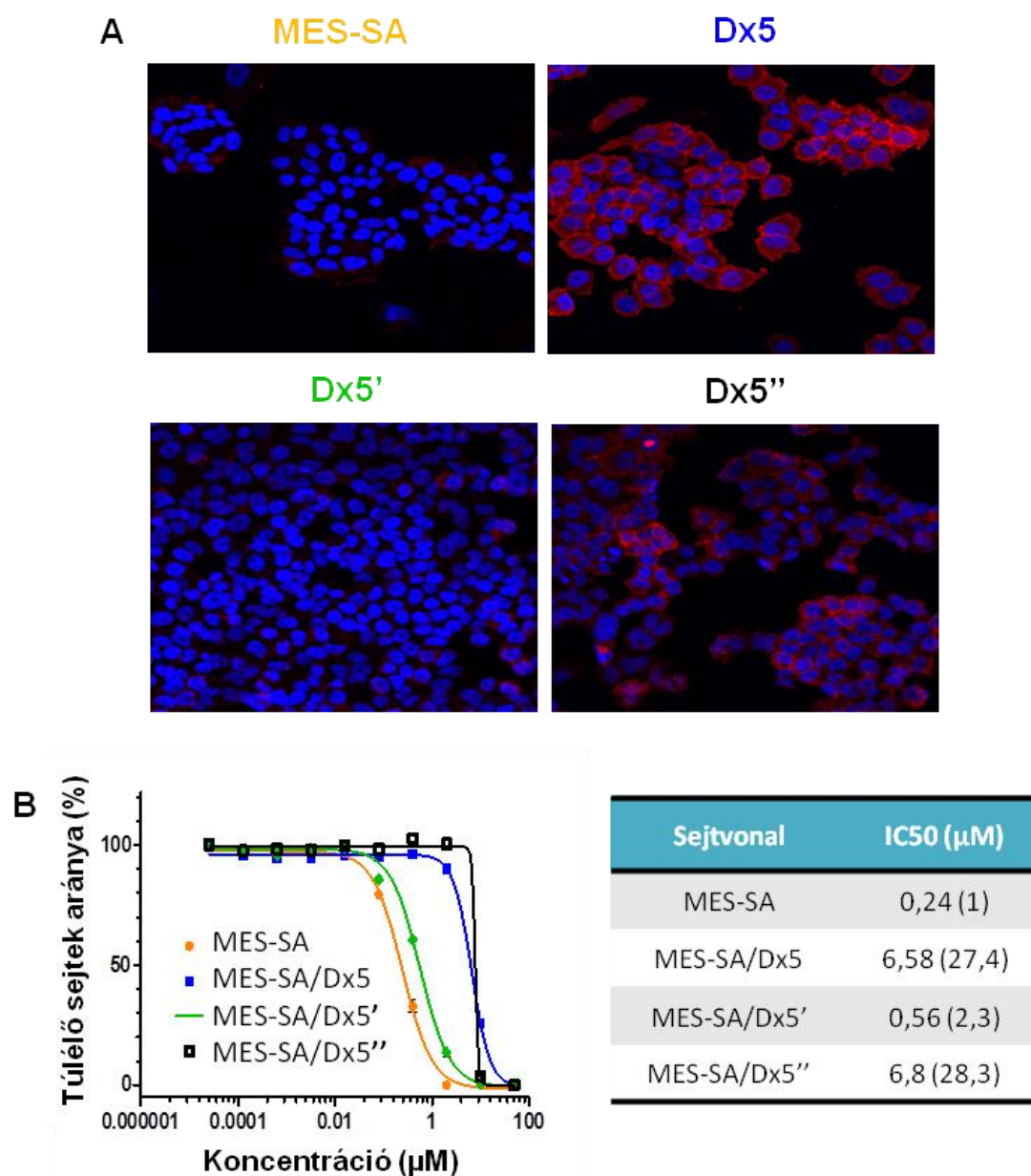
Kísérleteink során igazoltuk, hogy az irodalomban közölteknek megfelelően a hagyományos kemoterápiás szerekre mutatott rezisztencia a P-glycoprotein transzporter jelenlétének függvénye [7, 12-14]. A Pgp-t nagymértékben expresszáló MES-SA/Dx5 sejtvonal a doxorubicinre 30-szor rezisztensebbnek bizonyult a parentális, Pgp-t nem expresszáló MES-SA sejtvonalpárjánál (1. ábra A panel) [19]. A Dx5 sejtek funkcionálisan és fehérje szinten is kifejezik a Pgp-t, hiszen mind a Calcein esszé, mind az MRK16 immunfestés (1. ábra B és C panel) esetében is pozitívak lettek. A két sejtvonal közötti Pgp-funkció különbség a Pgp specifikus gátlószerének hatására eltűnt, így belátható, hogy a rezisztenciát valóban a Pgp jelenléte okozta (1. ábra A panel) [19].

A Pgp-mediált multidrog rezisztencia leküzdésére több alternatíva is felmerült [8], melyek között új, ígéretes lehetőségként tűnt fel a rezisztenciát okozó transzporter jelenlétének kihasználása MDR-szelektív vegyületekkel. Az MDR-szelektív vegyületek a Pgp fehérjét funkcionálisan expresszáló multidrog rezisztens sejteket képesek célzottan elpusztítani. Ahogy a 2. ábra is mutatja a Pgp-vel rendelkező MES-SA/Dx5 sejtek közel 10-szer érzékenyebbnek mutatkoztak a Pgp-mentes MES-SA sejtekhez viszonyítva a BB090 kezelésre, ami jól mutatja ezt a paradox hatást. Kimutatható volt, hogy ez a hatás csak működő transzporter esetén van jelen, a fehérje célzott gátlása tariquidarral eltörölte a Pgp-pozitív és -negatív sejtek közötti különbséget (2. ábra, B panel). Tehát habár a Pgp MDR-transzporter általános védelmet jelent a legtöbb, klinikumban használatos citotoxikum ellen, egyben érzékennyé teszi a tumorsejteket az általunk alkalmazott vegyületekkel szemben [13, 19].

Korábbi irodalmi adatok szerint az MDR-vegyületek alkalmazása nem csupán a rezisztens tumorsejtek elpusztításához vezet, hanem azok képesek az MDR-sejtek Pgp expressziójának csökkentésére is. *In vitro* kísérletek során kimutatták, hogy 3 hetes drogkezelést követően az NSC73306 MDR-szelektív vegyület hatására a tumorsejtek elveszítik Pgp expressziójukat és újra szenzitívvé válnak a konvencionális kemoterápiás kezelésekre [19].

Az MDR-szelektív vegyületekkel végzett kísérleteink során igazoltuk a Pgp-pozitív sejtek kollaterális szenzitivitását az említett vegyületekre, de a legfontosabb kérdésünk az MDR-szelektív vegyületekkel történő kezelés hatására bekövetkező Pgp expresszió vesztésének folyamata volt. Ennek vizsgálatára különböző *in vitro* stratégiák alkalmazásával új, stabil sejtvonalakat hoztunk létre a MES-SA/Dx5 vonalból, majd ezeket karakterizáltuk és microarray vizsgálatokkal próbáltuk felderíteni a fenotípus váltás mögött meghúzódó mechanizmusokat (a dolgozat megírásakor a microarray eredmények feldolgozása még nem fejeződött be). Számukra is váratlan módon azt tapasztaltuk, hogy az egyszeri nagy koncentrációjú (IC80) MDR-szelektív vegyülettel történő kezelés hatására a Pgp-pozitív Dx5 tumorsejt populációból meglehetősen rövid (10-16 nap) idő alatt egy Pgp-t egyáltalán nem expresszáló populáció keletkezett, ami stabilan 40 passzázsra keresztül fennmaradt és amelynek doxorubicin érzékenysége helyreállt és már kis koncentrációjú kezelés hatására sejtpusztulást tapasztaltunk (3. ábra, A4. panel és B panelek). Az érzékenység mértéke megegyezett a hagyományos Pgp-mentes MES-SA sejtvonallal (3. ábra, B2. panel). Feltételezésünknek megfelelően az új sejtvonal magas koncentrációjú (100-500nM) hagyományos kemoterápiás kezelések hatására napok (3-5 nap) alatt elpusztult, azonban meglepő módon, követve az MDR-szelektív vegyületeknél alkalmazott stratégiánkat az egyszeri, szubtoxikus koncentrációjú doxorubicin kezelést követően a sejtek közel 100%-a újra magas Pgp expressziót mutatott (4. ábra). Ezzel párhuzamosan, a Pgp-pozitív Dx5 sejteket egyetlen IC50 koncentrációjú MDR-szelektív vegyülettel kezelve olyan, drogmentes környezetben is fennmaradó, heterogén populáció alakult ki, amely Pgp-negatív és -pozitív sejteket közel 50-50%-ban tartalmazott (3. ábra, A3. panel).

Az eredményeink azt az elképzelést igazolják, miszerint a tumorpopulációt alkotó sejtek fenotípusa dinamikus szabályozás alatt áll. A drog toleráns és a drog rezisztens fenotípus reverzibilisnek mutatkozott és a sejtek kemoterápiás szerekre gyorsan kialakuló rezisztenciája MDR-szelektív vegyületekkel való kezelés hatására legalább olyan gyorsan megszüntethető volt, mint ahogy az a doxorubicin hatására újra kialakult. A folyamat kétirányú, oda-vissza működik, és valószínűleg egy olyan epigenetikai szabályozás alatt álló mechanizmus részét képezi, amely a tumorsejtek túlélését képes biztosítani a kemoterápia első szakaszában.



6. ábra MDR oda-vissza. A MES-SA, MES-SA/Dx5, Dx5' és Dx5'' sejtvonalak Pgp expressziójának vizsgálata immunfestéssel, valamint doxorubicin-érzékenységük felmérése.

A feltevést igazolandó különböző epigenetikai mechanizmusokat (hiszton demetiláz, acetiláz, metil-transzferáz és acetil-transzferáz) célzó gátlószereket alkalmaztunk a BB090 MDR-szelektív vegyület mellett (5. ábra). A hiszton demetiláz gátló IOX1 és a BB090 kombinációs kezelés hatására 16 nap alatt a populáció elérte a 80%-os konfluencia határt és a sejtek 20,6%-nál az eredeti Pgp expresszió megmaradt. Hasonlóképpen, mindkét hiszton deacetiláz inhibitor hatással volt a fenotípus váltásra. A Trichistatin A-val és BB090-el kezelt

sejtek ugyancsak 16 nap alatt nőttek fel, de itt csak a populáció 9,2%-a maradt Pgp-pozitív, míg a SAHA-val és BB090-el kezelt sejtek 22 nap alatt érték el a 80%-os konfluenciát, de a populáció 41,1%-a expresszáta a Pgp-t. A hiszton metiltranszferáz EZH2 fehérje gátlószere, a 3-deazaneplanocin kombinációban a BB090-el egy olyan populációt eredményezett, amely 24 nap alatt nőtt fel és a populáció 88,2%-a expresszáta a Pgp-transzportert.

Vizsgálataink felhívják a figyelmet arra, hogy az epigenetikai folyamatok közreműködhetnek a rezisztencia kialakulásában, valamint eredményeink terápiás stratégiák tervezése szempontjából ígéretes új lehetőségek felé nyitnak utat.

Eredményeink egy olyan terápiás megközelítést vetnek fel, amely során az epigenetikai gátlószerek kombinációs kezelésben alkalmazva hatással lehetnek a tumorsejtek rezisztenciáját kialakító mechanizmusra, így kitolva vagy meggátolva az MDR megjelenését. Ezzel együtt az MDR-szelektív vegyületek bevetése a terápiás kezelések során ígéretes lehetőségnek tűnik, hiszen képesek hatékonyan és célzottan a multidrog rezisztens sejtek elpusztítására vagy akár a már kialakult MDR-fenotípus megszüntetésére is. Az általunk talált folyamatok magyarázata jelentősen hozzájárulhat a gyógyszerekkel szemben kialakuló rezisztencia mechanizmusainak megértéséhez és olyan kombinációs terápiás protokollok kialakításához, melyek képesek gátat szabni vagy legalább lassítani ezt a klinikumban is rendszeresen tapasztalt problémát.

7. Összefoglaló

A rosszindulatú tumorok kezelésekor alkalmazott kemoterápiás vegyületek gyakran azért vallanak kudarcot, mert a terápia során kialakul az ún. multidrog rezisztencia (MDR). A multidrog rezisztens daganatsejtek membránján kifejeződő P-glycoprotein (Pgp, ABCB1, MDR1) fehérje az ABC (ATP Binding cassette) transzporter családba tartozó efflux pumpa, mely képes sokféle, struktúrájában eltérő vegyület felismerésére és eltávolítására a citoplazmából. A Pgp szubsztrátjaként ismeri fel a tumor ellen használt gyógyszerek jelentős részét, köztük a napjainkban is alkalmazott doxorubicint, vinblastint, vinkrisztint és paclitaxelt, illetve számos tirozin kináz gátlót (TKI). Miután a Pgp direkt gátlására tett kísérletek a klinikai fázisban megghiúsultak, az MDR probléma megoldására más stratégiát kellett választani. Az egyik lehetséges ilyen módszer a csoportunk által azonosított MDR-szelektív vegyületek alkalmazása. Az MDR-szelektív molekulák paradox módon képesek a Pgp-t expresszáló multidrog rezisztens sejtek célzott elpusztítására. Az MDR-szelektív vegyületek egy másik hatása, hogy azokat a toxikus dózisonál kisebb koncentrációban alkalmazva képesek vagyunk a sejtek Pgp expresszióját az MDR-t biztosító szint alá csökkenteni és így a tumor sejteket „átprogramozni” rezisztens állapotból újra szenzitívvé. Az „átprogramozott” sejtek visszanyerik gyógyszerérzékenységüket a hagyományos kezelésekkel szemben és Pgp szintjük visszatér az eredeti, endogén expresszió szintjére. Munkám során ennek a mechanizmusnak a megértésén dolgoztam *in vitro* MES-SA (Pgp-negatív) és MES-SA/Dx5 (Pgp-pozitív) uterin szarkóma sejteken, ahol a rezisztens sejtvonalat folyamatos doxorubicin kezeléssel alakították ki. A csoportunk bebizonyította, hogy, a korábbi elképzeléssel szemben, az MDR-szelektív vegyületek hatására bekövetkező fenotípus váltás akár néhány nap alatt is végbemehet, egyetlen kezelést követően. Dolgozatomban bemutatom a rezisztens sejtek visszaprogramozásakor választott stratégia (egy nagy dózisu, több kis dózisu vagy folyamatos alacsony dózisu kezelés), illetve az epigenetikai inhibitorok hatását a fenotípus váltásra. Eredményeink arra utalnak, hogy drog-naiv (kemoterápiát még sosem kapott) tumorsejtek akár néhány nap alatt képesek lehetnek magas Pgp expresszióra szert tenni. A kialakuló rezisztencia azonban gyakran reverzibilisnek bizonyult, ami felveti az epigenetikai szabályozás szerepét.

8. Summary

The efficacy of drugs used to treat malignancies is often hampered by the emergence of the so-called multidrug resistance (MDR). Cancer cells with MDR phenotype overexpress a transmembrane protein, P-glycoprotein (Pgp, ABCB1, MDR1), which belongs to the ATP Binding cassette (ABC) transporter superfamily. This efflux pump can recognize and transport numerous, structurally unrelated compounds from the cytoplasm to the extracellular space. Conventional anti-cancer agents including doxorubicin, vinblastine, vincristine, paclitaxel and new, promising drugs such as tyrosine kinase inhibitors (TKI) were also shown to be substrates of Pgp. Since attempts to directly inhibit Pgp have failed in the clinical phase, a new strategy had to be established. One possibility is the selective targeting of MDR cells. Our group identified and characterized several MDR-selective molecules that show paradox toxicity against Pgp overexpressing multidrug resistant cancer cells. Surprisingly, when we use an MDR-selective compound below its toxic concentration, the resistant cells can be “reprogrammed” to become sensitive again as a result of decreased Pgp expression. These “reprogrammed” cells are regaining their sensitivity to chemotherapy and their Pgp expression is equal to endogenous levels. My aim was to understand this process using the Pgp-negative MES-SA and Pgp-positive MES-SA/Dx5 (established by continuous drug selection in doxorubicin) uterine sarcoma cell line pair. We proved that the phenotype switch (from resistant to sensitive) caused by the MDR-selective molecules can be very rapid as it can happen within a few days following a single treatment. In my thesis I explain the effects of different reprogramming strategies (short-term high-dose, long-term low-dose or continuous low-dose) and epigenetic inhibitors on the phenotype switch. Our results suggest that drug-naïve (never treated) cancer cells can become resistant within days. Interestingly, this rapidly acquired drug resistance seems to be reversible suggesting the involvement of epigenetic regulation in the process.

9. Irodalomjegyzék

1. Albain KS, Swann RS, Rusch VW, Turrisi Iii AT, Shepherd FA, Smith C, Chen Y, Livingston RB, Feins RH, Gandara DR *et al*: **Radiotherapy plus chemotherapy with or without surgical resection for stage III non-small-cell lung cancer: a phase III randomised controlled trial.** *The Lancet*, 374(9687):379-386.
2. Figueras J, Valls C, Rafecas A, Fabregat J, Ramos E, Jaurrieta E: **Resection rate and effect of postoperative chemotherapy on survival after surgery for colorectal liver metastases.** *Br J Surg* 2001, 88(7):980-985.
3. Recht A, Come SE, Gelman RS, Goldstein M, Tishler S, Gore SM, Abner AL, Vicini FA, Silver B, Connolly JL *et al*: **Integration of conservative surgery, radiotherapy, and chemotherapy for the treatment of early-stage, node-positive breast cancer: sequencing, timing, and outcome.** *J Clin Oncol* 1991, 9(9):1662-1667.
4. Ariffin AB, Forde PF, Jahangeer S, Soden DM, Hinchion J: **Releasing pressure in tumors: what do we know so far and where do we go from here? A review.** *Cancer Res* 2014, 74(10):2655-2662. doi: 2610.1158/0008-5472.CAN-2613-3696. Epub 2014 Apr 2628.
5. Corrie PG: **Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects.** *Medicine* 2011, 39(12):717-722.
6. Malhotra V, Perry MC: **Classical Chemotherapy: Mechanisms, Toxicities and the Therapeutic Window.** *Cancer Biology & Therapy* 2003, 2(0):1-3.
7. Szakacs G, Varadi A, Ozvegy-Laczka C, Sarkadi B: **The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox).** *Drug Discov Today* 2008, 13(9-10):379-393.
8. Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM: **Targeting multidrug resistance in cancer.** *Nat Rev Drug Discov* 2006, 5(3):219-234.
9. Heldin C-H, Rubin K, Pietras K, Ostman A: **High interstitial fluid pressure [mdash] an obstacle in cancer therapy.** *Nat Rev Cancer* 2004, 4(10):806-813.
10. Provenzano PP, Hingorani SR: **Hyaluronan, fluid pressure, and stromal resistance in pancreas cancer.** *Br J Cancer* 2013, 108(1):1-8.
11. Gottesman MM: **Mechanisms of cancer drug resistance.** *Annu Rev Med* 2002, 53:615-627.
12. Dean M, Hamon Y, Chimini G: **The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily.** *Journal of Lipid Research* 2001, 42(7):1007-1017.

13. Turk D, Hall MD, Chu BF, Ludwig JA, Fales HM, Gottesman MM, Szakacs G: **Identification of compounds selectively killing multidrug-resistant cancer cells.** *Cancer Res* 2009, **69**(21):8293-8301.
14. Campos L, Guyotat D, Archimbaud E, Calmard-Oriol P, Tsuruo T, Troncy J, Treille D, Fiere D: **Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis.** *Blood* 1992, **79**(2):473-476.
15. Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y: **Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil.** *Cancer Res* 1981, **41**(5):1967-1972.
16. Szakacs G, Annereau JP, Lababidi S, Shankavaram U, Arciello A, Bussey KJ, Reinhold W, Guo Y, Kruh GD, Reimers M *et al*: **Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells.** *Cancer Cell* 2004, **6**(2):129-137.
17. Szybalski W, Bryson V: **Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of Escherichia coli to fifteen antibiotics.** *J Bacteriol* 1952, **64**(4):489-499.
18. Lazar V, Pal Singh G, Spohn R, Nagy I, Horvath B, Hrtyan M, Busa-Fekete R, Bogos B, Mehi O, Csorgo B *et al*: **Bacterial evolution of antibiotic hypersensitivity.** *Mol Syst Biol* 2013, **9**(700):57.
19. Ludwig JA, Szakacs G, Martin SE, Chu BF, Cardarelli C, Sauna ZE, Caplen NJ, Fales HM, Ambudkar SV, Weinstein JN *et al*: **Selective toxicity of NSC73306 in MDR1-positive cells as a new strategy to circumvent multidrug resistance in cancer.** *Cancer Res* 2006, **66**(9):4808-4815.
20. Wu CP, Shukla S, Calcagno AM, Hall MD, Gottesman MM, Ambudkar SV: **Evidence for dual mode of action of a thiosemicarbazone, NSC73306: a potent substrate of the multidrug resistance linked ABCG2 transporter.** *Mol Cancer Ther* 2007, **6**(12 Pt 1):3287-3296.
21. Diaz Jr LA, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, Allen B, Bozic I, Reiter JG, Nowak MA *et al*: **The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers.** *Nature* 2012, **486**(7404):537-540.
22. Attolini CS, Michor F: **Evolutionary theory of cancer.** *Ann N Y Acad Sci* 2009.
23. Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, McDermott U, Azizian N, Zou L, Fischbach MA *et al*: **A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations.** *Cell* 2010, **141**(1):69-80.

24. Pisco AO, Brock A, Zhou J, Moor A, Mojtahedi M, Jackson D, Huang S: **Non-Darwinian dynamics in therapy-induced cancer drug resistance.** *Nat Commun* 2013, **4**.
25. Esteller M: **Epigenetics in Cancer.** *New England Journal of Medicine* 2008, **358**(11):1148-1159.
26. Dawson Mark A, Kouzarides T: **Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy.** *Cell*, **150**(1):12-27.
27. Knoechel B, Roderick JE, Williamson KE, Zhu J, Lohr JG, Cotton MJ, Gillespie SM, Fernandez D, Ku M, Wang H *et al*: **An epigenetic mechanism of resistance to targeted therapy in T cell acute lymphoblastic leukemia.** *Nat Genet* 2014, **46**(4):364-370.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Szakács Gergelynek a szakmai tanácsokért és útmutatásért.

Köszönöm Füredi Andrásnak a kitartó támogatást, és hogy munkám során bármikor számíthattam segítségére, tanácsaira.

Köszönettel tartozom még Szabényi Kornéliának, Tóth Szilárdnak és Lovrics Annának, valamint a csoport többi tagjának, hogy a munka öröm volt, és mert nélkülük nem jöhetett volna létre a dolgozat.

11. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- sejttenyészetek fenntartását,
 - sejtek morfológiájának megfigyelése és rögzítését,
 - citotoxicitási esszé elvégzését,
 - a különböző sejtvonalakból származó sejttenyészetek hagyományos kemoterápiás szerekkel és MDR-szelektív vegyületekkel történő kezelését és a szerek hatásának megfigyelését, rögzítését,
 - Calcein-esszé elvégzésében való segédkezést,
 - sejtek fagyasztását és fagyasztásból való felvételét
 - új sejtvonalak (drog rezisztens és szenzitív) létrehozását
- végeztem el.

Budapest, 2015. 01. 01.

.....

Aláírás

A lezárás dátuma: 2015. 01. 06.