

STRESZCZENIE

Nadrodzina białek ABC jest jedną z najliczniejszych rodzin białek obecnych we wszystkich żyjących organizmach. U człowieka scharakteryzowano 48 białek, które podzielone są na 7 podrodzin. Ich cechą charakterystyczną jest silnie konserwatywna domena wiążąca ATP oraz zróżnicowana domena przezbłonowa. Białka z nadrodziny ABC zaangażowane są w transport różnego rodzaju związków zarówno fizjologicznych jak i ksenobiotycznych, transportują m.in.: białka, lipidy, cholesterol, fosfolipidy, jony organiczne i nieorganiczne, kwasy tłuszczowe, pochodne nukleozydów, hormony oraz różnego rodzaju ksenobiotyki: antybiotyki, leki przeciwnowotworowe, metabolity leków. Jedną z podstawowych funkcji fizjologicznych transporterów ABC jest tworzenie naturalnych barier, chroniących ważne narządy takie jak: bariera krew-mózg, krew-jądra, czy chroniąca płód bariera krew-łożysko.

Transportery ABC, prócz ważnej fizjologicznej roli, odpowiedzialne są za zjawisko oporności wielolekowej. Usuwają w sposób aktywny z komórek nowotworowych leki zmniejszając tym samym skuteczność chemioterapii. Do najważniejszych z klinicznego punktu widzenia należą ABCB1, ABCG2 oraz ABCC1.

Współczesna medycyna onkologiczna poszukuje leków, które skutecznie zwalczają zjawisko oporności wielolekowej, jednocześnie pozostając bezpiecznymi dla całego organizmu. Innymi słowy poszukują związków, które w sposób specyficzny uwrażliwiają komórki nowotworowe z nadekspresją białek z nadrodziny ABC. Tu pomocne może być zjawisko wrażliwości pobocznej (ang. *collateral sensitivity* – CS). Jest to zjawisko polegające na tym, że podczas zmian genetycznych towarzyszących rozwojowi oporności wielolekowej na skutek działania jednego czynnika pojawia się nadwrażliwość na drugi czynnik. Mechanizm tego zjawiska nie jest do końca zbadany. Zaproponowano kilka mechanizmów działania związków wywołujących wrażliwość poboczną: zaburzenia energetyczne związane ze wzmożoną hydrolizą ATP, stymulacja usuwania poza komórkę endogennych substratów niezbędnych do ich przeżycia, zaburzenia płynności błony oraz wytwarzanie reaktywnych form tlenu. To właśnie z ostatniej hipotezy zrodził się pomysł wykonania badań w ramach tej rozprawy doktorskiej.

Celem niniejszej pracy było zbadanie, czy nadekspresja transporterów kluczowych dla zjawiska oporności wielolekowej (ABCB1 oraz ABCG2) jest związana ze zróżnicowaną

opornością komórek na czynniki wywołujące stres oksydacyjny. Oceniono wpływ egzogennych związków o potencjale utleniającym (H_2O_2 , AAPH, tBOOH, menadionu, $K_2Cr_2O_7$, parakwatu, diamidu) wobec wybranych modeli komórkowych wykazujących nadekspresję ww. białek. Sprawdzono również wpływ nanocząstek srebra o średnicy 20 nm na poziom ekspresji i aktywność wybranych białek ABC w wybranych modelach komórkowych.

Model badawczy stanowiły ludzkie linie nowotworowe pochodzenia macierzystego SW620 (gruczolakowa jelita grubego), A549 (niedrobnokomórkowy gruczolakorak płuc) oraz HepG2 (rak wątrobowokomórkowy) wywodzące się z różnych tkanek, sublinia SW620D powstała w wyniku długotrwałej selekcji linii SW620 doksorubicyną oraz panel linii MDCKII pochodzenia psiego, zawierający dwa klony transfekowane ludzkimi genami białek oporności wielolekowej *ABCB1* (MDCK-MDR) i *ABCG2* (MDCK-BCRP).

Pierwsza część badań zakładała ocenę właściwości antyproliferacyjnych wszystkich ww. związków względem prostego modelu komórkowego z wykorzystaniem komórek linii MDCKII, MDCKII-BCRP oraz MDCKII-MDR. Zaobserwowano zwiększoną wrażliwość komórek linii MDCKII z nadekspresją białka *ABCB1* i *ABCG2* wobec testowanych związków w porównaniu do komórek linii podstawowej MDCKII. Najwyższą cytotoksycznością charakteryzował się dichromian potasu. Następnie sprawdzono, czy zjawisko to ma charakter ogólny, w tym celu przetestowano wybrane związki wobec ludzkich komórek raka jelita grubego SW620 oraz selektanta SW620D. Komórki linii SW620D wykazywały większą wrażliwość na testowane czynniki utleniające w porównaniu do komórek linii podstawowej SW620.

Podjęto próbę identyfikacji mechanizmów leżących u podstaw zaobserwowanego zjawiska. Z doniesień literaturowych wynika, że komórki nowotworowe często posiadają zaburzony system oksydo-redukcyjny, który jest kluczowy w utrzymywaniu komórek w homeostazie. Procesy takie jak transformacja nowotworowa, proliferacja komórek nowotworowych, migracja, inwazja, metastaza czy unaczynienie nowotworów są pod ścisłą kontrolą redoks. Za te zaburzenia odpowiedzialne są reaktywne formy tlenu jak i enzymy stresu oksydacyjnego. Oceniono poziom generacji reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach linii MDCKII oraz MDCKII-BCRP za pomocą sond fluorescencyjnych i zaobserwowano wyższy poziom RFT w komórkach linii MDCKII-BCRP w stosunku do komórek MDCKII oznaczony za pomocą DHR123, MitoSOX Red i Amplex Red. Na kolejnym etapie oceniono wybrane parametry redoks w obu liniach komórkowych. Zaobserwowano istotnie statystyczną, niższą

zawartość GSH w MDCKII-BCRP przy braku różnic w aktywności enzymów związanych z gospodarką glutationową – reduktazy glutationowej i peroksydazy glutationowej. Wykluczono również rolę ABCG2 w transporcie GSH poprzez zastosowanie inhibitorów Ko143 i fumitremorginy C.

W celu wyjaśnienia mechanizmów leżących u podstaw zaobserwowanego zjawiska w bardziej złożonym modelu z wykorzystaniem komórek linii SW620 i selektanta SW620D oceniono poziom generacji stresu oksydacyjnego w ww. komórkach za pomocą dwóch sond fluorescencyjnych H₂DCDFA i DHE – będących markerami cytozolowego stresu oraz białka repeterowego HyPer-dMito – będącego biosensorem nadtlenu wodoru pochodzącego od mitochondriów. Zaobserwowano istotną niższą generację RFT w SW620D w stosunku do linii SW620.

W dalszym etapie badań dokonano analizy porównawczej wybranych parametrów systemu oksydo-redukcyjnego. Zaobserwowano jedynie niższą aktywność katalazy w komórkach linii SW620D, przy braku różnic między liniami w poziomie GSH oraz aktywności enzymów odpowiedzialnych za równowagę glutationową.

Aktywność białek oporności wielolekowej jest zależna od hydrolizy ATP. Dlatego oznaczono poziom ATP w komórkach linii SW620 i SW620D, kontrolnych i preinkubowanych ze 150 μmol/dm³ nadtlaniem wodoru. Zanotowano niższy poziom ATP w komórkach linii SW620D zarówno kontrolnych jak i traktowanych nadtlaniem wodoru. Jakkolwiek obniżony poziom ATP nie wpływa na poziom pierwszej linii obrony antyoksydacyjnej.

Obniżenie poziomu wewnątrzkomórkowego ATP oraz egzogeny stres oksydacyjny może prowadzić do apoptozy poprzez uwalnianie cytochromu c, a następnie aktywację kaskady kaspaz. Mimo braku istotnie statystycznych różnic zaobserwowano tendencję wzrostową uwalniania cytochromu c pod wpływem czynnika utleniającego dla komórek SW620D w porównaniu do komórek SW620 typu dzikiego. W komórkach selekcjonowanych doksorubicyną na skutek działania nadtlenu wodoru zaobserwowano także podwyższoną aktywność efektorowych kaspaz 3/7 w stosunku do linii podstawowej SW620, co może świadczyć o wzmożonym procesie apoptozy w tych komórkach.

Oksydacyjne uszkodzenia DNA wywołane RFT są naturalnym zjawiskiem wynikającym z metabolizmu komórkowego. Jednakże, poziom uszkodzeń może być znacznie większy na skutek czynników zewnętrznych. Zbadano wpływ H₂O₂ oraz promieniowania X na poziom uszkodzeń i naprawy DNA za pomocą testu kometowego. Z analizy danych wynika, że komórki

linii SW620D wykazywały już na poziomie kontrolnym większą ilość uszkodzeń DNA w stosunku do linii podstawowej i większą ilość pęknięć nici zależną od dawki promieniowania i stężenia H₂O₂. Obie linie podobnie naprawiały uszkodzenia.

Na ostatnim etapie badań sprawdzono wpływ nanocząstek srebra na poziom i aktywność białek ABC w wybranych liniach komórkowych różnego pochodzenia tkankowego (SW620, A549, HepG2). Jak wiadomo, cytotoksyczność nanocząstek srebra wynika z ich zdolności do generowania RFT. Najbardziej wrażliwe okazały się komórki linii HepG2, a najbardziej oporną – A549.

Na podstawie analizy ekspresji genów na poziomie mRNA kodujących wybrane białka ABC w komórkach linii A549, HepG2 oraz SW620 stwierdzono, że krótkie czasy inkubacji (1; 2; 4; 6h) zwiększają ekspresję, a 12h inkubacja – obniża ją. Nie zaobserwowano natomiast istotnych różnic w ilości białka ABCB1 i ABCG2 w wybranych liniach w stosunku do komórek kontrolnych. Nanocząstki srebra hamowały aktywność ABCB1 po 2h inkubacji i nie miały wpływu na aktywność białek z podrodziny ABCC.

Na podstawie danych uzyskanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wyciągnięto następujące wnioski:

1. Komórki z nadekspresją ABCG2 na skutek obniżonej endogennej ilości GSH są bardziej podatne na stres oksydacyjny.
2. Komórki z nadekspresją ABCB1 o obniżonym poziomie ATP są bardziej podatne na stres oksydacyjny.
3. Nanocząstki srebra o średnicy 20 nm mają zdolność do modulowania ekspresji i aktywności wybranych transporterów ABC.



ABSTRACT

ATP-binding cassette transporters superfamily is one of the largest protein families present in all living species. In humans, 48 proteins have been characterized and classified into seven subfamilies. Their distinctive feature is the highly conserved ATP-binding cassette domain (NBD) and the less conserved transmembrane domain (TMD). ABC proteins mediate transport of a diverse array of substrates across the membrane, both physiological and xenobiotic compounds, including: proteins, lipids, cholesterol, phospholipids, organic and inorganic ions, fatty acids, nucleoside derivatives, hormones as well as antibiotics, anticancer drugs and drug metabolites. One of the crucial physiological function of ABC transporters is participation in formation of barriers that protect organs such as: blood-brain barrier, blood-testicle, or fetus-protecting blood-placenta barrier.

In addition to their physiological role, ABC transporters are responsible for the multidrug resistance (MDR) phenomenon. They remove drugs from cancer cells, reducing the effectiveness of chemotherapy. From the clinical point of view, the most important transporters are ABCB1, ABCG2 and ABCC1.

Contemporary oncology searches for novel drugs that effectively combat the multidrug resistance, while remaining safe for the organism. In other words, scientists are looking for compounds that specifically sensitize MDR cells, for example by the phenomenon of collateral sensitivity (CS). The CS describes the situation in which genetic changes arising during MDR development by one factor results in hypersensitivity to the other factor. Although the exact mechanism of CS is not fully understood, several hypothesis have been proposed: disturbance in the cell energy associated with increased ATP hydrolysis; stimulation of efflux of endogenous substrates necessary for cell survival; membrane fluidity disorders and production of reactive oxygen species (ROS). The ROS hypothesis arose the idea to carry out experiments within this doctoral dissertation.

The aim of this study was to investigate whether the overexpression of transporters involved in the multidrug resistance phenomenon (ABCB1 and ABCG2) leads to the increased susceptibility to oxidative stress agents. The influence of exogenous oxidative compounds (H_2O_2 , AAPH, tBOOH, menadione, $K_2Cr_2O_7$, paraquat, diamide) on cells overexpressing ABC proteins was evaluated. The influence of 20 nm silver nanoparticles on the expression level and activity of selected ABC proteins in cells was also checked.

In this research, the following human cell lines were used as biological models: SW620 (colorectal adenocarcinoma), SW620D subline obtained by long-term doxorubicin selection (overexpressing ABCB1), A549 (non-small cell adenocarcinoma), HepG2 (hepatocellular carcinoma) originating from various tissues. Additionally, canine cell line: MDCKII with two clones transfected with the human *ABCB1* (MDCK-MDR) and *ABCG2* (MDCK-BCRP) were also used.

The first part of the study assessed the antiproliferative properties of all the previously mentioned oxidative compounds against MDCKII, MDCKII-BCRP and MDCKII-MDR cell lines. Increased sensitivity of MDCKII cells overexpressing ABCB1 and ABCG2 compared to MDCKII parental cell line has been observed. Potassium dichromate showed the highest cytotoxicity. The general nature of this phenomenon was confirmed in studies with the selected compounds against human colon cancer SW620 and SW620D. SW620D cells showed greater sensitivity to tested compounds compared to SW620 parental cell line.

The follow up experiments attempted to identify the mechanisms underlying the observed phenomenon. It is known that cancer cells often have a disturbed redox system that is crucial in maintaining cells in homeostasis. Processes such as carcinogenesis, cancer cell proliferation, migration, invasion, metastasis or neovascularization of tumors are under strict redox control. Reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress enzymes are mainly responsible for these disorders. For that reason, the level of ROS generation in MDCKII and MDCKII-BCRP cells was assessed using fluorescent probes. The higher levels of ROS in MDCKII-BCRP cells compared to MDCKII cells were observed. At the next stage, selected redox parameters were evaluated in both cell lines. A statistically significant lower GSH content in MDCKII-BCRP was observed, while no differences were observed in the activity of glutathione related enzymes – glutathione reductase and glutathione peroxidase. Additionally, the role of ABCG2 in the transport of GSH was excluded using specific inhibitors: Ko143 and FTC.

In order to explain the mechanisms underlying the observed phenomenon in SW620 SW620D cell lines, the level of oxidative stress generation was measured with two fluorescent probes H₂DCDFA and DHE (markers of cytosolic stress) as well as the HyPer-dMito reporter protein (biosensor of hydrogen peroxide derived from mitochondria). A statistically significant lower endogenous generation of ROS was observed in SW620D in relation to the SW620 line.

Next, GSH, GSSG level and antioxidative enzymes activity were measured. From among all, only activity of catalase was lower in SW620D.

The activity of multidrug resistance proteins is dependent on ATP hydrolysis. Therefore, the level of ATP was determined in SW620 and SW620D cell lines, control and pre-incubated with 150 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ hydrogen peroxide. A lower level of ATP was noticed in SW620D in both control and hydrogen peroxide treated cells compared to SW620 parental cell line.

ATP depletion and exogenous oxidative stress can lead to apoptosis through the release of cytochrome c, followed by the activation of the caspase cascade. There was an upward trend in the release of cytochrome c under the influence of the oxidizing agent for SW620D cells as compared to wild-type SW620 cells (although there were no statistically significant differences). In the cells selected with doxorubicin, action of hydrogen peroxide resulted in the higher activity of the effector 3/7 caspases compared to the parental SW620 line, which may indicate an increased apoptotic process in these cells.

The oxidative DNA damage induced by ROS is a natural phenomenon resulting from the cellular metabolism. However, the level of damage can be much greater due to the exogenous factors. The effect of H_2O_2 and X-rays on the level of DNA damage and repair was investigated using the comet assay. Analysis of the induction of DNA damage revealed that both cell lines clearly responded to X-rays or H_2O_2 in a dose-dependent manner. For the both cell lines, statistically important differences were observed from the lowest dose of X-radiation used (1 Gy). Both damaging factors induced more DNA strand breaks in SW620D than SW620 in the whole range of doses/concentrations tested. Both cell lines effectively repair DNA damage induced by 5 Gy of X-radiation.

Finally, the effect of silver nanoparticles (AgNP) on the level and activity of ABC proteins was investigated in cell lines of various tissue origins (SW620, A549, HepG2). It is well known that the cytotoxicity of silver nanoparticles results from their ability to generate ROS. Based on the cytotoxicity assay it has turned out that the most sensitive cells are HepG2 and the most resistant one – are A549 cells.

On the basis expression analysis of gene encoding ABC proteins in A549, HepG2 and SW620 cell lines treated with AgNP, it has been found that short incubation time (1, 2, 4, 6h) increases expression of the genes while longer exposure (12h) – decreases. However, no statistically significant differences were observed in the amount of ABCB1 and ABCG2

protein in selected lines relative to the control cells. Silver nanoparticles inhibited ABCB1 activity after 2h incubation and did not affect the activity of ABCC subfamily transporters.

On the basis of presented results, the three main conclusions have been drawn:

1. ABCG2 overexpressing cells are more vulnerable to oxidative stress due to a reduced endogenous amount of GSH.
2. ABCB1 overexpressing cells of reduced ATP level are more vulnerable to oxidative stress.
3. Silver nanoparticles with a diameter of 20 nm modulate the expression and activity of selected ABC transporters.

