

PRINCIP A VÝZNAM STUDIA EPIGENETIKY U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

PRINCIPLES OF EPIGENETIC STUDIES IN MULTIPLE MYELOMA

BÁRTOVÁ E.¹, KREJČÍ J.¹, HARNIČAROVÁ A.¹, HÁJEK R.^{2,3,4}

¹ BIOFYZIKÁLNÍ ÚSTAV AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY v.v.i., BRNO

² UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

³ LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

⁴ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

Souhrn

Specifické přestavby chromozómů představují významné cytogenetické charakteristiky nádorových buněk a mnohočetný myelom (MM) není výjimkou. Změny v karyotypu jsou často doprovázeny řadou epigenetických modifikací, jak na úrovni DNA, tak i histonů. Mnoho změn v metylacích DNA nebo methylačních a acetylačních profilech histonů bylo popsáno pro geny zodpovědné za nádorovou transformaci buněk. Ve sdělení uvádíme přehled námi používaných metod při studiu epigenetiky u mnohočetného myelomu.

Klíčová slova: mnohočetný myelom, genom, epigenom, chromatinová imunoprecipitace, exprese genů.

Summary

Chromosomal rearrangements can be frequently observed in tumor cells and multiple myeloma is not an exception. Karyotypic abnormalities of MM are accompanied by changes in the epigenome, including aberrant DNA/histone methylation and histone acetylation. Changes in DNA and/or histone methylation and histone acetylation were described for genes responsible for tumor cell transformation. Here we present methods used to study multiple myeloma epigenetics.

Keywords: multiple myeloma, genome, epigenome, chromatin immunoprecipitation, gene expression.

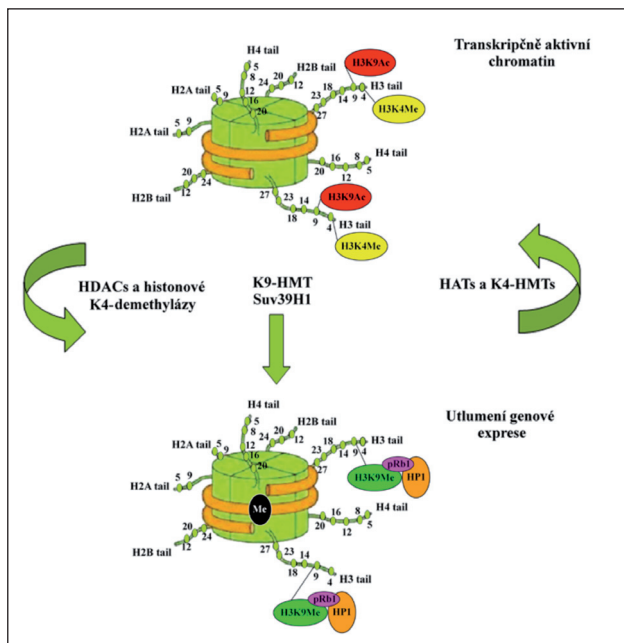
Úvod

Základní principy výzkumu epigenetiky

Genetické změny v nádorových buňkách jsou často doprovázeny různými epigenetickými modifikacemi kandidátních genů, které jsou asociovány s nádorovou transformací (7, 12). Epigenetika představuje dědičné změny ve fenotypu, které probíhají bez ohledu na změny v DNA sekvencích. Za hlavní epigenetický znak, často asociovaný s tumorigenezí, je považována methylace na úrovni DNA (3). Řada experimentů zabývajících se rozdíly v epigenetice normálních a nádorových buněk byla v minulosti směřována právě na studium DNA methylace (4,7). Velký význam v terapii některých solidních nádorů, ale především myelodysplastického syndromu (MDS) a některých typů leukemií mají právě inhibitory enzymů zprostředkujících DNA methyloci (Dnmts). V tomto směru patří některé české laboratoře k nejvýznamnějším světovým vědeckým pracovištím, které se věnují zejména syntéze a laboratornímu testování nových derivátů inhibitorů Dnmts, jako jsou deriváty 5-azacytidinu a 5-aza-2'-deoxycytidinu (1, 2). Paralelně s DNA methyloci se v genomu vyskytují různé typy modifikací histonů, kdy jako nejvýznamnější se jeví methylace N-terminálních konců histonu H3, a to především na jeho lysinových (K) reziduiích (Obrázek č. 1). Různé typy methylace histonů jsou považovány za důležitý epigenetický znak, který je zodpovědný jak za transkripční aktivitu, tak i utlumení exprese genů. Disba-

lance v epigenetických procesech vede k nádorové transformaci buněk. Je známo, že chromatin, který obsahuje velké množství transkripčně aktivních genů, je charakteristický vysokou mírou acetylce histonů a dále přítomností methyloci typu H3K4, H3K36, H3K79. Na druhou stranu, transkripčně neaktivní lokusy nesou epigenetické znaky typu H3K9, H3K27 a H4K20 methyloci, které se vyskytují ve formě mono-, di- a nebo tri-methyloci (5). Utlumení genové exprese je spojeno s funkcí různých enzymů, které se uplatňují při formování epigenomu. Za jeden z těchto důležitých proteinů je považována histonová methyltransferáza (HMT), zvaná Suv39H1 (9). Tento enzym je zodpovědný za H3K9 methyloci, která představuje vazebné místo pro důležitý protein asociovaný s heterochromatinem (HP1). Zmíněný komplex se například uplatňuje v represivní funkci retinoblastomového proteinu pRb, který je zodpovědný za regulaci transkripce některých lokusů (8). Velký význam z hlediska protinádorové terapie mají inhibitory histonových deacetyláz (HDAC), které vedle histonových acetyltransferáz (HAT) zprostředkují procesy acetylce histonů. Navíc bylo zjištěno, že změny v mnoha jaderných funkcích mohou být indukovány nestandardní aktivitou DNA methyltransferáz. Například exprese nádorově supresorového TP53 genu může být ovlivněna zmíněnými epigenetickými procesy (3), kdy po použití inhibitoru Dnmts zebularinu bylo zjištěno, že původní transkripce TP53 genu byla obnovena. Z výše uvedených

poznatku plyne, že studium epigenetických jevů je žádoucí především z hlediska pochopení nádorové transformace buněk a rovněž i z hlediska nádorové terapie.



Obrázek č. 1: Základní stavební jednotkou chromatinu je nukleosom, který se skládá z oktameru histonů H2A, H2B, H3 a H4 a dvouřetězcové DNA o velikosti 146 párů bází. Obrázek nukleosomu znázorňuje N-terminální konce jednotlivých histonů, které vyčnívají z každého nukleosomu. V obrázku jsou uvedeny příklady nejčastějších epigenetických modifikací histonů transkripčně aktivního a neaktivního chromatinu a důležité proteiny regulující modifikace histonů a genovou expresi. V obrázku jsou použity zkratky H3K9Ac (acetylace); H3K4Me a H3K9Me (methylace histonů); HAT (histonové acetyltransferázy), HDAC (histonové deacetylázy); HMTs (histonové methyltransferázy); HP1 (heterochromatinový protein 1); pRb (retinoblastomový protein) a Me v černém kolečku znamená DNA methylace. Obrázek nukleosomu byl upraven podle <http://chemistry.gsu.edu/faculty/Zheng/>.

Výskyt epigenetických modifikací histonů může být studován různými metodami. Jako nejvýznamnější se jeví chromatinová imunoprecipitace (ChIP), která v kombinaci s PCR poskytuje informace o epigenetických změnách ve vybraných lokusech. Daleko rozsáhlejší poznatky jsou získány při použití ChIP-on-chip microarray technologie, která slouží k mapování epigenetických procesů v rozsahu celého genomu. Zmíněné metody jsou založeny na selekci specificky modifikovaných histonů, a to pomocí monoklonálních protilátek, kdy experimentálně vytvořený DNA-histon-imunokomplex je zpracován tak, aby získaná ChIP-DNA mohla být použita buď pro PCR analýzy vybraných genů a nebo pro DNA microarrays (chip). Detekce změn v DNA methylaci může být například provedena pomocí různých methylačně senzitivních enzymů a PCR nebo s využitím DNA methylačních microarrays. Uvedené metody zatím nemají přímé klinické uplatnění, ale v budoucnu by měly vést k pochopení rozdílů mezi genomem a epigenomem normálních a nádorově transformovaných buněk. Rovněž by tyto metody měly přispět k ověření účinnosti inhibitorů Dnmts, HDAC nebo nově inhibitorů HMTs v klinické praxi. Dále tyto techniky představují slibný nástroj k posouzení cílených zásahů cytostatik do

lokusů, které jsou důležité z hlediska nádorové transformace nebo naopak nádorové suprese.

Metodiky

Konvenční chromatinová imunoprecipitace (ChIP) kombinovaná s PCR

Vazba mezi histony a DNA byla vytvořena pomocí fixace buněk paraformaldehydem po dobu deseti minut, při 37 °C. Finální koncentrace formaldehydu byla 1%. Po odstranění kultivačního media byly buňky dvakrát opláchnuty studeným PBS pufrém, který obsahoval inhibitory proteáz (1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1μg/ml aprotinin and 1μg/ml pepstatin A). Další experimentální postup byl prováděn podle protokolu k ChIP assay kitu (Upstate, USA, #17-295). Podle zmíněného protokolu byly buňky lyzovány a sonikovány tak, abychom získali fragmenty DNA o délce 200 až 1000 pb. Úspěšnost sonikace byla ověřena na 1% agarózovém gelu. Takto připravený vzorek, obsahující DNA-histonový komplex, byl imunoprecipitován. V našem případě jsme použili následující protilátky: anti-acetyl H3K9 (Upstate, USA, #06-942) a anti-dimethyl H3K9 (Upstate, USA, #07-212). Po promytí DNA-histon-immunokomplexu následovalo zahřátí vzorku na 65 °C, což uvolnilo vazbu mezi histony a DNA, která byla dále izolována pomocí QIAamp DNA Mini Kitu (QIAGEN #51304). Po stanovení koncentrace a čistoty DNA byly vzorky použity v klasické PCR reakci. PCR produkty byly vizualizovány pomocí 2% agarózového gelu. Množství imunoprecipitované DNA bylo normalizováno na množství vstupní DNA (tzv. input), která představuje 2% buněčného lyzátu, který byl získán před imunoprecipitací. V popsáných experimentech byly studovány H3K9 acetylace a H3K9 dimethylace u myelomových CD138/CD138⁺ linií ARH-77 a MOLP-8 ovlivněných cytostatiky a gama zářením a v CD138/CD138⁺ buněčné frakci získané z kostní dřeně pěti pacientů s diagnostikovaným MM.

ChIP-on-chip experimenty a analýzy

Acetylace histonu H3 v pozici lysinu 9 (K9) byla studována pro stovky promotorů vybraných genů pomocí RefSeq Promoters Array (NimbleGen, Systems, Inc., USA), s využitím RefSeq databáze. Použili jsme následující typ microarray: 2006-07-18_HG18_RefSeq_promoteraproníže uvedené účely byla porovnána ChIP-DNA a vstupní DNA, která byla izolována pomocí QIAamp DNA Mini Kitu (QIAGEN #51304). DNA amplifikace byla provedena pomocí "Ligation mediated PCR" (LM-PCR). V tomto případě jsme použili "GenomePlex Complete Whole Genome Amplification (WGA) kit" (Sigma, Missouri, USA, #WGA2). Prvním krokem LM-PCR bylo přidání 2 μl 1x "Library Preparation Buffer" ke každému vzorku (10ng DNA), dále byl použit 1 μl "Library Stabilization Solution". Pak byly vzorky centrifugovány a umístěny na termální blok, který byl zahřátý na teplotu 95 °C po dobu 2 min a pak byly vzorky rychle chlazeny na ledu. Na závěr 1 μl "Library Preparation Enzyme" byl přidán ke vzorkům a proběhla inkubace při 16 °C, 24 °C, 37 °C (20 min každý krok) a potom při 75 °C po dobu 5 min. Vzorečky byly uchovány při 4 °C a skladovány při -20 °C, dokud neproběhla amplifikace v doporučeném pufru, za

následujících podmínek: úvodní denaturace byla při 95 °C, 3 min. (14 cyklů), pak při 94 °C po dobu 15 sec. Annealing/extenze probíhaly při 65 °C po dobu 5 min. Vzorečky byly purifikovány pomocí "PCR purification" kitu (QIAGEN #28104) a získaná ChIP-DNA byla rozpuštěna v deionizované vodě. Pak byla stanovena koncentrace DNA pomocí UV absorpce. Poměr OD260/280 musel být nejméně 1,7 a poměr OD260/230 nejméně 1,5. Kvalita DNA byla rovněž ověřena pomocí agarózového gelu a takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí RefSeq Promoters array (NimbleGen, Systems, Inc., USA). Statistická analýza byla provedena pomocí SignalMap softwaru, který byl poskytnut firmou NimbleGen, Systems, Inc., USA. Parametr log₂-ratio představuje poměr vstupních signálů a signálů získaných z testovaného vzorku, který je hybridizován společně se vstupní DNA. Analýzy z laboratoří NimbleGen poskytují statistické zpracování dat, významnosti jsou uvedeny pro hodnoty tzv. "false discovery rate (FDR) score" ≤ 0,05; ≤ 0,1 a > 0,2, což představuje jednotlivé úrovně statistické významnosti výsledků.

Význam metody u MM stávající a očekávaný

Úroveň stanovení epigenetických změn u mnohočetného myelomu, ale i jiných nádorových onemocnění je stále experimentální. ChIP on chip, cDNA microarrays a DNA methylační microarrays by mohly v budoucnu rozšířit poznání klinického výzkumu, který testuje vliv cytostatik na expresi důležitých protoonkogenů a nádorově-supresorových genů. V rámci klinických studií jsou jedním ze zkoumaných typů léků rovněž různé inhibitory methylace DNA, či acetylase histonů. Lze tedy očekávat, že zmíněné metody budou užitečným nástrojem pro hodnocení efektu vybraných inhibitorů nebo predikci citlivosti pacienta na podaná léčiva.

Na druhou stranu zmíněné molekulárně-biologické metody vyžadují dostatečné množství klinického materiálu, což v případě separovaných CD138⁺ buněk MM představuje náročné zpracování klinického materiálu. Rovněž ne u všech pacientů se podaří získat dostatečné množství buněčného materiálu pro příslušnou analýzu.

Diskuse a závěr

Z uvedených skutečností je zřejmé, že studium epigenetických změn u nádorových buněk je v současné době otázkou základního výzkumu. Naše výsledky však ukazují originální výstupy z ChIP-PCR a ChIP-on-chip analýz u klinických vzorků a dále poskytují užitečný návod, jak testovat a posoudit terapeutický potenciál cytostatik, které významně ovlivňují histonový kód. Pomocí ChIP-PCR a ChIP-on-chip analýz jsme došli k závěru, že řada cytostatik zvyšuje acetylaci v promotorech mnoha genů, které v našem případě byly studovány u vybrané myelomové buněčné linie a pacientů. Naše výsledky významně korelují se závěry experimentů autorů Turner et al. 2006 (11), kteří ukázali, že exprese genu kódujícího "breast cancer resistance protein" u pacientů s MM je regulována DNA methylacemi v promotoru daného lokusu. Podobné mechanismy zřejmě platí pro H3K9 acetylaci, která reguluje expresi CCND1 genu u buněk MM. Na druhou stranu u buněk MM bylo zjištěno, že exprese CCND1 genu je regulována procesy, které nejsou závislé na DNA methylaci a H4 acetylaci (6), avšak zvýšená CCND1 exprese je významně asociována s translokací t(11;14), která zahrnuje lokusy CCND1 a IgH (10).

Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027, MSM0021622434, AVOZ50040507 a AVOZ50040702.

Literatura

1. Fojtová M, Piskala A, Votruba I et al. Efficacy of DNA hypomethylating capacities of 5-aza-2'-deoxycytidine and its alpha anomer. *Pharmacol Res.* 2007;55:16-22.
2. Hájek M, Votruba I, Holý A et al. Alpha anomer of 5-aza-2'-deoxycytidine down-regulates hTERT mRNA expression in human leukemia HL-60 cells. *Biochem Pharmacol.* 2008;75:965-972.
3. Hodge D.R., Peng B., Cherry J.C. et al. Interleukin 6 supports the maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter methylation. *Cancer Res.* 2005;65:4673-4682.
4. Jones PA. DNA methylation and cancer. *Oncogene.* 2002;21:5358-5360.
5. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007;128:693-705.
6. Krieger S., Gruntu C., Sabbah M., Sola B. Cyclin D1 gene activation in human myeloma cells is independent of DNA hypomethylation or histone hyperacetylation. *Exp Hematol.* 2005;33:652-659.
7. Nguyen CT, Weisenberger DJ, Velicescu M et al. Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* 2002;62:6456-6461.
8. Nielsen S.J., Schneider R., Bauer U.M. et al. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature.* 2001;412:561-565.
9. Peters A.H., O'Carroll D., Scherthan H. et al. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell.* 2001;107:323-337.
10. Pruner G., Fabris S., Baldini L. et al. Immunohistochemical analysis of cyclin D1 shows deregulated expression in multiple myeloma with the t(11;14). *Am J Pathol.* 2000;156:1505-1513.
11. Turner J.G., Gump J.L., Zhang C. et al. ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma. *Blood.* 2006;108:3881-3889.
12. Zhu W.G., Hileman T., Ke Y. et al. 5-aza-2'-deoxycytidine activates the p53/p21Waf1/Cip1 pathway to inhibit cell proliferation. *J Biol Chem.* 2004;279:15161-15166.