

PŘÍKLADY VÝZKUMU EPIGENETICKÝCH ZMĚN U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

SELECTED EPIGENETIC CHANGES IN MULTIPLE MYELOMA

KREJČÍ J.¹, BÁRTOVÁ E.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

V našich experimentech jsme se zaměřili na studium CD138⁺ a CD138⁻ buněk izolovaných z kostní dřeně pacientů s diagnostikovaným mnohočetným myelomem (MM). Studovali jsme epigenetické modifikace u myelomových buněčných linií, které byly ovlivněny klinicky využívanými cytostatiky. Chromatinová imunoprecipitace (ChIP) v kombinaci s polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) nám umožnila studovat epigenetické profily, jako je H3K9 acetylace a H3K9 dimethylace v promotorech a exonech genů, které jsou zodpovědné za patogenезi MM. Epigenetické modifikace těchto lokusů byly rovněž analyzovány u myelomových buněčných linií po ovlivnění vybranými cytostatiky. Pomocí ChIP-on-chip microarray analýzy jsme studovali v promotorech stovek genů zastoupení H3K9 acetylace, která je spojována se zvýšenou genovou expresí. Studium epigenetických změn u nádorových buněk je v současné době otázkou základního výzkumu. Naše výsledky ukazují originální výstupy z ChIP-PCR a ChIP-on-chip analýz u buněk pacientů s diagnostikovaným MM a buněčných linií ovlivněných cytostatiky. Naše experimenty poskytují užitečný návod, jak testovat a posoudit terapeutický potenciál cytostatik, které významně ovlivňují histonový kód.

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

Summary

Epigenetic changes such as histone acetylation and di-methylation at promoters and coding regions of genes which play an important role in the pathogenesis of multiple myeloma (MM) can be analyzed using methods such as chromatin immunoprecipitation (ChIP) in combination with polymerase chain reaction (PCR). We have studied epigenetic changes in MM cells treated by selected cytostatics that are used in MM therapy. ChIP-on-chip or with microarrays (chip) analyses of histone acetylation enabled us to study epigenetic status of hundreds of genes after cytostatic treatment. This type of epigenetic modification is associated with increased gene expression. We have applied the ChIP-PCR and ChIP-on-chip methods to study epigenetics in MM cell lines as well as in clinical samples. Our experiments have led to the development of a useful method of assessing the therapeutic potential of cytostatic agents which have a significant impact on the histone code.

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

Metodika a soubor pacientů

Epigenetické změny byly studovány pomocí ChIP-PCR a ChIP-on-chip metodologií. Pro analýzy se nám podařilo získat 4 vzorky CD138⁺ a CD138⁻ frakce separované z kostní dřeně pacientů s diagnostikovaným MM a dva vzorky lymfocytů zdravých dárců. Pro ChIP-on-chip analýzy jsme použili myelomovou buněčnou linii ARH77, která byla ovlivněna 20 μM Melphalanem. V tomto případě byly studovány změny v H3K9 acetylaci v promotorech stovek genů mapovaných na všech lidských chromozómech.

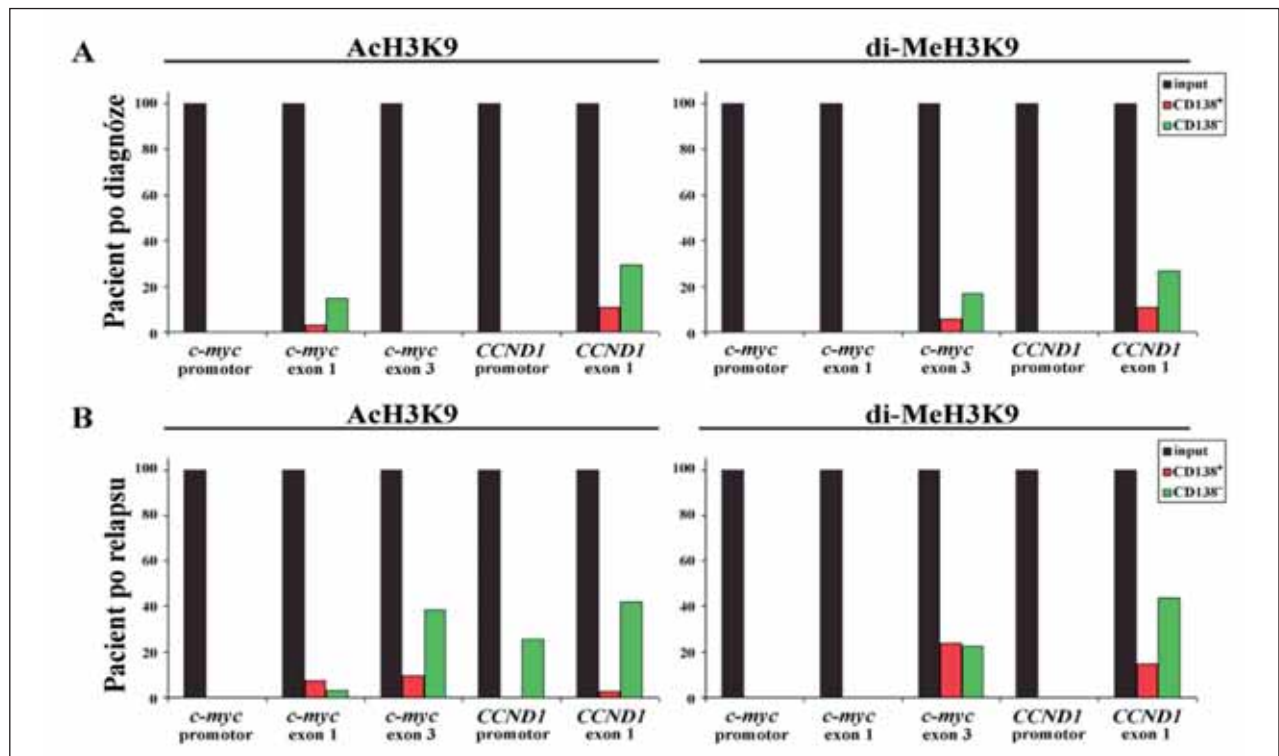
Výsledky epigenetických analýz

A) Změny v epigenetických modifikacích histonů u pacientů s diagnostikovaným MM

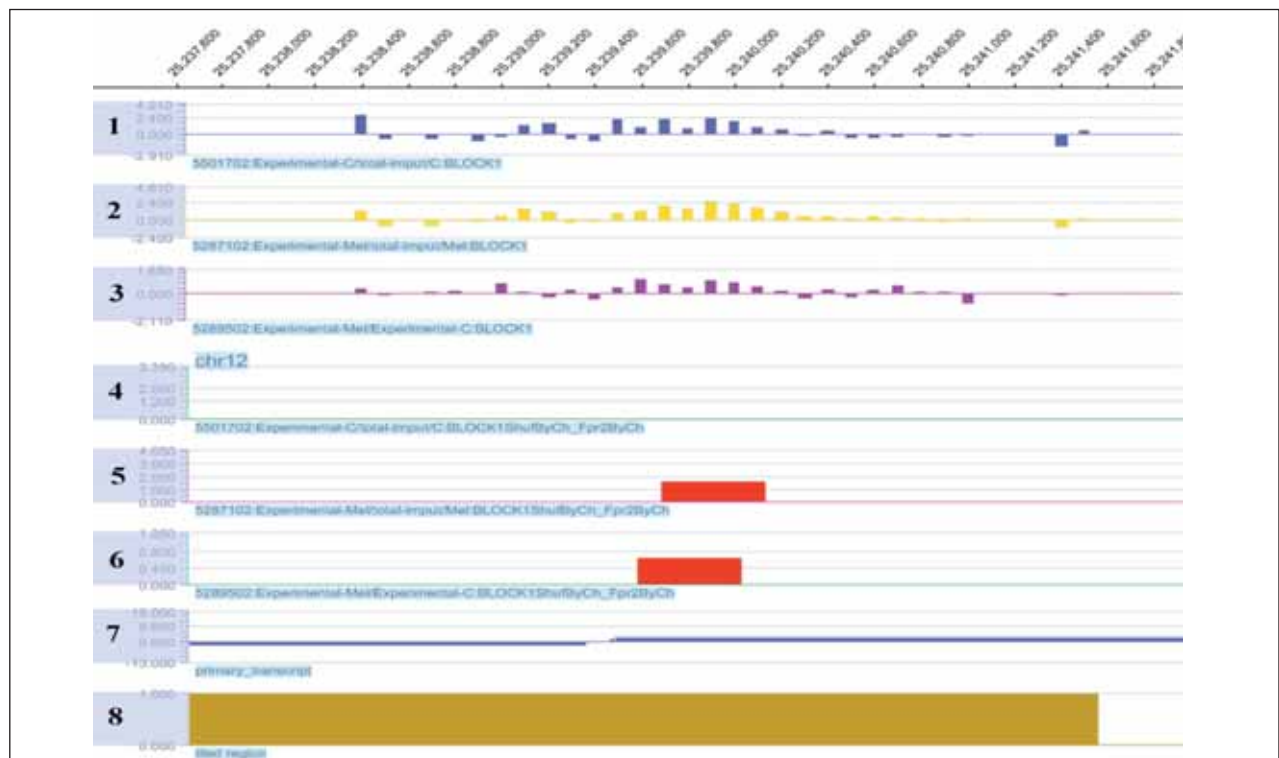
U buněk vybraných pacientů, s infiltrací CD138⁺ buněk v kostní dřeni vyšší než 80 %, byla provedena chromatinová imunoprecipitace (ChIP). Změny v epigenetických profilech CD138⁺ buněk byly porovnávány s CD138⁻

frakcí buněk každého pacienta a s ChIP-DNA získanou z lymfocytů periferní krve zdravých dárců. U některých pacientů jsme zjistili zvýšenou H3K9 dimethylaci v c-myc a CCND1 lokusech, obzvláště v CD138⁺ frakci. Ve většině případů CD138⁻ frakce a u lymfocytů periferní krve nebyla zjištěna H3K9 dimethylace ve vybraných lokusech, které jsou prognosticky významné z hlediska MM. U čtyř pacientů jsme pozorovali různé změny v H3K9 acetylaci a dimethylaci a tyto změny byly velmi heterogenní, pravděpodobně ovlivněné terapií. CD138⁺ frakce, získaná z kostní dřeně pacientů, byla navíc často H3K9 acetylována, zatímco CD138⁻ buňky a lymfocyty byly deacetylovány v promotorech a vybraných exonech genů c-myc a CCND1. Zvýšená acetylace, především v promotorech genů, je obecně spojována se zvýšenou expresí genů. V našem případě to byly geny zodpovědné za regulaci buněčného cyklu, tudíž za buněčnou proliferaci. Přítomnost H3K9 dimethylace, zodpovědné za utlumení transkripce,

příklady využití



Obrázek č. 1: ChIP-PCR analýza H3K9 acetylace a H3K9 dimethylace u CD138+ a CD138- buněk získaných z kostní dřeně pacienta s diagnostikovaným MM. Analýza byla provedena v čase diagnózy MM (A) a po léčbě thalidomidem a po relapsu onemocnění (B). Zvýšená H3K9 acetylace především v oblasti CCND1 upozorňuje na zvýšenou expresi CCND1 genu, která je často spojována s nepříznivou prognózou MM.



Obrázek č. 2: Příklad ChIP-on-chip analýzy (NimbleGen, Systems, Inc., USA) podle RefSeq database (2006-07-18_HG18_RefSeq_promoter) stanovující H3K9 acetylaci v promotoru genu CASC1. Tento lokus nebyl významně acetylován v kontrolních buňkách myelomové linie, zatímco melphalan indukoval rozsáhlou H3K9 acetylaci v této oblasti genomu. Řádky 1-3 představují log2poměr pro srovnání kontrolní ChIP-DNA a vstupní DNA (1), dále srovnání melphalan ChIP-DNA a vstupní DNA (2) a jako další ověření byly společně hybridizovány vzorky kontrolní ChIP-DNA a melphalan ChIP-DNA (3). Řádky 4-6 vyjadřují tzv. "false discovery rate (FDR) score" pro řádky 1-3; červený sloupec ukazuje $FDR \leq 0,05$, čili statisticky významný rozdíl. Řádek 7 ukazuje primární transkript podle RefSeq databáze a řádek 8 ukazuje oblasti blízké promotoru studovaného genu CASC1.

ve vybraných oblastech genů u pacientů s MM představuje zajímavý epigenetický znak, jehož význam by měl být dále studován.

B) Vliv cytostatik na epigenom pacienta s diagnostikovaným MM

Pro naše analýzy se nám podařilo získat vzorky pacienta v době diagnózy MM, po následné terapii thalidomidem a po relapsu onemocnění. V druhém případě jsme zjistili zvýšený výskyt acetylace H3K9 ve vybraných sekvencích genu c-myc a CCND1 (Obrázek č. 1). Obzvláště exon 3 c-myc genu a promotor CCND1 genu byly významně H3K9 acetylovány po působení cytostatik a po relapsu. H3K9 dimethylace se vyskytovala v exonu 3 c-myc genu a exonu 1 CCND1 lokusu v čase diagnózy, ale thalidomid a relaps nezměnil profil této epigenetické modifikace (Obrázek č.1). U zmíněného pacienta nebyla zjištěna přítomnost často se objevujících translokací asociovaných s MM, a to t(11;14) a t(4;14), tudíž zmíněné epigenetické změny nejsou pravděpodobně spojené s těmito přestavbami chromozómů. Zvýšená acetylace v daném lokusu pravděpodobně ukazuje na zvýšenou transkripční aktivitu obou studovaných genů, především CCND1 u MM pacienta po léčbě thalidomidem a během relapsu.

C) Melphalan zvyšuje H3K9 acetylaci některých genů u myelomových buněčných linií

ChIP-on-chip analýza, cílená na promotory stovek genů, nám umožnila studovat H3K9 acylaci u myelomových buněk ovlivněných melphalanem, který se používá v léčbě mnohočetného myelomu. V našich experimentech melphalan významně modifikoval proliferační charakteristiky buněk. V těchto analýzách jsme se zaměřili na lokusy významné z hlediska diagnózy a prognózy MM. Zaměřili jsme se na lokus 1q21, jehož amplifikace je často asociovaná s nepříznivou prognózou (2, 4). Dále jsme analyzovali acetylační status genů RAN (6p22.3), ZHX-2 (8q24.13), CHC1L (13q14.2), jejichž nestandardní exprese byla spojována s rychlým relapsem onemocnění (3). Dále jsme studovali H3K9 acetylaci u lokusů CCND1, c-myc, Rb1 a TP53. Velmi nízká H3K9 acetylace byla zjištěna pro oblast 1q21 zahrnující lokusy BCL-9, MCL-1, JTB a IL6R. Na druhou stranu AF1Q gen, rovněž mapován v této oblasti, byl silně acetylován, ale melphalan neměnil acetylační

profil tohoto genu. Nízká H3K9 acetylace byla pozorována u genů RAN, ZHX-2, CCND1, Rb1, avšak TP53 nádorově supresorový gen byl charakteristický vysokou mírou H3K9 acetylace. V mnoha lokusech bylo zjištěno, že melphalan zvyšuje studovanou epigenetickou modifikaci, takovým příkladem je CASC1 gen (cancer susceptibility candidate 1), jehož zvýšená H3K9 acetylace po působení melphalanu je uvedena v Obrázku č.2.

Diskuze a závěr:

V uvedených příkladech jsme analyzovali změny v epigenetických profilech pacientů s diagnostikovaným MM. Zaměřili jsme se především na hlavní znak transkripčně aktivních lokusů, a to na H3K9 acylaci a znak heterochromatinu H3K9 dimethylaci. U čtyř pacientů, jejichž vzorky byly vhodné pro ChIP analýzy, jsme zjistili nejednotný profil epigenetických modifikací v promotorech a exonech c-myc a CCND1 genů. Pomocí ChIP-on-chip analýz jsme došli k závěru, že melphalan zvyšuje acylaci v promotorech mnoha genů, které byly studovány u vybrané myelomové buněčné linie. Zvýšenou H3K9 acylaci v c-myc a CCND1 genech jsme rovněž pozorovali u pacienta, který byl léčen thalidomidem.

V experimentech, které byly publikovány Wachtersem et al. 2005 (5), bylo ukázáno, že melphalan, používaný v léčbě MM, má schopnost indukovat vazby mezi řetězcí DNA, stejně tak jako to bylo popsáno například pro cisplatinu. V práci Bártová et al. 2003 (1) jsme studovali vliv cis-platiny na numerické aberace a strukturu TP53 a Rb1 genů. V tomto případě jsme zjistili významné změny v jaderném uspořádání vybraných lokusů. Z tohoto důvodu byl testován melphalan a jeho vliv na genom a epigenom u myelomových buněčných linií. Jak již bylo uvedeno, melphalan u MM linií a pravděpodobně i thalidomid u pacienta zvyšují H3K9 acetylaci, tudíž transkripční aktivitu některých lokusů. Výsledky těchto experimentů tedy naznačují, že ChIP analýzy by mohly v budoucnu rozšířit poznání klinického výzkum, který testuje vliv cytostatik na expresi různých klinicky významných genů.

Poděkování

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

Literatura

1. Bártová E., Kozubek S., Gajová H. et al. Cytogenetics and cytology of retinoblastomas. J Cancer Res Clin Oncol. 2003;129:89-99.
2. Hanamura I., Stewart J.P., Huang Y. et al. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. Blood. 2006;108:1724-1732.
3. Harousseau J.L., Shaughnessy J. Jr., Richardson P. Multiple myeloma. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2004;237-256.
4. Sonneveld P. Gain of 1q21 in multiple myeloma from bad to worse. Blood. 2006;108:1426-1427.
5. Wachters F.M., Wong L.S., Timens W. et al. ERCC1, hRad51, and BRCA1 protein expression in relation to tumour response and survival of stage III/IV NSCLC patients treated with chemotherapy. Lung Cancer. 2005;50:211-219.