



دراسة مثبطات جينات mTOR كدلالة لمقاومة ادوية عديدة في  
مقاومة ادرياميسين في خلايا مرض سرطان الدم الحاد AML

مقدمة من

سارة محمد ابراهيم

رسالة مقدمة للحصول علي درجة الدكتوراة في الفلسفة في الكيمياء الحيوية

أشرف

الأستاذ الدكتور/ جلال الدين اعظم

الأستاذ الدكتور/ عادل محمد ابوزناده

كلية العلوم

جامعة الملك عبد العزيز

جدة- المملكة العربية السعودية

١٤٤٠هـ - ٢٠١٨م

## المستخلص

اللوكيميا النخاعية الحادة (AML) هو مرض عدواني وغير متجانس يتميز بانتشار غير طبيعي واختلال في التمايز بين الخلايا النخاعية المبكرة. بالنسبة لمعظم مرضى اللوكيميا، لا تزال النتيجة سيئة مع معدلات انتكاس عالية. الأسباب الرئيسية لفشل العلاج الكيميائي للوكيميا النخاعية الحادة هي الوفيات المتعلقة بالمعالجة والمقاومة الكيميائية، وغالبا ما تنتج عن الإفراط في التعبير لبروتينات موجودة عبر الغشاء الخلوي والتي تنتمي إلى عائلة ناقلات ترتبط بالأدينوسين ثلاثي الفوسفات الكاسيت (ABC)، وخاصة ABCG2، ABCB1، و ABCB1. ومن المعروف أن هذه البروتينات تدفق مجموعة من المواد الكيميائية، بما في ذلك العلاجات الكيميائية المضادة للسرطان. وقد تبين أن زيادة التعبير عن ABCB1 هو مؤشر سلبي لتشخيص المرض، وله تأثير كبير على كمون المرض وبقاء المريض على قيد الحياة. وقد تم تطوير عدد من مثبطات مضخات التدفق ABC على مر السنين، ولكن كانت لهم نتائج مخيبة للأمل على المستوى الإكلينيكي. ولذلك هناك حاجة لاكتشاف جزيئات جديدة أكثر أمنا وفعالية في عكس مقاومة الأدوية السريرية للوكيميا النخاعية الحادة.

لذلك كان التركيز في الوقت الحالي على تحديد الجزيئات المقاومة للعلاجات الكيميائية واستخدام استراتيجيات جديدة لإعادة الاستجابة للعلاج الكيميائي في AML. في هذا الصدد، قمنا بتطوير خلايا AML - K562 / ADR200 و K562 / ADR500، مع مستويات متفاوتة من مقاومة الأدريناميسين (ADR) وأيضا لها مقاومة متعددة للأدوية (MDR). كشف تنميط الترانسكريبتوم بواسطة ميكروأري والتهجين الجينومي المقارن (aCGH) ارتفاع تعبير الجين ABCB1 كآلية أساسية لل MDR. وقد تم تأكيد زيادة تعبير ABCB1 بواسطة تفاعل البوليميريز المتسلسل (qRT-PCR) (PCR) وسجل ويسترن.

بعد ذلك، فحصنا مثبطات mTOR الكلاسيكية (rapalogs) مثل راباميسين، إفارلمس، ريدافورولمس، تيمسرولمس ومثبطات كينيز الرئيسية ل mTOR مثل CZ415، WYE-354، PP242 جنبا إلى جنب مع مثبط PI3K / mTOR المزدوج، PKI-402، لقدرتها على تعديل نشاط الناقل ABCB1 على أساس تدفق رودامين (R6G). بعد الفحص

الأولي، قمنا بالتحقيق من دور rapalogs و WYE-354 ، في عكس MDR الناجم عن ABCB1 في المختبر. بالإضافة إلى ذلك، قمنا بدراسة الآليات الخلوية مثل تثبيط دورة الخلية وموت الخلايا المبرمج. راباميسين، إفارلمس، ريدافورولمس، تيمسرولمس و WYE-354 تعيد حساسية خلايا اللوكيميا بشكل فعال إلى Adr، في تركيزات غير سامة للخلايا. كما أن rapalogs و WYE354 تزيد تراكم R6G داخل الخلايا في الخلايا المقاومة وليس في خلايا K562 الأصلية. وقد تم تحديد آليات متعددة مثل تثبيط دورة الخلية G2 / M ، وتحفيز موت الخلايا المبرمج وتثبيط تعبير البروتين ABCB1 للإسهام في التحفيز الكيميائي من قبل الأدوية. وعلاوة على ذلك، فقد تبين أن جميع رابالوجس الأربعة و WYE-354 كانت مواد متفاعلة مع ABCB1 و راباميسين، إفارلمس و WYE-354 لتنشط نشاط ABCB1 ATPase عند تركيز منخفض بينما لوحظ التحفيز عند التركيز الأعلى. أظهر تحليل الدونجج درجة سالبة عالية للغاية لجميع الأدوية إلى نموذج تجانس ABCB1 الإنسان (hABCB1) مع الفأر. تم التحقق من صحة النتائج بشكل أكبر خارج الجسم الحي بإضافة إيفرمولمس أدى لزيادة سمية ADR في عينات AML الأولية، والتي ترتبط مع زيادة تعبير ABCB1.

هذه النتائج تسلط الضوء بوضوح على الأهمية السريرية الهائلة للجمع بين مثبطات mTOR، ولا سيما rapalogs مع علاجات كيميائية للتغلب على ABCB1.



## Studying mTOR inhibitors as modulators of multidrug resistance in Adriamycin resistant AML cell lines

**By**

**Sara Mohammed Ibrahim**

**A thesis submitted for the requirement of the degree of Doctor of Philosophy in  
Biochemistry**

**Supervised By**

**Prof. Jalaluddin A. Khan**

**Prof. Adel M. Abuzenadah**

**FACULTY OF SCIENCES  
KING ABDULAZIZ UNIVERSITY  
JEDDAH – SAUDI ARABIA  
1440H–2018G**

**Abstract**

Acute myeloid leukemia (AML) is an aggressive and heterogeneous disease characterized by the abnormal proliferation and impaired differentiation of the early myeloid cells. For most AML patients, outcome remains poor with high relapse rates.

The major reasons for the failure of AML chemotherapy are treatment related mortality (TRM) and chemoresistance, often resulting from the overexpression of ATP binding cassette (ABC) transmembrane proteins, particularly ABCB1, ABCG2 and ABCC1. These proteins are known to efflux an array of chemicals, including anticancer chemotherapeutics. Increased expression of ABCB1 has been shown to be an unfavorable prognostic factor, significantly affecting the complete remission (CR) and overall survival (OS) in AML. A number of inhibitors of the ABCB1 efflux pumps have been developed over the years, but at the clinical level they had disappointing results. Therefore, there is a need for the discovery of newer agents that are safe and effective in reversing clinical drug resistance in AML.

The key focus of the present work was to profile the molecular determinants of Adriamycin (Adr) resistance and employ novel strategies to restore chemosensitivity in AML. In this regard, we first developed AML cell lines – K562/Adr200 and K562/Adr500, with varying levels of Adr resistance. These cell lines also displayed multi-drug resistance (MDR). Comparative genomic hybridization (aCGH) and transcriptome profiling by microarray revealed amplification of the genomic region and subsequent upregulation of ABCB1 gene expression as the underlying mechanism of the observed MDR. ABCB1 overexpression was further confirmed by quantitative real time PCR (qRT-PCR) at the mRNA level and western blot analysis at the protein level.

Next, we screened the classical mTOR inhibitors (rapalogs) i.e. rapamycin, everolimus, temsirolimus, ridaforolimus and the mTOR kinase inhibitors such as PP242, WYE-354, CZ415, along with the dual PI3K/mTOR inhibitor PKI-402, for their ability to modulate

ABCB1 transporter activity based on the efflux of rhodamine 6G (R6G), a fluorescent substrate of ABCB1. All the inhibitors, except PP242, potently blocked ABCB1 mediated R6G efflux in K562/Adr200 cells. Followed by the preliminary screening and based on the intrinsic cytotoxicity of the inhibitors, we investigated the role of rapalogs and WYE-354 in reversing MDR induced by ABCB1 *in-vitro*. Cellular mechanisms such as cell cycle arrest and apoptosis were additionally characterized.

Rapamycin, everolimus, temsirolimus, ridaforolimus and WYE-354 effectively resensitized MDR leukemic cell lines to Adr, at sub-cytotoxic concentrations. Our results show that the rapalogs and WYE-354 are potent substrates of ABCB1, stimulating ABCB1-ATPase activity in a concentration dependent manner. Docking analysis revealed a highly negative binding score for all the rapalogs and WYE-354 to the human ABCB1 (hABCB1) mouse homology model, indicating their strong interactions with the ABCB1 protein. The results were further validated *ex-vivo* wherein addition of everolimus, a clinically approved rapalog, increased Adr toxicity in primary AML samples that showed higher ABCB1 expression.

These findings clearly highlight the immense clinical significance of combining mTOR inhibitors, particularly rapalogs, with chemotherapeutic agents to overcome ABCB1 mediated MDR in AML.