



ASSESSMENT OF THE EFFECT OF MITOTANE ON EXPRESSION PROFILE  
OF THE GENES INVOLVED IN MITOCHONDRIAL METABOLISM IN HUMAN  
ADRENOCORTICAL, LUNG, BREAST AND COLON CANCER CELL LINES

**PhD thesis**

**Author: Urszula Waszut**

**Supervisor: dr hab. n. med. Dorota Dworakowska**

Department of Nuclear Medicine

Chair of Nuclear Medicine and Radiology Informatics

Faculty of Health Sciences with Subfaculty of Nursing

And Institute of Maritime and Tropical Medicine

Head of the Department: Prof. dr hab. n. med. Piotr Lass

Medical University of Gdańsk

**Gdańsk 2017**



OCENA WPŁYWU MITOTANU NA EKSPRESJĘ GENÓW  
ZAANGAŻOWANYCH W REGULACJĘ METABOLIZMU  
MITOCHONDRIALNEGO W LUDZKICH LINIACH KOMÓRKOWYCH RAKA  
KORY NADNERCZA, PŁUC, PIERSI I JELITA GRUBEGO

**Praca Doktorska**

**Autor: Urszula Waszut**

**Promotor: dr hab. n. med. Dorota Dworakowska**

Zakład Medycyny Nuklearnej

Katedra Medycyny Nuklearnej i Informatyki

Radiologicznej

Wydział Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa

i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Piotr Lass

Gdański Uniwersytet Medyczny

**Gdańsk 2017**

## Abs tract

**Background:** Adrenocortical carcinoma is a rare disease with poor prognosis. The most effective agent is mitotane, which selectively limits growth and bioactivity of adrenal tissue, but the basis for this action has yet to be established. It has direct effects on mitochondria, which have unique features in steroidogenic tissue and are known to be important in development of malignancy and in apoptosis. It might cause change in expression of genes related to mitochondrial energy metabolism, which is known to be disturbed during cytotoxic and apoptotic processes. There are many known changes in gene expression in adrenal tumours, based on use of fresh or snap-frozen material. If FFPE could be used, this would greatly expand the potential for study of these rare, very heterogeneous cancers, enabling exploitation of archival material and correlation with the histology of different regions of the tumour.

**Aims:** To compare expression levels of a panel of 84 genes involved in mitochondrial energy metabolism between human adrenocortical (H295R), breast (MCF-7), adolescent colorectal (HKe-3) and lung (H195R) cell lines under basal conditions and after exposure to the adrenolytic agent mitotane and to consider whether the greater sensitivity to this agent of adrenal cells involves different expression to that in other cancer cells. In addition, to develop extraction of mRNA from FFPE with the aim of achieving sufficient quality for gene expression studies.

**Materials and methods:** Gene expression was assessed in the four cultured cell lines after proliferation experiments using the *Mitochondrial Energy Metabolism Plus PCR Array* from Qiagen which includes genes of the respiratory complexes I - V and associated mitochondrial proteins. Extraction of mRNA from FFPE adrenocortical carcinoma samples was optimized, with testing of quality at each step and final testing on an mTOR array in comparison with normal adrenal tissue.

**Results:** At baseline, there was a range of activities of mitochondrial energy metabolism genes in the ascending order: MCF-7, H295R, H1975, Hke-3. Mitotane led to more than two fold overexpression in a number of subunits of complexes I - V in both H295R and Hke-3, which were the most sensitive cell lines. This 'mitotane-sensitive' group showed statistically significant overexpression of six genes of complexes I and III, which are potentially ROS-generating and four genes of complex V, which generate high energy phosphates, together with four genes of the COX complex. In the two less sensitive cell lines, only one gene, in complex II, was upregulated. FFPE-derived RNA was successfully prepared for gene expression analysis. The most important findings were several-fold over-expression of VEGFs (VEGF C 16 fold change) and strong downregulation of PIK3CD (37 fold change) which encodes a protein important for immunology interaction in tissue, as well as upregulation of some important downstream effectors of the TRK receptor.

**Conclusions:** For adrenal H295R cells, there were no clear differences in comparison with the other cell lines, with genes of all complexes represented and no single group dominating. However, upregulation in respiratory complex subunits after mitotane suggests this is a key event in the processes of cell stasis and death, perhaps via increased generation of ROS and high energy phosphates, leading to loss of mitochondrial continuity and cytochrome c leakage, Ca<sup>2+</sup> influx, and increased expression of proapoptotic COX subunits and GADD45B. The preliminary findings on gene expression using material from FFPE blocks do indicate that this methodology can make an important contribution to future studies.

*Keywords: mitotane, mitochondrial energy metabolism, cell culture, gene expression, apoptosis, adrenocortical carcinoma*

## Streszczenie

**Wprowadzenie** Rak kory nadnerczy jest rzadką chorobą o złym rokowaniu. Najbardziej skutecznym stosowanym lekiem jest mitotan, który ogranicza aktywność biologiczną i wzrost komórek raka kory nadnerczy, jednak spójny mechanizm jego działania nie został jak dotąd ustalony. Bezpośrednie obserwacje wykazały istotną rolę mitochondriów, które posiadają specyficzną budowę w tkankach steroidowych, ze względu na ich rolę w rozwoju nowotworu i programowanej śmierci komórek (apoptozie). Mitotan może powodować zmiany w ekspresji genów związanych z mitochondrialnym metabolizmem energetycznym, który wiadomo, że jest zakłócony w trakcie zmian cytotoksycznych i apoptozie. Wiele zmian w ekspresji genów zostało wykazanych przy użyciu mrożonej próbki guza, jednakże jeśli można by zastosować materiał parafinowany, znacząco zwiększa to potencjał badania tych rzadkich, bardzo heterogenicznych raków, umożliwiając wykorzystanie materiału archiwalnego i korelację z histologią różnych regionów guza.

**Cele:** Celem projektu było zbadanie poziomu ekspresji genów uczestniczących w mitochondrialnym metabolizmie energetycznym pomiędzy liniami komórkowymi raka kory nadnercza (H295R), piersi (MCF-7), jelita grubego (HKe-3) i płuca (H195R) w warunkach podstawowych i po ekspozycji na adrenolityczny mitotan. Rozważenie, czy występuje większa wrażliwość na ten czynnik w komórkach nadnerczy wiąże się z inną ekspresją tych genów. Dodatkowo sprawdzenie wystarczającej przydatności dla badania ekspresji genów mRNA izolowanego ze starych bloków parafinowych.

**Materiały i metody:** Ekspresję genów została zbadana w czterech liniach komórkowych w hodowli, po eksperymentach dotyczących proliferacji z wykorzystaniem macierzy qPCR Qiagen z genami biorącymi udział w metabolizmie mitochondrialnym, która zawiera geny kompleksów oddechowych I-V i powiązanych białek mitochondrialnych. Izolację mRNA z guzów parafinowych zoptymalizowano, testując jakość etapowo, ostatecznie przeprowadzony został eksperyment na macierzy mTOR w porównaniu z normalną tkanką nadnerczową.

**Wyniki:** Wyjściowa ekspresja genów metabolizmu mitochondrialnego wskazująca na jego aktywność jest rosnąca kolejno dla: MCF-7, H295R, H1975, HKe-3. Porównanie wpływu mitotanu na badane linie komórkowe, wykazała wiele zmian w ekspresji genów, w zróżnicowany sposób. Mitotan spowodował nadekspresję w podjednostkach kompleksów I -V zarówno w H295R jak i HKe-3, które były najbardziej wrażliwymi liniami komórkowymi. Ta grupa "wrażliwa na mitotan" wykazała statystycznie istotną nadekspresję sześciu genów kompleksów I i III, które mogą generować ROS i cztery geny kompleksu V, wytwarzające wysokoenergetyczne nukleotydy adeninowe i cztery geny kompleksu IV- COX. W dwóch mniej wrażliwych liniach komórkowych wystąpiła nadekspresja tylko jednego genu w kompleksie II. RNA z FFPE z powodzeniem został wykorzystany do analizy ekspresji genów. Najważniejsze wyniki to silna nadekspresja VEGFów i białka kodowanego przez PIK3CD, ważnego dla prawidłowych interakcji immunologicznych w tkance, a także nadekspresja niektórych ważnych efektorów receptora TRK.

**Wnioski** Dla linii H295R nie było żadnych wyraźnych tendencji, czy genów jednej dominującej grupy danego kompleksu oddechowego, w porównaniu do innych linii komórkowych, dla wyjściowej ekspresji metabolizmu mitochondrialnego. Jednakże nadekspresja genów kompleksów oddechowych sugeruje procesy, które mogą być kluczowe w procesie śmierci komórki jak zwiększona produkcja wolnych rodników, czy wysokoenergetycznych fosfataz i przepływ jonów  $Ca^{2+}$ , prowadzące do utraty ciągłości błony mitochondrialnej, oraz promujący apoptozę wzmożony wzrost ekspresji podjednostek oksydazy cytochromowej i czynnika GADD45B. Wstępne opracowanie dotyczące ekspresji genów za pomocą materiału z bloków parafinowych wskazują, że ta metodologia może w istotny sposób przyczynić się do przyszłych badań.

*Słowa kluczowe:* mitotan, mitochondrialny metabolizm energetyczny, hodowle komórkowe, ekspresja genów, apoptoza, rak kory nadnercz

