

GELDANAMİSİN VE TRİKOSTATİN A'NIN İNSAN MESANE KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE SİNERJİSTİK ETKİSİ

THE SYNERGISTIC EFFECT OF GELDANAMYCIN AND TRICHOSTATIN A ON HUMAN BLADDER CELLS

Nuray VAROL, Nuran ÇOBAN

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

ÖZ

AMAÇ: Isı şok protein 90 (İŞP), ATP-bağımlı moleküler bir şaperon olup kanserin temel özellikleri olarak tanımlanan çok sayıdaki onkogenik sinyal proteinlerinin stabilitesi ve fonksiyonu için gereklidir. Bu nedenle, İŞP90 kanserin önlenmesi ve tedavisi için moleküler bir terapötik hedef olarak görülür. Geldanamisin (GA) ilk doğal İŞP90 inhibitörüdür. İŞP90 inhibisyonu, kanser hücrelerinde apoptosisin indüklenmesine neden olur ve kemoterapi direncinde bir azalmaya eşlik edebilir. Bu çalışmada amacımız, Geldanamisin (GA) ve Trikostatin A (TSA)'ın tek başlarına ve/veya kombinasyonlarının kullanımının, insan mesane kanser hücre hattı T24'de transkripsiyonel ve protein düzeyinde apoptotik yolak üzerindeki sinerjik etkilerini araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Geldanamisin (0–30 µM)'nin hücre canlılığı üzerine olan etkisi WST1 aracılığıyla belirlenmiştir. Belirtilen ilaçların tek başlarına ve birlikte kullanımlarının CASP3 geninin transkripsiyonel ifade düzeylerindeki farklılıklar kantitatif eş zamanlı PCR yöntemiyle belirlenmiştir. Kaspaz3, Bax ve Bcl2 genlerinin transkripsiyonel ifade düzeyleri ise western blot yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR: Antiapoptotik gen Bcl2 ifadenmesi, GA ve GA+TSA kombinasyonu kullanımı sonrasında önemli derecede azalmakta iken, kaspaz-3 ve Bax ifadenmesi kontrole göre transkripsiyonel düzeyde artmıştır. Aynı zamanda, Cas3 mRNA düzeyi de kontrole göre artmıştır (p<0.05).

SONUÇ: GA+TSA kombinasyonu hücre proliferasyonunu azaltmakta ve apoptoza indüklediği görülmüştür. Bu nedenle, İŞP90 inhibitörlerinin mesane kanseri tedavisinde yeni bir yaklaşım sunabileceğini düşünmekteyiz.

ANAHTAR KELİMELEER: İŞP90 inhibitörü, Geldanamisin, Apoptoz, Mesane Kanseri

ABSTRACT

OBJECTIVE: Heat shock protein 90 (HSP90) is an ATP-dependent molecular chaperone required for the stability and function of numerous oncogenic signaling proteins that determine the hallmarks of cancer. Therefore, HSP90 is known as a molecular therapeutic target for the prevention and treatment of cancer. Geldanamycin (GA) was the first identified natural Hsp90 inhibitor. Inhibition of Hsp90 results in the induction of apoptosis in cancer cells, and may be accompanied by a reduction in chemotherapy resistance. This study is aimed to investigate, on transcriptional and protein levels, the synergic effects of unaccompanied and/or combined use of Geldanamycin (GA) and Trichostatin A (TSA) on the apoptotic pathway of human bladder cancer cell line T24.

MATERIAL AND METHODS: The effect of geldanamycin (0–30 µM) on cell viability were determined by WST-1. The variation in the expression levels of CASP3 genes was transcriptionally determined by quantitative real-time PCR. The translational expressional levels of caspase-3, Bax and Bcl2 genes were performed by western blot method.

RESULTS: The use of GA alone and GA+TSA combination significantly down-regulated the antiapoptotic gene Bcl2 while Caspase-3 and Bax expression were increased at translational levels. Cas3 mRNA level was also increased with respect to control (p<0.05).

CONCLUSIONS: The use of geldanamycin+TSA combination reduced cell proliferation and induced apoptosis. Therefore, it can be suggested that HSP90 inhibitors may offer a new approach to consider in the treatment of bladder cancer.

KEYWORDS: HSP90 inhibitor, Geldanamycin, Apoptosis, Bladder Cancer

GİRİŞ

Mesane (idrar kesesi) kanseri, dünyada görülme sıklığı açısından beşinci sırada yer almakta olup kanser türlerinin %4'ünden fazlasını oluşturmaktadır. Erkeklerde prostat kanserinden sonra en sık rastlanan genitoüriner kanser türüdür. (1,2). Mesane kanser patogenezi bakıldığında tek bir tümör hücresinde çok sayıda genetik ve epigenetik alterasyonlar çoklu sinyal yollarının deregülasyonuna yol açmaktadır (2,3). Hücre proliferasyonundan sorumlu sinyal yollarındaki aberasyonlara ilaveten mesane kanserinin de içerisinde yer aldığı çok çeşitli kanser türünde ısı şok proteinleri (İŞP) aşırı ifadenmektedir. Hücrel homeostazinin sürdürülmesinde önemli rol oynayan bu proteinler primer olarak protein katlanmasından sorumludur. Normal fizyolojik şartlar altında düşük düzeyde ifadelenen bu proteinler, hipertermi, ağır metal iyonlarına maruziyet, hipoksi gibi hücrel stres şartlarında ifadelenmeleri hızlı bir şekilde artar. Böylece bu proteinler, mesane kanser hücrelerinin çeşitli hücrel stres şartları altında yaşamasına ve çoğalmasına önemli katkı sağlar. Isı şok proteinlerinin aşırı ifadenmesi genomik mutasyonun varlığına rağmen kanser hücrelerini apoptoza karşı korur. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi normal ürotelyum ile karşılaştırıldığında mesane kanser hücrelerinde ısı şok proteinlerinin ifadenme düzeyi oldukça artmıştır. Bu nedenle araştırmacılar ısı şok proteinlerinin mesane kanserinin tanı ve prognozu için bir biyobelirteç olarak kullanılabilirliğine odaklanmışlardır. Isı şok proteinleri, immun sistemin önemli modulatörleri olmasından dolayı yeni mesane kanser tedavi stratejilerinin belirlenmesinde İŞP'leri önemli hedefler haline gelmektedir, özellikle modern kemoterapötikler ve radyoterapötikler ile birlikteki sinerjistik etkilerine odaklanılmıştır (2,4,5). Bu çalışmamızda amacımız, İŞP90 inhibitörü olan Geldanamisin'in (GA) tek başına ve/veya histon deasetilaz inhibitörü Trikostatin-A (TSA) ile birlikte kullanımının mesane kanser hücre hattı T24 hücreleri üzerine apoptotik etkisini incelemektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Kültürü

Bu çalışmadaki, T24 insan mesane hücre hatları, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ece KONAÇ'tan temin edilmiştir. T24 hücreleri, %10 FBS içeren McCoy's 5A besiyerinde %5 CO₂'li ortamda kültüre edildi. Her bir deney 3 kere tekrar edildi.

Hücre Canlılığının Belirlenmesi

T24 hücreleri 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 105 hücre/ kuyu olacak şekilde ekildi, bir gece %1'lik McCoy's 5A besiyerinde inkübe edilerek hücrelerin yapışmasını takiben besiyeri uzaklaştırıldı. Daha sonra Geldanamycin (CST; Kat. No: 9843S) birlikte çeşitli konsantrasyonları (0-30 µM) ile hazırlanmış %10'luk McCoy's 5A besiyerinde 0-24 saat süreyle 370C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Belirtilen sürenin sonucunda her 100 µl için her bir kuyucuğa 10 µl WST-1 solüsyonu (Roche; Kat. No: 001 644 807) eklendi ve formazan ürününün oluşturduğu renk değişimi 4 saat sonunda spektrofotometre ile 450 nM dalga boyunda belirlendi. Negatif kontroller kör olarak kullanıldı.

Hücrelerden total RNA izolasyonu

6 kuyulu kültür kaplarına 1x10⁶ hücre/kuyu şeklinde ekilen T24 hücreleri inkübasyon sürelerinin ardından Tripure Isolation Reagent (Roche, Almanya) ile total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'lar Nanodrop cihazı ile miktar (ng/µl) ve saflık ölçümleri yapıldı ve kullanılabildiği kadar -800 °C'ye kaldırıldı. kaldırıldı.

Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Elde edilen 1 mg total RNA'lar, RT2 HT First Strand cDNA sentez kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak cDNA'ya çevrildi. Reaksiyon sonucu cDNA örnekleri üzerine 91 µl steril H₂O-PCR grade (Qiagen, Almanya) eklendi ve Real-Time PCR'da kullanılmaya kadar -200 °C'lik derin dondurucuda saklandı.

Genlerin İfade Edilmesinin Real-Time PCR ile Ölçümü

CASP3 geninin mRNA miktarları, Real-Time PCR yöntemi ile Rotor Gene Q cihazı kullanılarak yapıldı. Amplifikasyonlar 25 µL toplam tepkime hacmi içerisinde; cDNA, bölgeye özgü primerler ve RT2 SYBR Green Mastermix karışımı (Qiagen, Almanya) ve steril H2O-PCR grade kullanılarak gerçekleştirildi. CASP3 geninin ifadenmesini normalize etmek için GAPDH mRNA düzeyi referans olarak alındı. Erime eğri analizi tek bir ürünü doğruladı.

Total Protein İzolasyonu

GA ve/veya TSA kombinasyonları belirlenen sürelerin dolmasını takiben T24 hücrelerinden total protein izolasyonu yapılmıştır. Kısaca, inkübasyon sürelerinin dolmasını takiben hücreler 1 mM PMSF içeren 1X Ripa Lizis Buffer (Cell Signaling, Technology; USA) ile lizise uğratıldı. Sonrasında buz üzerinde sonike edildikten sonra 14.000 x g'de 10 dk santrifüjden edildi. Süpernatant yeni tüplere aktarıldı, BCA ile miktar tayini yapıldı ve western blot aşamasına kadar -800 °C'ye saklandı.

Western blot yöntemi ile protein düzeylerinin belirlenmesi

Eşit miktardaki protein örnekleri SDS-PAGE ile ayrıldıktan sonra ıslak transfer aracılığıyla PVDF membrana aktarıldı. Membranlar, oda sıcaklığında 1 saat süreyle bloke edici tampon [Tris-tamponlu salin (TBS),% 0.1 Tween-20 ve % 5 düşük yağlı kuru süt] içinde inkübe edildi, ardından primer antikolar anti-Kaspaz-3 ve anti-β-aktin (yükleme kontrolü) antikoları (1: 1.000 dilüsyon; Cell Signaling Technology, USA) ile bir gece 4 °C'de hibridizasyona bırakıldı. TBS /% 0.1 Tween 20'deki üç yıkamanın ardından, membran 1 saat boyunca oda sıcaklığında sekonder antikor (1: 5,000 seyreltme, Cell Signaling Technology, USA) ile hibridizasyona tabi tutuldu. TBS/% 0.1 Tween 20'deki yoğun yıkamadan sonra, sinyaller, Luminata Forte Western HRP Substrate Kemilümensan Substrat (Merck Millipore, Almanya) kullanılarak, Chemidoc (BioRad) cihazında görüntüledi.

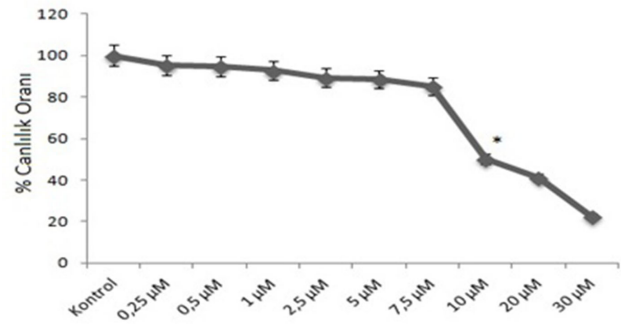
İstatistiksel Analiz

Kaspaz-3 mRNA düzeylerindeki doza ve zamana bağlı değişimler REST 2009 V2.0.13 istatistiksel programı ile karşılaştırıldı. P değerlerinin 0.05'den küçük olduğu değerler istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Geldanamisin'in hücre canlılığı sonuçlarının değerlendirilmesi

24 saat inkübasyon sonucunda T24 hücrelerinin IŞP90 inhibitörü Geldanamisin'e olan cevabının hücre canlılığı üzerine etkisi (**Şekil 1**) 'de gösterilmiştir. Buna göre Geldanamisin ile 24 saat muamele edilmiş T24 hücrelerinin doza bağlı olarak hücre proliferasyonunun azaldığı belirlenmiştir. Kullandığımız 1µM Geldanamisin konsantrasyonunda T24 hücrelerinin hücre canlılığını %90,7 iken 10 µM konsantrasyonunda ise %54,3 azaldığı görülmektedir. Sonuçlarımıza göre Geldanamisin için 24 saat için IC50 dozunun 10µM olduğu belirlendi.

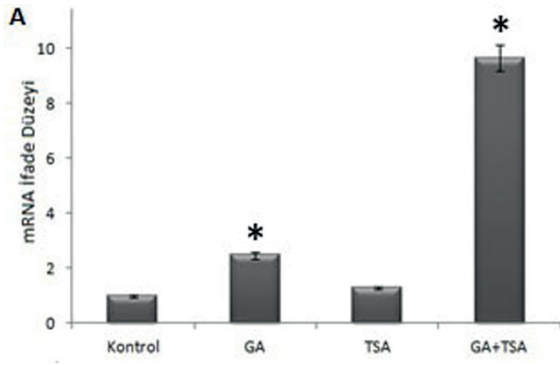


Şekil 1: T24 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Geldanamisin ile 24 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları.*; IC50 değeri.

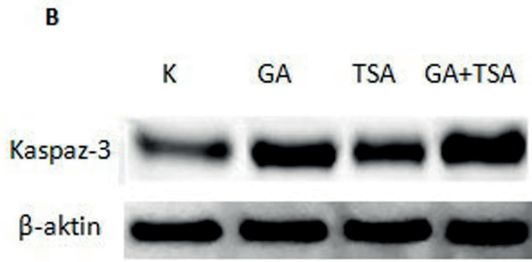
Geldanamisin uygulaması sonrasında Kaspaz-3 mRNA ve protein düzeyi

T24 mesane kanser hücrelerinin 24 saat 10 µM Geldanamisin uygulaması sonrasında CASP3 mRNA düzeyinde kontrole nazaran 2.46 katlık bir artış belirlenmiştir (p<0.05). 300 nM 24 saat TSA (6) uygulaması sonrasında ise kontrole nazaran 1,45 katlık bir artış olduğu belirlendi fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu. GA ve TSA'nın birlikte 24 saat uygulaması sonrasında ise CASP3 düzeyindeki artış kontrole göre 9.65 kat olarak belirlendi (p<0.05) (**Şekil 2A**).

GA ve GA+TSA 24 saat uygulaması sonrasında mRNA düzeyine paralel olarak Kaspaz3 protein düzeyinde de artma olduğu belirlendi (**Şekil 2B**).

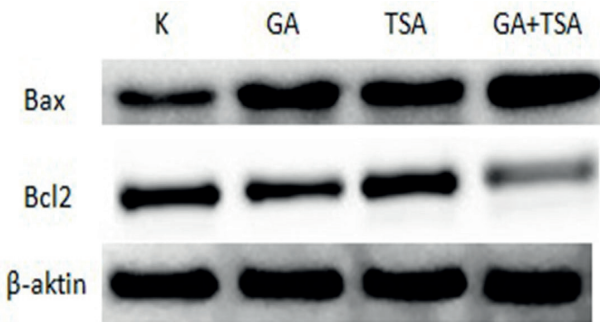


Şekil 2A: GA, TSA ve GA+TSA ile inkübasyonu sonrasında CASP3 mRNA düzeyindeki değişimler. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi,*, $p < 0,01$.



Şekil 2B: GA, TSA ve GA+TSA ile inkübasyonu sonrasında Kaspaz-3 protein düzeyindeki değişimler. β-aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı. GA, Geldanamisin; TSA, Trikostatin A, K, Kontrol.

GA+TSA hariç diğer örneklerde Bcl-2 düzeyinde önemli bir değişim gözlemlenmemiştir. GA+TSA 24. saat uygulaması sonrasında kontrole nazaran Bcl-2 protein düzeyinde azalma belirlenmiştir (**Şekil 3**).



Şekil 3: T24 hücrelerinin süre ve doz-bağımlı GA, TSA ve GA+TSA ile inkübasyonu sonrasında Bax ve Bcl-2 protein düzeyindeki değişimler. β-aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı. GA, Geldanamisin; TSA, Trikostatin A, K, Kontrol.

TARTIŞMA

IŞP90 ifadenmesi kanser hücrelerinde önemli

ölçüde artmaktadır. IŞP90'nın yüzlerce hedef proteini vardır ve hem yabancıl tip hem de mutant formlarına bağlanabilmesinden dolayı kanserogeneze önemli rol oynamaktadır. IŞP90'nın kanser hücrelerinde fonksiyonlarından biri apoptozu inhibe etmektir ve özellikle kemoterapötiklere dirençte de önemli rol oynamaktadır (2,4). Bu nedenle bu çalışmamızda ki hedefimiz Geldanamisin uygulaması sonrasında kanser hücrelerinin apoptotik mekanizmasında nasıl bir değişiklik meydana geldiğini araştırmaktır. Bu amaçla, GA ve/veya TSA uygulaması sonrasında T24 hücrelerinde apoptozu değerlendirmek için CASP3 mRNA'sı, kaspaz-3 ve Bax/Bcl2 protein oranını inceledik. Geldanamisin uygulaması sonrasında kontrole nazaran 24. saatlerde CASP3 mRNA'sı, Kaspaz-3 ve BAX protein düzeylerinde artış olmasına karşın aynı süre ve doz GA uygulaması sonrasında kontrole nazaran Bcl2 düzeyinde bir değişim gözlemlenmedi. GA+TSA uygulama sonrasında Bcl2 düzeyinde önemli azalma gözlemlenirken Bax ve Kaspaz-3 düzeylerinde kontrole nazaran bir artış gözlemlenmemiştir. Çalışmamızın sonucunda Geldanamisin uygulaması sonrasında aynı dozda aynı zaman aralıklarında BAX düzeyindeki artış veya BCL2 düzeyinde azalış gözlememiz Bax/Bcl2 oranı birden büyük olduğunu yani hücrelerin apoptoza yöneldiğini göstermektedir. Benzer şekilde TSA ile birlikte kombinasyonu sinerjistik olarak daha etkin bir şekilde hücrelerin apoptozu indüklemektedir. Bizim çalışmamızla uyumlu olarak Lee ve ark.'larında (7) over kanser hücrelerinde geldanamisin uygulaması sonrasında kontrole nazaran sitoplazmik ve mitokondrideki BAX oranında artış, sitoplazmik Bcl2 düzeyinde ise azalma belirlemiştir. Kolon kanseri hücre hattı HT29 hücrelerinde de benzer şekilde GA uygulaması sonrasında Bax düzeyinde artış ve Bcl2 düzeyinde azalma belirlenmiştir (8). Başka bir kolon kanseri hücre hattında (HCT116), GA uygulama sonrasında p53+/+ ve p53-/- hücrelerinde Bcl2 düzeyinde azalma belirlenmiştir (9). Karkoulis ve ark. (1)'ları çalışmada ise mesane kanser hücrelerinde (T24 ve RT4) Geldanamisin'in apoptozu hangi yolla indüklediğini araştırmışlardır. Bu amaçla, Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 proteinlerinin düzeyindeki değişimleri incelemiştir. 24

saat 1 μ M ve 10 μ M GA uygulaması sonrasında aktif kaspaz-8 ve aktif kaspaz-3 düzeyinde artış belirlenirken aktif kaspaz-9 düzeyinde önemli bir azalış belirlenememiştir. Bu sonuçlar göstermektedir ki, Geldanamisin hücreleri apoptoza dışsal yolak aracılığıyla indüklemektedir.

Sonuç olarak, Geldanamisin tek başına veya TSA ile birlikte kullanımı insan mesane kanser hücrelerinde apoptoza dışsal yolak aracılığıyla indüklemektedir. IŞP90 inhibitörlerinin kombinasyonel kullanımı mesane kanseri tedavisinde yeni bir yaklaşım olarak kullanılabilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından BAP 16.SAĞ.20 proje numarası ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Karkoulis, P.K., Stravopodis, D.J., Konstantakou, E.G., Voutsinas, G.E. (2013). Targeted inhibition of heat shock protein 90 disrupts multiple oncogenic signaling pathways, thus inducing cell cycle arrest and programmed cell death in human urinary bladder cancer cell lines. *Cancer Cell International*, 2013;13(1):11.
2. Chehab, M., Caza, T., Skotnicki, K., et al. Targeting HSP90 in urothelial carcinoma. *Oncotarget* 2015;6(11):8454-73.
3. Mitra, A.P., Cote, R.J. Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. *Annual Review of Pathology* 2009; 4:251-85.
4. Ischia, J., So, A.I. The role of heat shock proteins in bladder cancer. *Nature Reviews Urology* 2013; 10(7):386-95.
5. Ma, L., Sato, F., Sato, R., et al. Dual targeting of heat shock proteins 90 and 70 promotes cell death and enhances the anticancer effect of chemotherapeutic agents in bladder cancer. *Oncology Reports* 2014;31(6):2482-92.
6. Kiliccioglu I., Konac E., Varol N., Bilen CY. Proteasome and HDAC Inhibition Changes the Expression Levels of Bcl-2, Bcl-XL, Bim and Bik Proteins in Androgen-Independent PC-3 Cell Line. *Gazi Medical Journal* 2015;26:155-157.
7. Lee, C.S., Kim, Y.J., Lee, S.A., Myung, S.C., Kim, W. Combined effect of HSP90 inhibitor geldanamycin and parthenolide via reactive oxygen species-mediated apoptotic process on epithelial ovarian cancer cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012;111(3):173-81.
8. Mohammadi, A., Yaghoobi, M.M., Gholamhoseynian-Najar, A., Kalantari-Khandani, B., Sharifi, H., Saravani, M. HSP90 inhibitor enhances anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on HT-29 colorectal cancer cells via increasing BAX/BCL-2 ratio. *Cell Mol Biol* 2016;62(12):62-67.
9. Mcnamara, A.V., Barclay, M., Watson, A.J., Jenkins, J.R. HSP90 inhibitors sensitise human colon cancer cells to topoisomerase I poisons by depletion of key anti-apoptotic and cell cycle checkpoint proteins. *Biochem Pharmacol*, 2012;83(3):355-67.