

Rapamisin'in prostat kanseri hücre hatlarındaki etkisi

The effect of rapamycin in prostate cancer cell lines

Avcı Ç B¹ Süslüer Yılmaz S¹ Şığva Doğan Ö¹ Söğütlü F² Dündar M² Gündüz C¹

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İzmir, Türkiye

Özet

Amaç: Rapamisin, *Streptomyces hygroscopicus*'ten izole edilen, FKBP12 mTOR'a bağlanan bir antibiyotiktir. Rapamisin hem in vitro hem de in vivo kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmektedir. Bu çalışmada, insan prostat kanseri hücre modelinde rapamisin'in sitotoksik ve apoptotik etkileri değerlendirilip, telomeraz aktivitesi, EGFR ve VDR gen ekspresyonları üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: LNCaP, PC-3 ve DU 145 prostat kanseri hücre hatları *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*'da rapamisin ile muamele edilip inkübe edilmişlerdir. Ayrıca rapamisin'in sitotoksitesite tripan mavisi testi, XTT yöntemi ve apoptoz akrinin oranj-etidium bromid boyası ile incelenmiştir. hTERT, EGFR ve VDR genlerinin ekspresyonlarının kantifikasyonu yapılmıştır.

Bulgular: Apoptoz değerlendirildiğinde hücre hatlarında rapamisin'in IC₅₀ dozunda apoptoz artışı izlendi. Rapamisin'in LNCaP hücre hattında sitotoksitesite değerlendirildiğinde belirgin bir sitotoksitesite gözlemlendi. hTERT mRNA ekspresyonunda PC-3 hücre hattında düşüş belirlendi. Hücre hatlarında VDR ve EGFR gen ekspresyonları incelendiğinde; PC-3 ve DU 145' te VDR gen ekspresyonunda belirgin bir düşüş gözlemlendi. EGFR gen ekspresyon seviyesinde ise tüm hücre hatlarında düşüş saptandı. Bu çalışmada en dikkat çekici bulgu, prostat kanseri hücre hattı LNCaP'te VDR ekspresyonunun izlenilmemiş olmasıdır.

Sonuç: Prostat kanserinde yeni bir moleküler tedavi yaklaşımı gündeme getirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Rapamisin, prostat kanseri, hTERT, EGFR, VDR.

Summary

Aim: Rapamycin is an antibiotic isolated from *Streptomyces hygroscopicus* and binds with FKBP12 mTOR. Rapamycin inhibits proliferation of cancer cells in both in vitro and in vivo. It was purposed that cytotoxic, apoptotic effects be taken into consideration and the impact of telomerase activity, EGFR and VDR gene expressions were evaluated.

Materials and Methods: LNCaP, PC-3 and DU 145 prostate cancer cell lines were treated with rapamycin in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*. Cytotoxicity of the cell lines were analyzed with the Trypan Blue Dye test, XTT method and apoptosis with acridine orange-ethidium bromide staining. Quantification of hTERT, EGFR and VDR gene expressions was performed.

Results: Apoptosis was increased in cell lines with the IC₅₀ dose of rapamycin. When the cytotoxicity of rapamycin was evaluated in the LNCaP cell line, a prominent cytotoxicity was observed. hTERT mRNA expressions decreased in the PC3 cell line. When the gene expressions of VDR and EGFR were analyzed, a distinctive reduction was observed in the VDR gene expression in the PC-3 and DU 145 cell lines. In terms of the EGFR gene expression; a decrease was determined in all cell lines. The most remarkable result of our scientific research is the lack of the VDR gene expression in the LNCaP cell line.

Conclusion: The prospect of a new molecular approach to treatment of prostate cancer was raised.

Key Words: Rapamycin, prostate cancer, hTERT, EGFR, VDR.

Giriş

Fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) yolağı kanser gelişimine dahil olan kritik yollardan biridir. Bu yolak epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi büyüme faktörleri tarafından aktive edilebilir ve çok sayıda önemli aşağı regülasyon sinyal yolağının komponentlerinin aktivasyonuna öncülük etmektedir. Bu komponentlerden biri rapamisinin memelilerdeki hedefi proteindir (mTOR). mTOR'un aktivasyonu, sonuçta hücre bölünmesine öncülük eden aşağı-akış moleküllerinin ardarda aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Klinik denemelerdeki güncel mTOR inhibitörleri; rapamisin ve temsirolimus (CCI-779) tur (1).

Rapamisinin karsinogenezdeki etkileri ile ilgili önemli sayıda çalışma bulunmaktadır. Rapamisin, siklin D1' in degradasyonunu stimüle ederek, G1-S transisyonunu inhibe edebilmektedir. Ayrıca, aktive olmuş PI3K-Akt-mTOR yolağının indikatörü olan fosfo-p70 S6 kinazı aşağı regüle etmektedir (2). PI3K-Akt-mTOR sinyal yolağının aktivasyonu çok sayıda tümör tipinde tespit edilmiştir. Bu yolağın aktivasyonu da, kanser hücrelerinin kemoterapiye direnci, sağkalım, anjiyogenez, proliferasyon için önem taşımaktadır (3). Sonuç olarak, bu yolak moleküler-hedefli tedavide çekici bir hedef haline gelmektedir. Gerçekten, rapamisin tedavisinin doku kültürü sistemlerinde ümit vaad edici antitümör etkisi olduğu gösterilmiştir. (4).

Rapamisin (sirolimus), *Streptomyces hygroscopicus*'tan izole edilen, hücre içi reseptörü olan FK506 bağlayıcı protein (FKBP12)'ye bağlanarak oluşturulan kompleks, mTOR üzerindeki FKBP12-Rapamisin bağlayıcı domaine (FRB) bağlanan bir antifungal makrolid antibiyotiktir. İki yüz seksen dokuz kDa ağırlığında geniş polipeptid, serin/treonin-spesifik kinazdır. Yapısının mayadan memeli hücrelerine kadar çok iyi korunduğu bilinmektedir. İnsan, fare ve sıçan TOR proteinleri aminoasit düzeyinde %95 benzerlik sergilerler. mTOR aminoterminal uçta 20 kadar birbiri ardına dizilmiş tekrar motifleri içermekte, Huntingtin elongasyon faktörü 3, protein fosfataz 2A'nın A (PP2A) alt ünitesini içermektedir. mTOR hücre büyümesi ve proliferasyonunun anahtar regülatörü olarak bilinmektedir. Translasyon sürecinde fosforilasyona başlayan iki protein bulunmaktadır. İlk hedef protein, ribozomal p70S6 kinazdır (S6K1). İkinci ise ökaryotik translasyon başlama faktörü (eIF4E) supresörü olan 4E-BP1'dir. Fosforlanmış 4E-BP'den eIF4E'nin salınımı, aktif eIF4E kompleksinin formasyonuna neden olur, bu da mRNA'nın kap-bağımlı translasyonu için gereklidir.

Rapamisin ve analogları hücre döngüsü progresyonunda G1 fazında G1'den S fazına kadar olan sinyal iletim yollarını düzenleyen immunosupresan ve antiproliferatif özellikleri ile bilinirler. Rapamisinin hem in vitro hem de in vivoda kanser hücrelerinin geniş oranda

proliferasyonlarını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu ajanın günümüzde antikanser tedavilerin klinik gelişiminde kullanıldığı bilinmektedir. İnsan kanser hücrelerindeki prelinik çalışmalar, rapamisinin prostat, küçük hücreli akciğer, glioblastom, T hücreli lösemi, renal hücre ve göğüs kanserleri tedavisinde etkili olabileceğini göstermiştir. Rapamisin FKBP 12 adlı immunofilin ailesinden FK 506 bağlayıcı proteinlerden birine bağlanarak serin treonin kinaz yolağının inhibisyonu ile antiproliferatif etkiler sergilemektedir. mTOR, Fosfatidilinositol-3 kinaz/Akt (PI3K/Akt) sinyal yolağının bir aşağı akış mediatörü olmakla beraber hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır. Fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) ailesi enzimleri fosfoinositoltrifosfat (PIP3) gibi 3-fosfoinosititlipid ikincil mesajcılarının üretilmesinden sorumludurlar. Yolak anjiyogenez, motilite, sağkalım ve proliferasyonu içeren çok sayıda temel hücre özellikleri yöneten sinyallerin kaskadını kontrol etmektedir. PI3K-Akt yolağının aktivasyonu için çok sayıda mekanizma bir seri kanserde tanımlanmıştır. Kanserde PI3K yolağının bloke edilmesi ile ilgili görüşler mevcuttur. PI3K'daki onkojenik kinazların inhibe edilmesi bir strateji olarak bilinmektedir (5).

D vitamini reseptörü (VDR) geni, kromozom 12q13-14 bölgesinde lokalizedir. Gelişim, farklılaşma ve çeşitli uyaranlara karşı hızlı bir şekilde cevap vermekle görevlidir. D Vitamini, hücre içi reseptörleriyle etkileşerek gen ekspresyonunu düzenlemektedir. Bu mekanizma iyi bilinmemekle birlikte, kalsitriol sentezi ve metabolizmasına bağlıdır. Kalsitriol (1,25 dihidroksi D Vitamini 3) D Vitamini'nin aktif metabolitidir. VDR ekspresyonunun düzenlenmesinin hücre tipine özel olduğu ve hem transkripsiyonel hem de transkripsiyon sonrası mekanizmaları içerdiği farklı hücre serileri ile ilgili çalışmalara ihtiyaç vardır (6).

VDR'nin prostat kanserindeki önceki tanımlamaları ve takip eden kalsitriol etkilerinin incelenmesi prostat kanseri (PCa) hücre hatları etrafında merkezlenmiş olmasına rağmen kalsitriolün normal prostat dokusunda da önemli bir rol oynadığı görülmektedir. Peehl ve ark. (7) taze olarak elde edilen opere prostat örneklerinde ve prostatın epitelyum ve stromal hücrelerinde VDR'nin varlığını rapor etmişlerdir. Benin prostat hiperplazilerin cerrahi örneklerinden elde edilen primer kültürler de ayrıca VDR eksprese etmektedir. VDR hem epitelyum hem de stromal hücre kültürlerinde bulunmaktadır fakat VDR, grandula epitelyum hücrelerine oranla, stromal fibroblastlarda daha düşük seviyede görülmüştür. Prostat dokusundaki bölgesi VDR'nin miktarını etkilememiştir, periferik bölge ve merkezi bölge kültürleri aynı VDR içeriğine sahiptirler (7). Krill ve ark. (8) VDR ekspresyonunu farklı yaşlardaki donörlerden elde

ettikleri normal prostat bezinde çalışmış ve VDR ekspresyonunun yaşla değiştiğini, 50'li yaşlarda bir pik yaptığını ve sonrasında inişe geçtiğini bulmuşlardır (8). Kalsitriol yenidoğan sıçan prostat epitel hücreleri üzerinde (9) ve insan prostat epitelyum hücrelerinde (8) anti-proliferatif etki göstermektedir. Bu çalışmalar D vitamini'nin normal prostat fizyolojisinde ve gelişiminde bir rolü olduğunu desteklemektedir. Miller ve ark (1992) LNCap insan PCa hücrelerinde VDR varlığını bulmuşlardır (10). Skowronski ve ark. (11) tarafından üç farklı PCa hücre hattında (LNCaP, PC-3 ve DU 145) VDR'nin ve kalsitriolün anti-proliferatif etkisinin (1–100 nM) gösterilmesi, prostat biyolojisinde D Vitamini'nin direkt rolünün araştırılmasını ve hormonun PCa tedavisinde nasıl faydalı olabileceği ile ilgili çalışmaları başlatmıştır. Hücrede erişilen kalsitriol hormonunun yüksek konsantrasyonunun güneşiği, beslenme, sirkülasyondaki transport ve metabolizmanın etkileşimi sonucu olduğu açıktır ve hala aktif hormonların taşınımının inhibe veya stimüle olması için reseptör ve post-reseptör sinyal yollarına ihtiyaç vardır. Örneğin, bozulmamış VDR eksikliği veya VDR'deki mutasyonların fonksiyonlarının kaybı kalsitriolün herhangi bir seviyesine ona yanıtı azaltabilir veya elimine edebilir. Birçok faktör, kalsitriole yanıtın büyüklüğünü değiştirerek hedef hücrelerde VDR'nin konsantrasyonunu regüle edebilir (12). Prostat kanseri hastalarında immünohistokimya kullanılarak VDR proteininin ekspresyonunun incelendiği bir çalışma prostat tümörlerindeki yüksek VDR ekspresyonunun azalan letal kanser riski ile ilişkili olduğu sonucuna varmıştır (13). Bu durum da, VDR yolağının PCa progresyonunu inhibe ettiğini ve bunun sadece 25(OH)D kan değerlerine değil, VDR içeriğine bağlı olduğunu önerir. Birçok epidemiyolojik çalışma, D Vitamini eksikliğinin PCa riskini artırdığını ve yüksek miktardaki D vitamini'nin daha iyi prognoz ve gelişmiş sonuçlarla ilişkili olduğunu belirtmektedir. Hücre ve hayvan çalışmaları PCa'da D Vitamini'nin anti-proliferatif rolünün VDR'nin önemini ve ekstra-renal dokulardaki CYP27B1 ve CYP24 enzimleri tarafından oynanan rolleri vurgulamışlardır. Ayrıca son veriler, VDR'nin yüksek konsantrasyonlarının agresif hastalığa karşı koruyucu olduğunu önermektedir. Preklinik veriler inandırıcı ve ikna edici olmasına rağmen PCa'lı erkeklerde D, kalsitriol veya çeşitli D Vitamini analogları kullanılarak yapılan klinik denemelerin sonuçları hayal kırıklığına sebep olmuştur. Araştırmacılar D Vitamini eksikliğinden kaçınmanın iskelet homeostazisine olan aşikar yararlarının yanında kanser insidansını azaltmada önemli bir amaç olabileceğine inanmışlardır. Kalsitriol bazı kanser hücrelerinde apoptozu indüklemesine rağmen esas görevi anti-proliferatif, anti-inflamatuar ve pro-farklılaşma etkileridir. Bu nedenle, tek başına uygulanan kalsitriol teröpotik olarak yararlı olamayabilir.

D Vitamini veya kalsitriolün klinik kanser gelişiminden önce kemoprevensiyonda veya diğer tedavilere bir ek olarak erken dönem kanser hastalarının hastalıklarının ilerlemesini ertelemede çok etkili olabileceğini düşünmüşlerdir (14). Kalsitriol için güvenli bir dozu belirlemek zorken, en yüksek dozda uygulamanın çok ciddi yan etkiler yaratmadan tolere edilebileceği ve D Vitamini, kalsitriol veya analogları gibi diğer ilaçlarla kombinasyonlarının tedaviyi artırdığı ve PCa tedavisi için yararlı olduğu sonucuna varmışlardır. Yararları erkeklerde kanıtlanmasa da preklinik veriler ileride erkeklerde klinik çalışmalar yapılacağına bir gösteresidir.

Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) geni kromozom 7p11.1-q11.1 bölgesinde lokalizedir. EGFR, 170 kDa bir glikoprotein olup ekstraselüler ligand bağlayan ve intraselüler tirozin kinaz aktivitesi olan bölgeye sahiptir. EGFR ailesi yapısal olarak benzer 4 reseptör tirozin kinaz proteininden oluşmaktadır: ErbB-1 (EGFR), ErbB-2 (HER-2), ErbB-3 (HER-3), ErbB-4 (HER-4). Bu dört molekülün hepsinin hücre içi ve dışı ve transmembran kısımları mevcuttur. Epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF)-gibi ligandlar bu reseptörlere bağlanarak normal ve malin epitelyal hücrelerin büyümesinde ve diferansiyasyonunda etkilidir. EGFR aktivasyonu ile tümör proliferasyonu, migrasyonu, stromal invazyon, neovaskülarizasyon ve apoptoza direnç ortaya çıkmaktadır. EGFR meme, over, kolon, prostat, böbrek ve akciğer kanserlerinde yüksek oranda ifade edilmektedir. Hormonal tedaviye, sitotoksik ajanlara ve radyoterapiye direncin göstergesidir. Androjene bağlı kanser ve normal prostat epitel ilerlemesi sonunda, hormon bağımsız prostat kanseri çok farklı büyüme düzenleyici sinyaller içeren karmaşık bir süreç içine girer. EGFR gen aktivasyonu prostat kanseri hücre büyümesinde etkili olmaktadır.

Prostat kanserinde prostat in situ neoplazi olarak isimlendirilen ve hastalığın erken evrelerinde tespit edilen artmış telomeraz aktivitesi tanımlanmıştır. Prostat biyopsilerinden telomeraz aktivitesinin değerlendirilmesi bu malignite için değerli bir tanı markırı olarak bilinmektedir. Kanser gelişiminde telomeraz aktivitesinin moleküler mekanizması hala bilinmemektedir. Prostat kanseri kanser ölümlerinin ikinci nedeni ve en sık tedavi edilen malignite olarak bilinmektedir. Rapamisin ile mTOR'un inhibisyonu, fosfataz ve tensin (PTEN) negatif tümörlerde kısmen etkilidir. Daha önceki bulgulardan yola çıkarak rapamisinin prostat kanseri hücre hatlarında PI3K /mTOR inhibisyonunun araştırılması hedeflenmiştir (15).

Çalışmada, insan prostat kanseri hücre modellerinde (PC-3, DU 145 ve LNCaP) rapamisinin sitotoksik ve

apoptotik etkileri değerlendirilip telomeraz aktivitesi, EGFR ve VDR gen ekspresyonları üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hücre hatları

LNCaP (insan prostat adenokarsinomu, lenf nodu metastazi-androjen bağımlı), PC-3 (insan prostat adenokarsinomu, 4. evre androjen bağımsız) ve DU145 (insan prostat karsinomu beyin metastazi-hormon bağımsız) prostat kanseri hücre hatları % 10 fetal sıçır serumu (FBS), 100IU/ml penisilin ve 100 mg/ml streptomisin içeren DMEM'da 1, 10, 25, 50 ve 100nM dozda rapamisin ile muamele edilip 37°C'de, % 95 nemli ortamda % 5 CO₂'li etüvde 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde inkübe edilmişlerdir. Çalışmaya 1x10⁵/ml hücre olacak şekilde başlanmıştır.

Sitotoksikite testleri

Tripan mavisi testi: Hücre canlılığı tripan mavisi testi ile doz ve zamana bağlı olarak değerlendirilmiştir. Canlı hücreler tripan mavisi boyasına geçirgen olmayıp ölü hücreler bu boyayı hücre içine aldıklarından mavi renkte görülmektedirler. Bu özellikler doğrultusunda hücreler, canlılık ve çoğalma yönünden değerlendirilmiştir. Neubauer lamda 1x10⁵/ml hücre temel alınarak ikilenme zamanı tespit edilmiştir.

XTT yöntemi: Rapamisinin sitotoksik etkisi XTT yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Hücreler 24, 48, 72. saatlerde aynı rapamisin konsantrasyonlarında 3 kuyucuk olacak şekilde 96'lık mikrolatelerde XTT (2,3,-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sülfopenil]-2H-tetrazolium-5-kaboksanilit tuzu) solüsyonu kullanılarak spektrofotometrik ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Reaktifler 50/1 (işaretleme ajanı/aktivasyon ajanı) oranında olacak şekilde karıştırılarak hazırlanmıştır. XTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olmakla beraber canlı hücrede mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimi ile parçalandığında çözülebilir formazana dönüşmektedir. Formazandan kaynaklanan turuncu rengin yoğunluğu metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır. Reaksiyon ELISA cihazında okunup kantite edilmiştir. ELISA cihazında 490 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında her bir kuyucuğun absorbans değeri (OD) okunmuştur. Hücre canlılığı yüzdesi her bir

kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplanmıştır.

IC₅₀ değerleri nonlinear regresyon analizine göre [Y = alt + (üst-alt) / (1 +10(Log IC50 - X) x HillSlope)] GraphPad Prism yazılımı belirlenmiştir.

Akridin oranj - etidyum bromür boyası ile apoptoz saptanması

Apoptoz değerlendirmesi akridin oranj-etidyum bromür boyası kullanılarak yapılmıştır. Bu boya canlı ve ölü hücreler ile nükleusta ve hücre membranındaki nekroz ve apoptoza bağlı değişiklikler hakkında bilgi vermektedir. Vital bir boya olan akridin oranj, hem canlı hem ölü hücreleri boyarken, etidyum bromür ise sadece membran bütünlüğü bozulmuş hücreleri boyamaktadır. Canlı hücreler morfolojik olarak üniform yeşil renkli boyanırlar. Apoptozun erken dönemindeki hücreler de yeşil renkte boyanmakta ancak nükleuslarında, kromatin kondensasyonu ve nükleer fragmentasyonu gösteren parlak yeşil renkli noktalanmalar içerirler. Geç apoptotik dönemdeki hücreler de nekrotik hücreler gibi etidyum bromür ile turuncu renkte boyanırlar. Çalışmada hücreler etidyum bromür akridin oranj boyaları ile boyandıktan sonra floresan mikroskop kullanılarak morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Rapamisinin prostat hücre hatlarındaki apoptotik ve nekrotik etkilerinin gözlenmesi amacıyla her alandan en az 450 tane hücre sayılarak canlı nekrotik ve apoptotik hücre sayıları ayrı ayrı belirlenmiştir.

hTERT, EGFR ve VDR gen ekspresyonu kantifikasyonu

hTERT mRNA ekspresyonu kantitatif tespiti, *Light Cycler TeloTAGGG hTERT* kantifikasyon kiti (Roche Applied Science) (Mannheim, Almanya) kullanılarak Real Time Online RT-PCR ile çalışılmıştır. Tüm kantifikasyon basamakları kit prosedürüne göre yapılmıştır. Rapamisinin IC₅₀ dozunda, 72. saatte tüm hücre hatlarından total RNA izolasyonu yapılmış ve komplementer DNA eldesi ardından EGFR ve VDR gen ekspresyonları Real Time Online RT-PCR ile çalışılmıştır. EGFR ve VDR gen ekspresyonları belirlemede kullanılan primer ve prob lar tarafımızdan tasarlanmıştır. İlgili genlerin primer ve prob dizileri aşağıdadır:

Gen	İleri Primer	Geri Primer	Prob
EGFR	cagccacccatgtaccatc	aacttggggcgactatctgc	gctggatg
GAPDH	gaaggtgaaggtcgagtc	gaagatggtgatgggatttc	caagctcccgttctcagcc

VDR mRNA ekspresyonu ve GAPDH primer/prob sekansı 5'-3'

VDR prob FAM-CCT GCC GGC TCA AAC GCT GTG-TAMRA

VDR ileri primer CTC ATC TGT CAG AAT GAA CTC CTT

VDR geri primer TCA CCA AGG ACA ACC GAC G

GAPDH prob FAM-*caa gct tcc cgt tct cag cc*-TAMRA

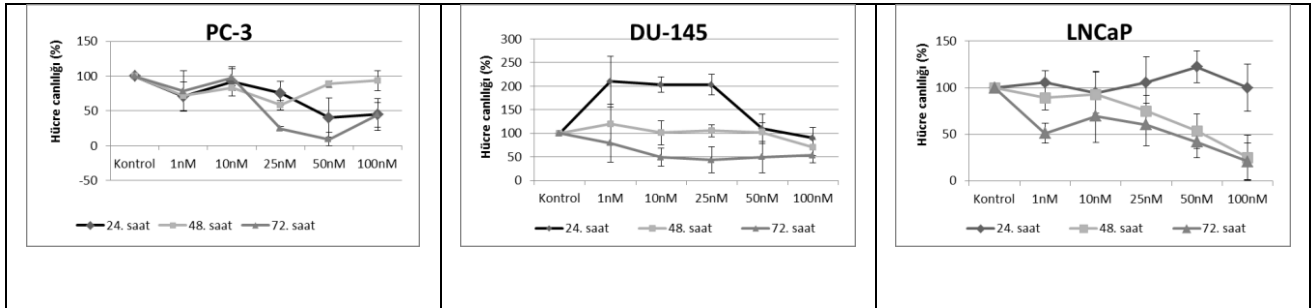
GAPDH ileri primer *gaa ggt gaa ggt cgg agt c*

GAPDH geri primer *gaa gat ggt gat ggg att tc*

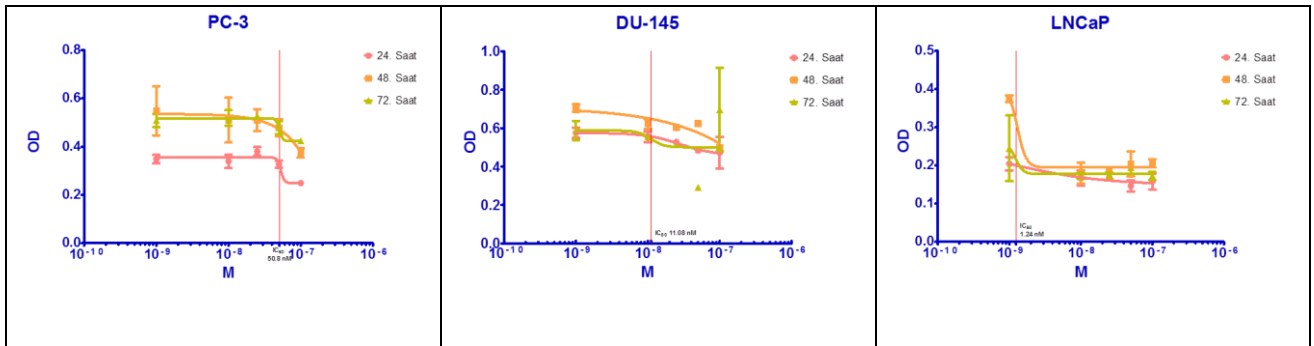
Bulgular

Rapamisin ile muamele edilmiş ve edilmemiş prostat kanseri hücre hatlarındaki hücre canlılığı Grafik-1'de gösterilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde tripan mavisi testine göre 72. saatte, DU145 ve LNCaP hücre hatlarında, sırasıyla 10, 25 ve 50 nM rapamisin muamelesinde viabilitede %50 azalma gözlenmiştir. PC3 hücre hattında 72. Saatte 10nM rapamisin muamelesi ile viabilitede önemli bir değişiklik gözlenmezken, 25 ve 50 nM konsantrasyonda ise viabilitedeki azalma % 50'den fazladır (Şekil-1). DU145, PC3 ve LNCaP hücre hatlarında rapamisinin 72. saatteki IC50 dozları sırasıyla;

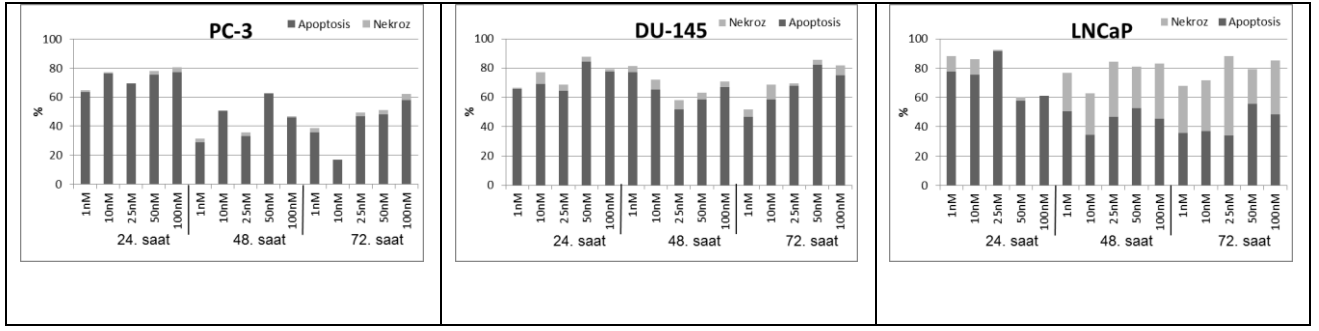
11.08, 50.80 ve 1.24 nM olarak XTT yöntemi ile tespit edilmiştir (Grafik2, r (DU145)=0,8810 p= 0,0204, r (PC3)=0,8471 p= 0,0333, r (LNCaP)=0,9547 p= 0,003). Rapamisinin LNCaP hücre hattında sitotoksitesi değerlendirildiğinde belirgin sitotoksitite gözlenmiştir (Şekil-2). Apoptoz değerlendirildiğinde; PC-3, LNCaP ve DU 145 hücre hatlarında 72. saatte doza ve zamana bağlı apoptoz artışı gözlenmiştir (Şekil-3,4). hTERT mRNA ekspresyonu değerlendirildiğinde ise PC-3 hücre hattında 72. saatte 1 nM'dan itibaren % 50'ye varan düşüş saptanmıştır (Şekil-5). PC-3, LNCaP ve DU 145 hücre hatlarında 72. saatte VDR ve EGFR gen ekspresyonları değerlendirildiğinde; hormon bağımsız prostat kanseri hücre hatları PC-3 ve DU 145'te rapamisin verilmeyen kontrol grubuna oranla VDR ekspresyonunda belirgin bir düşüş gözlenirken, hormon bağımlı prostat kanseri hücre hattı olan LNCaP'te VDR gen ekspresyonu gözlenmemiştir. EGFR gen ekspresyon seviyesinde ise tüm hücre hatlarında kontrol grubuna oranla belirgin bir düşüş saptanmıştır (Şekil-6). VDR ve EGFR ekspresyonları için kantitatif PCR'da *housekeeping* gen olarak gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanılmıştır. Tüm deneyler 3 kez tekrar edilmiştir.



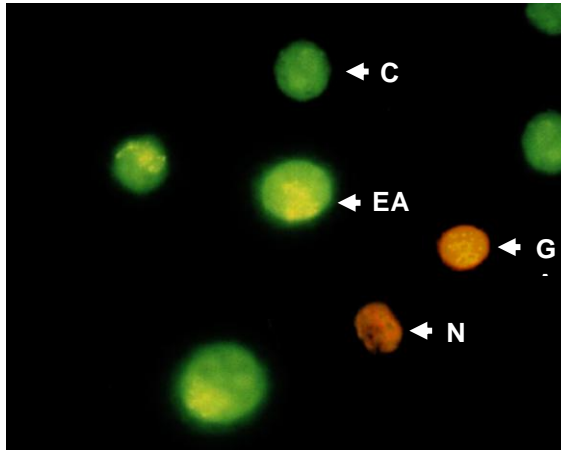
Şekil-1. Rapamisinin Tripan mavisi testi ile belirlenen sitotoksitesi.



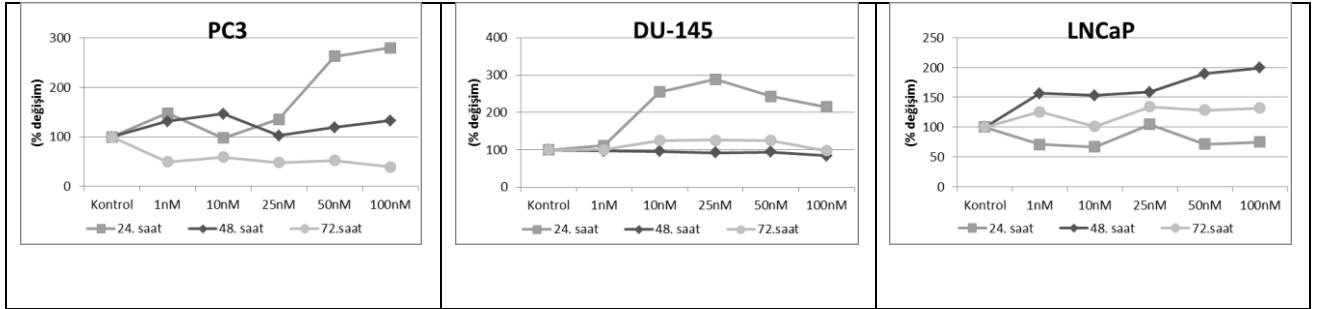
Şekil-2. Rapamisinin XTT testi ile belirlenen sitotoksitesi.



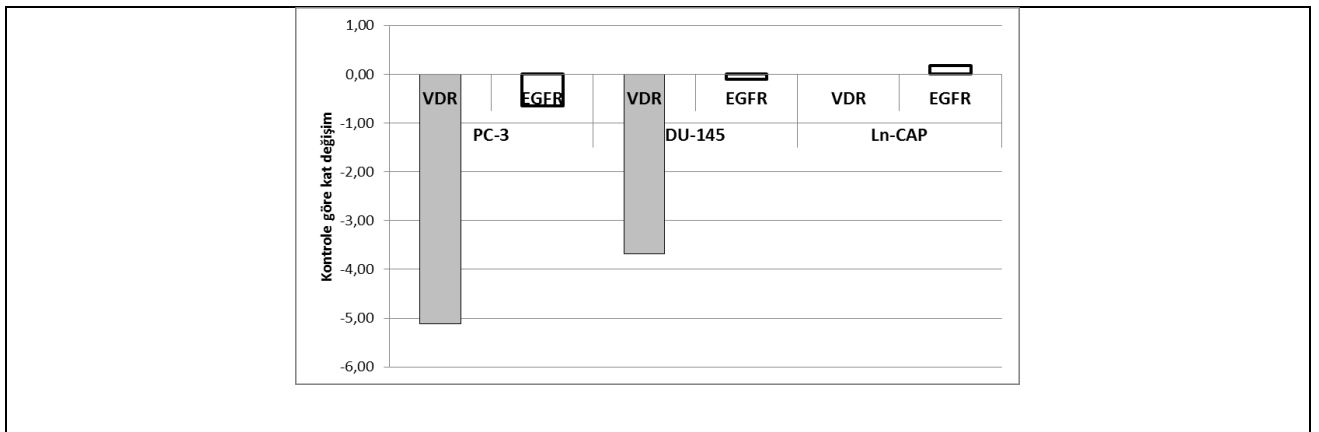
Şekil-3. Rapamisinin apoptotik etkisi (AO/EtBr).



Şekil-4. Akridin Oranj Etidyum Bromid ile canlı (C), nekrotik (N), erken (EA) ve geç (GA) apoptotik hücreler (40x).



Şekil-5. hTERT mRNA ekspresyonunun rölatif kantitasyonu.



Şekil-6. VDR ve EGFR gen ekspresyonlarının kontrole göre kat değişimleri.

Tartışma

Çalışmamızda rapamisinin PC-3, LNCaP ve DU 145 hücre hatlarında hücre viabilitesi, sitotoksitesi, apoptozu ve hTERT mRNA, EGFR ve VDR gen ekspresyonları üzerine etkisi saptanmıştır. İnsan kanserleri çoğunlukla proliferasyona, sağkalıma, invaziv ve metastatik yeteneklerin kazanımına sebep olan genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi sonucu epitelyum hücrelerinden köken alırlar. Epidemiyolojik ve laboratuvar araştırmaları kanser gelişimi ile ilişkili olan değişikliklerin bireyin genetiği ve çevresel risk faktörleri arasındaki kompleks ilişkiler sonucu olduğunu belirtmiştir. Çevresel faktörlerin tüm kanser risklerine önemli ölçüde katkıda bulduklarını öneren veriler temelinde, kanser engelleme stratejilerinde beslenme faktörleri ve spesifik yaşam tarzını kullanmaya odaklanılmıştır. Beslenme faktörleri arasında D Vitamini, epidemiyolojik, laboratuvar, hayvan ve klinik çalışmalar içinde kanseri önlemeyle ilişkisi artmaktadır. Epidemiyolojik deliller, kolon, rektal ve meme kanserinin önlenmesinde D vitamini, D vitamini duyarlı olabilecek mesane, beyin, endometrial duvar, özafagus, safra kesesi, böbrek, akciğerler, yumurtalıklar, pankreas, prostat ve mide kanserlerine göre daha etkili olduğunu göstermektedir. Mekaniğe ait olarak D Vitamini 3'ün biyolojik olarak aktif formu olan 1 α 25 dihidroksi D Vitamini 3 (1,25D), her dokuda gen ekspresyonu ve sinyal transdüksiyonunun global bir regülatörüdür. Epitelyum hücrelerinde VDR ve ligand 1,25D farklılaşmış fenotipe katkıda bulunur ve hücreleri endojen ve eksojen streslere karşı savunan yolları destekler. İnsan tümörlerinde ve kanser hücre hatlarında fonksiyonel VDR'nin varlığı, bu reseptörün kanser tedavisi için bir hedef olabileceğini göstermiştir. Artan D Vitamini durumu, kanserli hastalarda tedaviye yanıtı veya sağkalımı geliştirebilir. Birçok çalışma, 1 α ,25 dihidroksivitamin D3 (1,25D)'nin gelişme arestini indüklediğini, hücre ölümünü tetiklediğini veya in vitroda kanser hücrelerinin ve in vivo da tümörlerin farklılaşmasını desteklediği doğrulanmıştır Bu sebeple dolaşımdaki 25-hidroksivitamin D (25D)'nin yüksek kan değerleri kanserli hastalarda daha iyi sağkalımla korelasyon göstermesi şaşırtıcı değildir. Bu veriler tam olarak tutarlı değildir fakat bazı çalışmalar D Vitamini metabolizmasının ve VDR ekspresyonunun ileri kanserlerde iptal olduğunu belirtmektedir, öyle ki D Vitamini yolağının endojenik aktivitesi anti-tümör etkileri tetiklemede çok yeterli değildir. Bu ilerlemiş olgularda daha etkili D Vitamini tabanlı ilaçlar terapötik değere sahip olabilir. Düzinelerce sentetik D Vitamini analogları, bireysel olarak veya kemoterapötik ilaçlar veya radyasyon ile kombine olarak hayvan kanser modellerinde etki

göstermiştir (16). Bea-Jump ve ark. yaptığı çalışmada rapamisinin over, serviks ve endometriyum kanserlerinde potansiyel olarak hedeflenmiş terapötik bir ajan olduğu bildirilmiştir. Bu kanserlerde, rapamisinin, bağımsız bir mekanizma ile ve hTERT transkripsiyonunun supresyonu öncülüğünde hücre proliferasyonunda, G1 hücre döngüsü arrestinin inhibisyonunu sağlayarak antitümör etkiler sergilediği görülmüştür. Over ve serviks kanser hücre hatlarında, 20 nM rapamisinin hTERT mRNA düzeyini dikkate değer bir şekilde düşürdüğü bulunmuştur (17). Nanni ve ark. yaptığı çalışmada ise prostat hücre hatlarında östrojen reseptörleri aracılığı ile sinyalin düzenlenmesi ve normal ve malin prostat epitel hücrelerinde telomeraz aktivitesinin kontrolünün prostat kanserinin takibinde kullanılan hormona bağımlı tedavilere biyolojik yanıt araştırılmıştır. Bulunan sonuçlar östrojen reseptörleri ile prostat kanserinin direkt kontrolünü hTERT gen ekspresyonu ve telomeraz aktivitesinin, prostat kanserinde olası bir terapötik hedefi simgeleyen bir transkripsiyonel regülatör olabileceği bildirilmiştir (18).

Bu bilgilerin ışığı altında, rapamisinin telomeraz enzimi üzerine etkisi göz önünde bulundurularak, prostat kanserli olgularda ex-vivo ve klinik faz çalışmalarının yapılması ile tedavi protokolünde yer alabileceğini düşünmekteyiz.

Rapamisinin IC₅₀ dozunun EGFR gen ekspresyonunda azalma sağlaması onkogenik özelliğinden dolayı anlamlı olarak değerlendirilmiştir. Petrylak'ın yaptığı bir çalışmaya göre, dosetakselin kemik ve tümör damarlanmasını hedefleyen ajanlarla ve D vitamini reseptörü ile kombinasyonu prostat kanserinde yeni bir paradigma olarak karşımıza çıkmaktadır (19). Bu bağlamda rapamisinin VDR gen ekspresyonunu baskılaması ümit vericidir.

Androjen bağımlı prostat kanseri hücre hattı olan LNCaP'te, VDR gen ekspresyonu saptanmamıştır. Saptanan bu sonuç; VDR gen ekspresyonunun, progresyonda önemli olduğunu ve bu bulgunun diğer hormon bağımlı prostat kanseri hücre hatlarındaki çalışmalar ile desteklenmesi gerektiğini düşündürmektedir. Tüm literatür bilgileri ışığında, prostat kanserinin multipl sinyal yolları ile etkileşimde olduğu bilindiğinden, çoklu sinyal yollarındaki genlerin ekspresyonlarının ayrıntılı bir şekilde irdelenmesi, hormon bağımlı LNCaP hücre hattında VDR gen ekspresyonunun yokluğunun hangi gen/genlerin ekspresyonlarındaki değişiklikler sonucu gerçekleştiğinin incelenmesi ve ilgili gen değişimlerinin daha sonraki çalışmalarda protein düzeyinde araştırılmasının doğru bir ilerleme olacağına inanmaktayız.

Kaynaklar

1. Wang Y, Mikhailova M, Bose S, Pan CX, deVere White RW, Ghosh PM. Regulation of androgen receptor transcriptional activity by rapamycin in prostate cancer cell proliferation and survival. *Oncogene* 2008;27(56):7106-17.
2. Nozawa H, Watanabe T, Nagawa H. Phosphorylation of ribosomal p70 S6 kinase and rapamycin sensitivity in human colorectal cancer. *Cancer* 2007;251(1):105-13.
3. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 2002;14(5):381-95.
4. Fung AS, Wu L, Tannock IF. Concurrent and sequential administration of chemotherapy and the mammalian target of rapamycin inhibitor temsirolimus in human cancer cells and xenografts. *Clin Cancer Res* 2009;15(17):5389-95.
5. Huang S, Houghton PJ. Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 2003;3(4):371-7.
6. Çakır OÖ, Tunalı EN. The role of VDR polymorphisms in CaOX kidney stone formation. *J Cell Mol Biol* 2010;8(2):1-12.
7. Peehl DM, Skowronski RJ, Leung GK, Wong ST, Stamey TA, Feldman D. Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on primary cultures of human prostatic cells. *Cancer Res* 1994;54(3):805-10.
8. Krill D, Stoner J, Konety BR, Becich MJ, Getzenberg RH. Differential effects of vitamin D on normal human prostate epithelial and stromal cells in primary culture. *J Urol* 2000;164(5):1812-8.
9. Konety BR, Leman E, Vietmeier B, Arlotti J, Dhir R, Getzenberg RH. In vitro and in vivo effects of vitamin D (calcitriol) administration on the normal neonatal and prepubertal prostate. *J Urol* 2000;164(5):1812-8.
10. Miller GJ, Stapleton GE, Ferrara JA, et al. The human prostatic carcinoma cell line LNCaP expresses biologically active, specific receptors for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3. *Cancer Res* 1992;52(3):515-20.
11. Skowronski RJ, Peehl DM, Feldman D. Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D3 receptors and actions in human prostate cancer cell lines. *Endocrinology* 1993;132(5):1952-60.
12. Krishnan AV, Feldman D. Regulation of vitamin D receptor abundance. In: Feldman D, Glorieux FH, Pike JW (eds). *Vitamin D*. San Diego: Academic Press; 1997:179-200.
13. Hendrickson WK, Flavin R, Kasperzyk JL, et al. Vitamin D receptor protein expression in tumor tissue and prostate cancer progression. *J Clin Oncol* 2011;29(17):2378-85.
14. Krishnan AV, Trump DL, Johnson CS, Feldman D. The role of vitamin D in cancer prevention and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010;39(2):401-18.
15. Jhaver M, Goel S, Wilson AJ, et al. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res* 2008;68(6):1953-61.
16. Welsh J. Cellular and molecular effects of vitamin D on carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 2012;523(1):107-14.
17. Bae-Jump VL, Zhou C, Gehrig PA, Whang YE, Boggess JF. Rapamycin inhibits hTERT telomerase mRNA expression, independent of cell cycle arrest. *Gynecol Oncol* 2006;100(3):487-94.
18. Nanni S, Narducci M, DellaPietra L, et al. Signaling through estrogen receptors modulates telomerase activity in human prostate cancer. *J Clin Invest* 2002;110(2):219-27.
19. Petrylak DP. New paradigms for advanced prostate cancer. *Rev Urol* 2007;9(Suppl 2):S3-S12.