

Nöroblastomda Retinoik Asit ve Sitotoksik Ajanların Kombinasyonlarının Hücre Siklus Proteinlerinden Siklin D1 ve P21 Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Effect of Retinoic Acid and Cytotoxic Agent Combinations on Cell Cycle Proteins Cyclin D1 and P21 in Neuroblastoma

Dr. Safiye AKTAŞ,^a
Dr. Zekiye S. ALTUN,^a
Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR,^a
Dr. Nur OLGUN^a

^aDokuz Eylül Üniversitesi,
Onkoloji Enstitüsü, İzmir

Bu çalışma XV. TPOG Ulusal Pediatrik
Kanser Kongresi (21-25 Mayıs 2008)'nde
Poster Bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi/Received: 25.12.2008
Kabul Tarihi/Accepted: 26.09.2009

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Safiye AKTAŞ
Dokuz Eylül Üniversitesi,
Onkoloji Enstitüsü, İzmir,
TÜRKİYE/TURKEY
safiyektas@yahoo.com

ÖZET Amaç: Siklin D1 çeşitli tümörlerde onkojenik aktivitesi gösterilmiş anahtar hücre siklus regülatör proteinidir. p21 siklin bağımlı kinaz inhibitörü olup hücre siklusunun ilerlemesini önleyen tümör supresörlerdendir. Nöroblastom tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlar ile siklin D1 ve p21 arasındaki ilişkiyi açıklayan araştırma sayısı yeterli değildir. Bu çalışmanın amacı, nöroblastom hücre hattında kemoterapötik ajanların siklin D1 ve p21 ekspresyonu üzerine etkisini araştırmaktır. **Gereç ve Yöntemler:** Kelly (N-myc pozitif) nöroblastoma hücre hattında sisplatin 0.5 µmol/L, vinkristin 0.01 µmol/L, etoposid 0.1 µmol/L, siklofosamid 2.5 µmol/L, doksorubisin 25 nmol/L ve retinoik asit 0.0001 mol/L ile kombine şekilde 24 saat inkübe edildi. Siklin D1 ve p21 ekspresyonları immunositokimyasal olarak belirlendi. Ekspresyonlar negatif, hafif, orta ve yüksek ekspresyon olarak değerlendirildi. **Bulgular:** Tek tek ya da retinoik asit ile kombine ilaç uygulamalarında değişik düzeylerde siklin D1 ve p21 ekspresyon değişimleri gözlenmiştir. Ancak retinoik asit ile vinkristin kombinasyonu kontrolde negatif olan p21 ekspresyonunu yüksek pozitif değişime uğrattırken, siklin D1 pozitif kontrol ekspresyonu azalmıştır. **Sonuç:** Bulgular hücre siklus proteinleri üzerine proliferasyonu engellemeye yönelik en etkili ilaç kombinasyonunun retinoik asit ve vinkristin olduğunu desteklemektedir. İkinci sırada etkin olan iki grup retinoik asidin etoposid ve siklofosamid ile olan ikili kombinasyonlarıdır. Yan etkiler göz önüne alınarak bu kombinasyonların, kronik bir hastalık gibi davrandığı kabul edilen nöroblastomun idame tedavisinde kullanımını in vitro olarak bir kez daha desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nöroblastoma; siklin bağımlı kinaz inhibitörü p21;
CCND1 proteini, insan; sitotoksinler

ABSTRACT Objective: Cyclin D1 is a key regulatory protein of cell cycle and this oncogenic activity had been observed in a variety of tumors. P21 is a cyclin dependent kinase inhibitor responsible for cell cycle arrest as a tumor suppressor gene. The studies in the literature about effects of retinoic acid and cytotoxic agents on p21 and cyclin D1 are not satisfactory. The aim of this study is to investigate effects of chemotherapeutic agents on expression of cell cycle proteins cyclin D1 and P21. **Material and Methods:** Cisplatin, 0.5 µmol/L; vincristine, 0.01 µmol/L; etoposide, 0.1 µmol/L; cyclophosphamide, 2.5 µmol/L; doxorubicine, 25 nmol/L; and retinoic acid, 0.0001 mol/L; and their combinations were applied to Kelly human neuroblastoma cell line (N-myc positive) for 24 hours. Cyclin D1 and P21 expressions were analysed with immunocytochemistry method. Expressions were recorded as negative, mild, moderate or high. **Results:** Cyclin D1 and P21 expression changes were observed in application cytotoxic agents alone or combined with retinoic acid in different degrees. However retinoic acid combined with vincristine is the most noticeable group to take into consideration by changing the negativity of p21 to high positivity; and decreasing the expression of cyclin D1 compared to non-treated control neuroblastoma cells. **Conclusion:** Our results indicate that retinoic acid and vincristine combination is most effective in decreasing proliferation. Second effectivity is shared by combination of retinoic acid with etoposide and combination of retinoic acid with cyclophosphamide. These in vitro results support the idea of indications of these combinations in neuroblastoma accepted as a chronic disease when side effects are taken into consideration.

Key Words: Neuroblastoma; cyclin-dependent kinase inhibitor p21;
CCND1 protein, human; cytotoxins

Nöroblastom (NB) nöral krestten köken alan, sempatik sinir sisteminden orijinli embriyonik sinir hücrelerinden oluşan çocukluk çağının sık görülen ekstrakranial solid malign tümördür.¹⁻³ Tüm çocukluk çağı kanserlerinin %8-10'unu oluşturur. Multimodel tedavilerde gelişmelere karşın ilerlemiş hastalıklarda sağkalım kötüdür.⁴⁻⁷ NB spontan regresyondan, agresif multi model tedaviye karşın progresyona dek klinik heterojenite göstermektedir. N-myc amplifikasyonu NB'da agresif ve proliferatif tümörlerde görülür ve yüksek risk kriteridir.⁸ Birçok hedef geni düzenleyerek hücre proliferasyonunu uyaran transkripsiyon faktörüdür. Bu nedenle üzerinde çok çalışma vardır. NB hücre hatlarında hipoksiye yanıtı,⁹ diferansiyasyon ile ilgisi,¹⁰ yeni ilaçlara yanıtı¹¹ çalışılmaktadır.

Tümörün biyolojik davranışındaki değişkenlik nedeniyle, NB spontan regresyonlar, benign transformasyon ya da agresif seyir gösterebilmekte, bu durum hastalığın prognozunu belirlemede ve tedavisinde sorunlara yol açmaktadır.¹²⁻¹⁵ Antiangiogenik tedavi hedefleri¹⁶ yanısıra diferansiyasyon, spontan regresyonun moleküler mekanizmaları¹⁷ da araştırılmaktadır.

Sisplatin, retinoik asid (RA), sodyum fenil asetat, poliprenoik asid gibi kimyasal bileşikler NB hücre hattında diferansiyasyonu uyarır. NB hücre hatlarında RA uygulaması ile N-myc ekspresyonu dramatik olarak azalmaktadır. Siklin D1 çeşitli tümörlerde onkojenik aktivitesi gösterilmiş anahtar hücre siklus regülatör proteinidir.¹⁸ Birçok tümörde artmış ekspresyonu gözlenmiştir. Siklin bağımlı kinaz (CDK) eşleri CDK4 ve CDK6'yı aktive ederek hücre siklus progresyonunda rol oynar.¹⁹ NB'da siklin D1, CDK4 ve CDK6'daki genomik aberasyonların saptanması bu pediatrik tümörde hücre siklus G1 aşamasına giriş kontrol noktasında bir bozukluk olduğunu göstermektedir.²⁰ Siklin D1 nöroblastlarda ekspresyon gösterirken ganglionöromda bu ekspresyon düşük bulunmuştur. G1 düzenleyici genlerde artmış ekspresyon olması Andiferansiye fenotiple ilişkili saptanmıştır.^{21,22}

p21 siklin bağımlı kinaz inhibitörü olup hücre siklusunun ilerlemesini önleyen tümör supresörlerdendir.²¹ Nöroblastom tedavisinde kullanılan TPOG tedavi protokolündeki kemoterapötik ajanlar ile sik-

lin D1 ve p21 arasındaki ilişkiyi açıklayan araştırma sayısı yeterli değildir. NB hücre hattında siklin D1'in sisplatin direnci ile ilişkisi saptanmamıştır.²²

Bu çalışmanın amacı, nöroblastom hücre hattında kemoterapötik ajanların siklin D1 ve p21 ekspresyonu üzerine etkisini araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Kelly (N-myc pozitif) NBa hücre hattında sisplatin 0.5 mmol/L, vinkristin 0.01 mmol/L, etoposid 0.1 mmol/L, siklofosamid 2.5 mmol/L, doksorubisin 25 nmol/L ve 13-cis-RA 0.0001 mol/L ile kombine şekilde 24 saat inkübe edildi. Siklin D1 ve p21 ekspresyonları immunositokimyasal olarak belirlendi.

HÜCRE KÜLTÜRÜ

Kelly insan NB hücre hattı (DSMZ, ACC 355) üzerine RA, sitotoksik ajanlar (sisplatin, vinkristin, siklofosamid, etoposid, doksorubisin) ve bunların kombinasyonları LD50 optimize edilmiş dozlarda 96 kuyucuklu hücre kültürü plağındaki uygulandı. Yüzde elli letal doz optimizasyonunda MTT test kullanıldı. Hücre dizisi %10 fetal bovin serumu içeren RPMI 1640 ortamı ile 37°C, %5 CO₂ inkübatörde kültüre edildi. Hücre büyüme ve çoğalması %99 olduğunda hücreler 96 kuyucuklu hücre kültürü plağına 5000 hücre/kuyucuk olmak üzere her bir kuyucuğa 100 µL ekildi. RA ve sitotoksik ajanlar ve bunların kombinasyonları; 72 saatlik inkübasyon sonrası hücre içeren kuyucuklara uygulanıp 24 saat inkübe edildi.

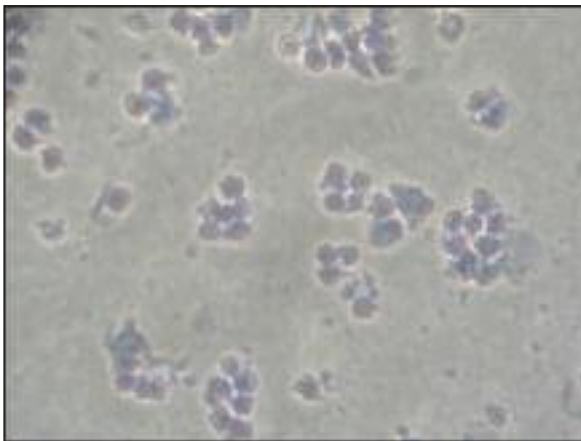
KEMOTERAPÖTİK AJANLAR

13-cis-RA (Sigma, R3255, Germany) ışıktan korunacak şekilde 0.01 g tartılarak 10 mL %96'lık etil alkol ile çözüldü. Sisplatin (Sigma, P4394, Germany), ışıktan korunacak şekilde 0.003 g tartılarak 10 mL ortam ile çözüldü. Vinkristin (Vinkristin sülfat, Mayne, 1 mg/mL), flakondan ortam ile sulandırılıp 0,01 mg/mL konsantrasyonunda ilaç hazırlandı. Siklofosamid (Endoksan, Baxter, 261.085 g/mol), 0.001 g tartılarak 10 mL serum fizyolojik ile çözüldü. Etoposid (Fytosid, Dabur, 100 mg/5 mL), flakondan ortam ile sulandırılıp 100 µmol/mL konsantrasyonunda ilaç hazırlandı. Doksorubisin (Adriblastina, Deva, 10 mg/flakon) 0.0001 g tartılarak 10 mL serum fizyolojik ile çözüldü.

İlaçların hazırlanan stok konsantrasyonlarından farklı konsantrasyon denemeleri yapılarak her ilaç için Kelly hücreleri üzerindeki LD50 dozları hesaplandı.

İMMÜNOSİTOKİMYA

İmmünohistokimya uygulaması direk 96 kültür plağına kuyucuklara uygulanmıştır. Bu aşamalar nonsteril ortamda oda ısısında gerçekleştirilmiştir. Kültür plağı PBS (Phosphat Buffer Saline) (pH: 7.4) ile 10ar dakika 2 kez yıkanmıştır. Fiksasyon için %99 etanol ile 15 dakika inkübe edildi. Plak, azalan alkol konsantrasyonlarında (%99, %95, %80, %70; her birinde 5 dakika), rehydrate edildi, daha sonra %3 H₂O₂ (distile suda dilüe) ile oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Her aşamadaki yıkamalar PBS (pH 7.4) ile gerçekleştirildi. Bloke edici antikorun 5 dakika uygulanması ile non-spesifik bağlanmalar bloke edildikten sonra, 1:100 dilüsyonda 2 saat primer antikorlar (Cyclin D1, DBS, Mob 178; P21^{WAF1}, DBS, Mob 280) uygulandı. Streptavidin-biotin tekniği ile çalışan iki aşamalı universal kit (DBS, KP-50L) kullanıldı. Kromojen olarak diaminobenzidine solüsyonu (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), zıt boyama için Mayer's hematoksilen boyası uygulandı. İki kuyucuk negatif kontrol olarak sadece PBS ile inkübe edildi. Ekspresyonlar negatif, hafif, orta ve yüksek ekspresyon olarak inverted mikroskopta değerlendirildi. Nükleer ekspresyon dikkate alındı. Canlı hücrelerde nükleer lokalizasyonunda pozitif boyanma %10'un altı negatif, %11-30 hafif (+), %31-50 orta (++) , %50'nin üzeri yüksek (+++) ekspresyon olarak değerlendirildi. Ekspresyon şiddeti dikkate alınmadı.



RESİM 1: İlaç uygulanmamış kontrol nöroblastom (KELLY) hücrelerinde P21 negatifliği (DAB x 100).

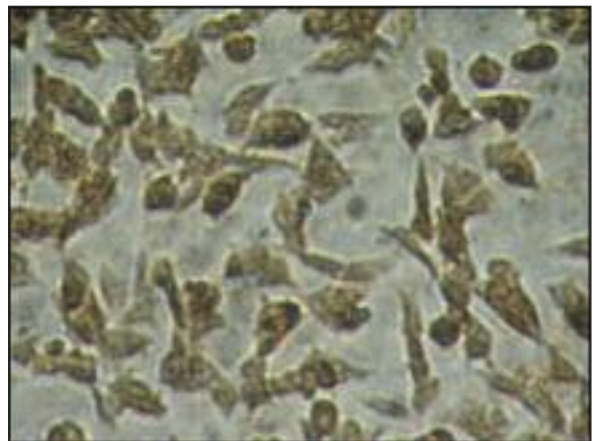
TABLO 1: Nöroblastom hücre hattında sitotoksik ajanların retinoik asitin ve kombinasyonlarının siklin D1 ve P21 üzerine etkileri		
Grup	Siklin D1	P21
Kontrol	+	-
Retinoik Asit(RA)	++	+
Sisplatin	++	-
Vinkristin	++	+
Doksorubisin	+	-
Siklofosfamid	+	+
Etoposid	+	-
RA+Sisplatin	+	-
RA+Vinkristin	+	+++
RA+Doksorubisin	+	-
RA+Siklofosfamid	++	++
RA+Etoposid	+	++

yonda pozitif boyanma %10'un altı negatif, %11-30 hafif (+), %31-50 orta (++) , %50'nin üzeri yüksek (+++) ekspresyon olarak değerlendirildi. Ekspresyon şiddeti dikkate alınmadı.

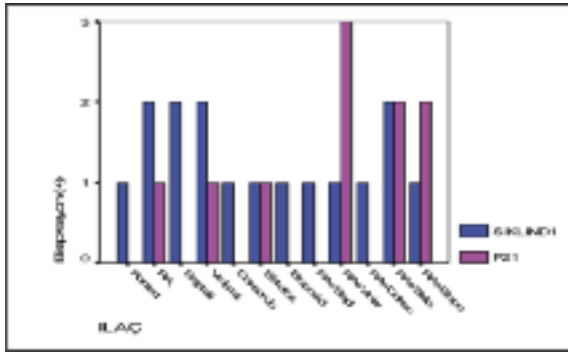
BULGULAR

Siklin D1 ve P21'in uygulanan ajanlar ve kombinasyonları ile ekspresyon değişimleri Tablo 1'de görülmektedir.

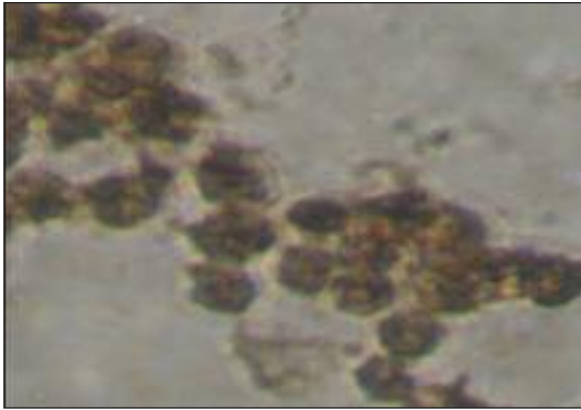
RA ile vinkristin, siklofosfamid ve etoposid kombinasyonlarında yüksek düzeyde p21 ekspresyonu gözlemlendi. Kontrolde p21 negatif iken (Resim 1), RA ve vinkristin kombinasyonunda en çok po-



RESİM 2: Retinoik Asit+Vinkristin uygulanmış diferansiyel nöroblastom (KELLY) hücrelerinde P21 pozitifliği (DAB x 400).



ŞEKİL 1: Nöroblastoma tedavisinde kullanılan çeşitli kemoterapötik ajanların ve retinoik asit kombinasyonlarının siklinD1 ve p21 ekspresyonu üzerine etkisi.



RESİM 3: Sisplatin uygulanan grupta siklin D1 pozitifliği (DABx400).

zitif ekspresyon gözlemlendi (Resim 2). RA, sisplatin ve RA ile siklofosamid kombinasyonunda orta düzeyde Siklin D1 ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 1) (Resim 3).

TARTIŞMA

D tipi siklin ve CDK'lar nöronal diferansiyasyon ve apoptozda esas teşkil eder. Hücre bölünme siklusunun G1 aşamasında durmaya antimitojenik ajanlar, antiproliferatif sinyaller yol açarken diferansiyasyon da hücre siklus duraklaması ile paralel gitmektedir.²³

Çalışmamızda tek tek ya da RA ile kombine ilaç uygulamalarında değişik düzeylerde siklin D1

ve p21 ekspresyon değişimleri gözlemlenmiştir. Ancak RA ile vinkristin kombinasyonu kontrolde negatif olan p21 ekspresyonunu yüksek pozitif değişime uğrattırırken, siklin D1 pozitif kontrol ekspresyonu azalmıştır. Bulgularımız hücre siklus proteinleri siklin D1 ve p21 üzerine en etkili ilaç kombinasyonunun RA ve vinkristin olduğunu desteklemektedir.

Vinkristinin medullablastoma üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada vinkristinin p53'ten bağımsız olarak p21 protein düzeyini up-regüle ettiği gösterilmiştir.²⁴ p21 proteini DNA hasarı ve mikrotubul inhibitörlerini içeren farklı hücresel streslere yanıt olarak aktive olur.^{18,22,23} Siklin D1 protein overekspresyonu çeşitli tumörlerde gösterilmiştir.^{18,27} Primer nöroblastom hücrelerinde siklin D1 ekspresyonu ile sisplatin sensitivitesi arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada siklinD1 ekspresyonunun sisplatin direnci ile korele olmadığı saptanmıştır.¹⁸

Siklin D1 nükleer olduğu zaman hücreyi proliferasyona sokmayı sürdürürken, sitoplazmik olması daha çok diferansiyasyonla ilişkili saptanmıştır.²⁸ Siklin-CDK etkileşimi nükleer olduğu zaman oluşur. Sitoplazmik lokalizasyonda genelde hücre S sentez fazındadır.

Ajan uygulanması sonucu sağlanan hücrelerde proliferasyon uyarıcı siklin D1 ekspresyonu sürmektedir. Ancak çalışmamızda bazı kombinasyonlarda (RA + vinkristin, RA+siklofosamid, RA + etoposid) p21 ekspresyonundaki artma ajanların etki mekanizmasında siklus uyaran sistemde direkt blokaj almadan inhibitör mekanizmaların devreye girdiğini desteklemektedir.

Sonuç olarak bulgularımızdan yola çıkarak NB'u kronik bir hastalık kabul edip düşük dozda metronomik tedavinin (RA + siklofosamid), kullanılacak ajanların toksik etkileri de düşünülerek; tartışılması gerektiği düşünülmüştür.

Ek Bilgi: Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığınca desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1999;17(7):2264-79.
2. Demirkaya M, Sevinir B, Yalçınkaya U. [Congenital neuroblastoma presenting with subcutaneous nodules: original image]. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2008;28(6):995-8.
3. Olgun N, Kansoy S, Aksoylar S, Cetingul N, Vergin C, Oniz H, et al. Experience of the Izmir Pediatric Oncology Group on Neuroblastoma: IPOG-NBL-92 Protocol. *Pediatr Hematol Oncol* 2003;20(3):211-8.
4. Riley RD, Heney D, Jones DR, Sutton AJ, Lambert PC, Abrams KR, et al. A systematic review of molecular and biological tumor markers in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2004;10(1 Pt 1):4-12.
5. López Almaraz R, Montesdeoca Melián A, Rodríguez Luis J. The role of molecular genetics in childhood cancer. *An Pediatr (Barc)* 2003;59(4):334-44.
6. Mora J, Gerald WL. Origin of neuroblastic tumors: clues for future therapeutics. *Expert Rev Mol Diagn* 2004;4(3):293-302.
7. Maris JM. The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification. *Curr Opin Pediatr* 2005;17(1):7-13.
8. Schwab M. MYCN in neuronal tumours. *Cancer Lett* 2004; 204(2):179-87.
9. Yanagita T, Manabe T, Okuda H, Matsuzaki S, Bando Y, Katayama T, et al. Possible involvement of the expression and phosphorylation of N-Myc in the induction of HMGA1a by hypoxia in the human neuroblastoma cell line. *Neurosci Lett* 2005;374(1):47-52.
10. Valentijn LJ, Koppen A, van Asperen R, Root HA, Haneveld F, Versteeg R. Inhibition of a new differentiation pathway in neuroblastoma by copy number defects of N-myc, Cdc42, and nm23 genes. *Cancer Res* 2005;65(8):3136-45.
11. Kobrinsky NL, Sjolander DE. Response of metastatic recurrent neuroblastoma to nitisi-none: a modulator of tyrosine metabolism. *Pediatr Blood Cancer* 2006;46(4):517-20.
12. Schramm A, von Schuetz V, Christiansen H, Havers W, Papoutsis M, Wiltling J, et al. High activin A-expression in human neuroblastoma: suppression of malignant potential and correlation with favourable clinical outcome. *Oncogene* 2005;24(4):680-7.
13. Kim MK, Carroll WL. Autoregulation of the N-myc gene is operative in neuroblastoma and involves histone deacetylase 2. *Cancer* 2004;101(9):2106-15.
14. Hermeking H. The MYC oncogene as a cancer drug target. *Curr Cancer Drug Targets* 2003;3(3):163-75.
15. Burchill SA. Micrometastases in neuroblastoma: are they clinically important? *J Clin Pathol* 2004;57(1):14-20.
16. Ribatti D, Ponzoni M. Antiangiogenic strategies in neuroblastoma. *Cancer Treat Rev* 2005;31(1):27-34.
17. Kitanaka C, Kato K, Ijiri R, Sakurada K, Tomiyama A, Noguchi K et al. Increased Ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(5):358-68.
18. Bartkova J, Lukas J, Müller H, Lützhøft D, Strauss M, Bartek J. Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int J Cancer* 1994;57(3):353-61.
19. Molenaar JJ, van Sluis P, Boon K, Versteeg R, Caron HN. Rearrangements and increased expression of cyclin D1 (CCND1) in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;36(3):242-9.
20. Molenaar JJ, Ebus ME, Koster J, van Sluis P, van Noesel CJ, Versteeg R, et al. Cyclin D1 and CDK4 activity contribute to the undifferentiated phenotype in neuroblastoma. *Cancer Res* 2008;68(8):2599-609.
21. Lu X, Lane DP. Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? *Cell* 1993;75(4):765-78.
22. Zhang L, Plon SE, Nuchtern JG, Burlingame S, Blaney S, Rousseau R, et al. Cyclin D and cisplatin cytotoxicity in primary neuroblastoma cell lines. *Anticancer Drugs* 2004;15(9):883-8.
23. Wainwright LJ, Lasorella A, Iavarone A. Distinct mechanisms of cell cycle arrest control the decision between differentiation and senescence in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(16):9396-400.
24. Shinwari Z, Manogaran PS, Alrokayan SA, Al-Hussein KA, Aboussekhra A. Vincristine and lomustine induce apoptosis and p21(WAF1) up-regulation in medulloblastoma and normal human epithelial and fibroblast cells. *J Neurooncol* 2008;87(2):123-32.
25. Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 1994;8(21):2540-51.
26. Lakin ND, Jackson SP. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 1999;18(53):7644-55.
27. Hall M, Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* 1996;68(1):67-108.
28. Sumrejkanchanakij P, Eto K, Ikeda MA. Cytoplasmic sequestration of cyclin D1 associated with cell cycle withdrawal of neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340(1):302-8.