

# Malign Plevral Mezotelyoma Hücre Hattında Histon Asetil Transferaz İnhibitörü Olan Anakardik Asitin Sisplatin Cevabını Arttırıcı Etkisi

## Enhanced Cisplatin Response with Histone Acetyl Transferase Inhibitor, Anacardic Acid, in Malignant Pleural Mesothelioma Cell Line

Hacer İlke ÖNEN,<sup>a</sup>  
Akin YILMAZ,<sup>b</sup>  
Ebru ALP,<sup>c</sup>  
Ali ÇELİK,<sup>d</sup>  
Şevki Mustafa DEMİRÖZ,<sup>e</sup>  
Abdullah İrfan TAŞTEPE,<sup>e</sup>  
Sevda MENEVŞE<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD,  
<sup>b</sup>Göğüs Cerrahisi AD,  
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara  
<sup>c</sup>Moleküler Biyoloji ve Genetik AD,  
Avrasya Üniversitesi  
Fen Edebiyat Fakültesi, Trabzon  
<sup>d</sup>Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD,  
Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Giresun  
<sup>e</sup>1. Göğüs Cerrahisi Kliniği,  
Atatürk Göğüs Hastalıkları ve  
Göğüs Cerrahisi Eğitim ve  
Araştırma Hastanesi, Ankara

Geliş Tarihi/Received: 05.05.2012  
Kabul Tarihi/Accepted: 31.10.2012

Bu çalışma, Türk Solunum Araştırmaları  
Derneği (TÜSAD) tarafından düzenlenen  
TÜSAD 33. Ulusal Kongresi (15-19 Ekim  
2011, İzmir)'nde sözlü bildiri olarak  
sunulmuştur.

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Hacer İlke ÖNEN  
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Ankara,  
TÜRKİYE/TURKEY  
hionen@gazi.edu.tr

doi: 10.5336/medsci.2012-30329

Copyright © 2013 by Türkiye Klinikleri

**ÖZET Amaç:** Malign plevral mezotelyoma (MPM) gelişiminde hücre çoğalması, protein sentezi, enerji üretimi, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ve anjiyogenezde önemli rolleri olan çeşitli sinyal yollarının etkisi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, son yıllarda histon modifikasyonlarını da içine alan epigenetik değişikliklerin kanser gelişiminde etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu değişikliklerin MPM'nin ortaya çıkmasına neden olabileceği düşünülmektedir. Günümüzde, MPM tedavisi için klasik kemoterapi ajanlarının yeni moleküller ile birlikte kullanılması araştırılarak, daha etkili tedavi seçenekleri belirlenmeye çalışılmaktadır. Bu moleküllerden bir tanesi de histon asetil transferaz (HAT) inhibitörü olan anakardik asittir (AA). Çalışmamızda MPM hücre hattında (MSTO-211H: bifazik), AA ile sisplatinin (CDDP) tek başına ve birlikte kullanılmasının, *cMYC*, *NFKB*, *FOXO3A* ve *BCL2L1* genlerinin mRNA düzeyindeki ifadeleri üzerine olan etkilerini belirlemeyi amaçladık. **Gereç ve Yöntemler:** Sisplatin ve AA'nın hücre canlılığı üzerine etkisini belirlemek için 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromür testi uygulandı. Hücre canlılığı testinin sonucunda seçilen uygun dozlar hücrelere uygulandıktan sonra RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA'ların kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) yöntemiyle *cMYC*, *NFKB*, *FOXO3A* ve *BCL2L1* genlerinin mRNA düzeyindeki ifadeleri belirlendi. **Bulgular:** MSTO-211H hücrelerine CDDP'nin 10 µM'in üzerinde uygulanan dozlarının etkili olduğu belirlendi. Hücre canlılığının AA+CDDP uygulanan grupta, CDDP'nin tek başına uygulandığı gruba oranla daha düşük olduğu belirlendi. MSTO-211H hücrelerine AA ön uygulaması, tek başına CDDP uygulamasına oranla araştırdığımız genlerin mRNA'larının ekspresyon düzeylerinin anlamlı derecede azalmasına neden olduğu saptandı. **Sonuç:** Elde ettiğimiz veriler, AA ön uygulamasının hücreleri klasik kemoterapi ajanı olan CDDP'ye daha duyarlı hale getirerek etkili bir hücre ölüm cevabına neden olacağını göstermektedir. Bu prelinik çalışma, MPM gelişiminde epigenetik değişimlerin önemini vurgulamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Sisplatin; anakardik asitler; histon asetiltransferazlar; mezotelyoma

**ABSTRACT Objective:** Various signaling pathways that play important roles in cell proliferation, translation, energy production, cytoskeleton re-organization and angiogenesis are thought to be effective during the development of malignant pleural mesothelioma (MPM). In recent years, it has been shown that epigenetic changes involving histon modifications play important roles in the development of cancer and may also lead to emergence of MPM. Currently, more effective treatment options have been investigated by combining new molecules with the classic chemotherapy agents. One of these molecules is anacardic acid (AA), which is a histone acetyl transferase (HAT) inhibitor. In our study, we aimed to determine the effects of AA and cisplatin (CDDP) combination on *cMYC*, *NFKB*, *FOXO3A* and *BCL2L1* mRNA expression in MPM cell line (MSTO-211H: biphasic). **Material and Methods:** 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide test was performed to determine the effect of cisplatin and AA on cell viability. RNA isolation was performed after the treatment with selected appropriate doses of the cells. *cMYC*, *NFKB*, *FOXO3A* and *BCL2L1* mRNA expression levels were determined by quantitative real-time polymerase chain reaction method from isolated RNA. **Results:** We determined that CDDP doses higher than 10 µM were effective on MSTO-211H cells. Cell viability in the group AA+CDDP was lower than the CDDP alone group. Pretreatment with AA caused a significant decline in the mRNA expression levels of investigated genes compared to CDDP alone in MSTO-211H cells. **Conclusion:** Our data demonstrate that pretreatment with AA lead to an effective cell death response by making cells more susceptible to CDDP, a classical chemotherapeutic agent. This preclinical study emphasizes the importance of epigenetic changes in the development of MPM.

**Key Words:** Cisplatin; anacardic acids; histone acetyltransferases; mesothelioma

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2013;33(2):478-84

**M**align mezotelyoma, plevra veya periton-  
yumda gelişen, kötü prognozlu ve daha  
çok plevral kavitede malign plevral me-  
zotelyoma (MPM) olarak görülen bir tümördür.<sup>1,2</sup>  
Erkeklerde daha sık görülmesi mesleki asbest maruziyetine bağlı iken, asbest maruziyeti olmadan da oluşabilmektedir. Endüstriyel aktivitedeki bölgesel farklılıklar insidansı etkilemektedir. Mesleki olmayan çevresel faktörler, özellikle Korsika, Kıbrıs, Yunanistan ve Türkiye’de rapor edilmiştir.<sup>3,4</sup> Aynı zamanda MPM’nin görülme sıklığının önümüzdeki 30 yıl içinde önemli ölçüde artması beklenmektedir.<sup>5</sup> Amerika’da her yıl yaklaşık 2200 mezotelyoma hastası rapor edilmektedir ve bu hastaların çoğunluğu MPM olmakla birlikte semptomların başlangıcından itibaren 1 yıl içerisinde hastalar kaybedilmektedir.<sup>6,7</sup> MPM tedavisinde birçok klasik tedavi yöntemi yetersiz kalmaktadır.<sup>8,9</sup> Hemen hemen bütün bilinen kemoterapötik ajanlar tek başına veya çeşitli kombinasyonlar halinde tedavi amacıyla denenmiştir fakat klinik cevap oranı nadiren %20’den fazla olmuştur.<sup>10</sup> Ayrıca MPM etkili kemoterapötik ajanlardan olan platin bazlı ilaçlara bile sınırlı cevap oranı göstermektedir.<sup>5</sup>

Transkripsiyonel aktivitenin düzenlenmesinde, histonların asetilasyonu ve deasetilasyonu anahtar rol oynamaktadır.<sup>11</sup> Histon proteinlerinin asetilasyonu ve deasetilasyonu aracılığı ile kromatin yapısının modifikasyonunda görev alan histon asetiltransferazlar (HAT) ve histon deasetilazlar (HDAC) olarak bilinen iki sınıf enzim bulunmaktadır.<sup>12</sup> HAT’lar histonlarda bulunan lizin kuyruklarının amino (NH<sub>2</sub>) uçlarına asetil gruplarının aktarılmasını katalizleyerek nükleomların daha açık bir konformasyonda kalmasını sağlar ve düzenleyici proteinlerin DNA’ya ulaşılabilirliğini artırır. HDAC aktivitesi ise kromatin sıkı paketlenmesine ve transkripsiyonel baskılanmaya neden olur.<sup>11</sup>

HDAC inhibitörleri (HDACi) potansiyel anti-kanser tedavi stratejileri için geniş çalışma alanları bulunmaktadır ve birçoğu son zamanlarda klinik denemelerde kullanılmaktadır.<sup>13</sup> HDAC inhibitörlerinin hücreler üzerinde oldukça fazla etkisinin olduğu bilinmektedir. Bunlar arasında, gen ifade-

lerindeki değişiklikler, hücre gelişiminin durması, farklılaşma ve hücre ölümü yer almaktadır.<sup>14</sup> Diğer taraftan, HAT inhibitörleri (HATi) hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Son zamanlarda HAT inhibitör etkisine sahip birçok bileşik tanımlanmaktadır. İlginç bir şekilde bu inhibitörlerden bazılarının kanser hücrelerinin gelişimini engellediği gösterilmiştir.<sup>15</sup>

Kaju fıstığından (*Anacardium occidentale*) elde edilen anakardik asit (AA) (6-nonadesil salisilik asit), p300 ve PCAF moleküllerinin HAT aktivitesinin in vitro ve in vivo koşullarda potansiyel yarışmasız inhibitörü olarak tanımlanmıştır.<sup>16,17</sup> AA bol miktarda bulunabilen ve farmasötik uygulamalar için ilaç analogu olarak geniş ölçüde türevi oluşturulmuş bir bileşiktir.<sup>18-20</sup>

Çalışmamızda MPM hücre hattında (MSTO-211H: bifazik), histon asetil transferaz inhibitörü olan AA ile sisplatinin (CDDP) tek başına ve birlikte kullanılmasının, hücre canlılığı ve çoğalmasında iş gören transkripsiyon faktörleri (*cMYC*, *NFKB*, *FOXO3A*) ile antiapoptotik *BCL2L1* geninin mRNA ifadeleri üzerine olan etkilerini belirlemeyi amaçladık.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### HÜCRE KÜLTÜRÜ

Bifazik insan malign plevral mezotelyoma MSTO-211H hücre hattı Amerika Hücre Kültür Koleksiyonundan (ATCC, Manassas, VA, ABD)’dan alındı. Hücreler, %10 fetal dana serumu (%10 FBS), 2mM L-glutamin, 100 U/mL penisilin, 100 µg/ml streptomisin içeren RPMI-1640 besiyerinde 37°C’de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda çoğaltıldı.

### HÜCRE CANLILIĞI TESTİ

Anakardik asit (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) ve sisplatin uygulanan hücrelerin uygulama sonrasındaki hücre canlılığı oranları 3 - ( 4 , 5 - d i m e t i l t i a z o l - 2 - y l ) - 2 , 5 - difeniltetrazolium bromür (MTT) testi kullanılarak belirlendi. Hücreler 96 kuyulu kültür kabında her bir kuyuya 10<sup>4</sup> hücre gelecek şekilde ekildi. Hücrelere 1-50 µM arasında değişen dozlarda CDDP ve 25 µM sabit dozda AA uygulandı. Ana-

kardik asitin konsantrasyonu ve süresi Sung ve ark.nın çalışmalarına göre belirlendi.<sup>21</sup> Bir grup hücreye ise 4 saat süre ile AA uygulandıktan sonra aynı doz aralığında CDDP verilerek, 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi bittikten sonra her bir kuyucuğa 10 µl MTT (5 mg/mL) eklendi ve 4 saat süre ile inkübe edildi. Süre sonunda her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklenip formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı. Absorbans değerleri 570 nm'de Spectramax M3 mikropate okuyucu (Molecular Devices, ABD) ile ölçüldü. Her bir doz için deney 5 tekrarlı yapılarak ortalama absorbans değerleri belirlendi. Elde edilen ortalama absorbans değerleri, madde uygulaması yapılmayan kontrole oranlanarak hücre canlılığı üzerine AA ve CDDP'nin etkisi belirlendi.

### RNA İZOLASYONU VE CDNA ELDESİ

MSTO-211H hücrelerine yukarıda belirtilen dozlar ve sürede CDDP ve AA uygulamasından sonra High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) ile hücrelerden total RNA kit protokolüne göre elde edildi. İzole edilmiş RNA'lar daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere -80°C'de saklandı. cDNA sentezi ise, Bir µg total RNA'dan random hegzamerler aracılığı ile Transcriptor First Strand cDNA sentez kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi.

### KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)

*cMYC*, *NFKB*, *FOXO3A* ve *BCL2L1* mRNA ifade düzeyleri LigthCycler®480 cihazı (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kullanılarak belirlendi. Gen bölgelerine özgü intron spanning

primerler ve probler Universal Probe Library Assay Design Center (<https://www.roche-appliedscience.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp>)'da dizayn edildi. Primer dizileri ve prob numaraları Tablo 1'de gösterilmiştir. qPCR koşulları 95°C'de 10 dk'nın ardından, 40 döngü olacak şekilde 95°C'de 15 sn ve 60°C'de 20 sn bekletildi ve son olarak örnekler 40°C'ye soğutuldu. Her bir gen için reaksiyon 3 defa tekrarlandı. Hedef genlerin ifade düzeyleri Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (*GAPDH*) mRNA düzeyi ile normalize edildi.

### İSTATİSTİKSEL ANALİZ YÖNTEMLERİ

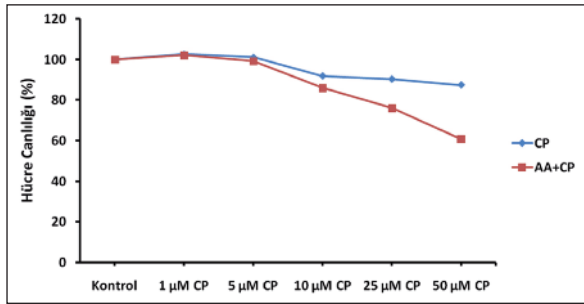
Doza bağlı olarak değişen, *cMYC*, *NFKB*, *FOXO3A* ve *BCL2L1* mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar "Pair-wise Fixed Reallocation Randomization" istatistiksel analiz testi kullanılarak "REST (2009 V2.0.13)" programı ile karşılaştırıldı.<sup>22</sup> p değerlerinin 0,05'den küçük olduğu durumlar istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

### BULGULAR

Sisplatin ve AA'nın hücre canlılığı üzerine etkisini belirlemek için yapılan MTT testi sonuçlarına göre, MSTO-211H hücrelerine CDDP'nin 10 µM ve üzerindeki dozlarda etkili olduğu belirlendi (Şekil 1). Ayrıca, hücre canlılığının AA+CDDP uygulanan grupta, CDDP'nin tek başına uygulandığı gruba oranla daha düşük olduğu belirlendi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 25 µM AA'nın hücre canlılığı üzerinde tek başına fazla bir etkisinin olmadığı görüldü (%98,2). CDDP'nin ise 25 µM ve 50 µM dozlarında 24 saat sonunda hücre canlılığını sırasıyla %90,3 ve %87,5'e düşürdüğü belirlendi (Şekil 2). Dört saat 25 µM AA uygulandıktan sonra eklenen 25 µM ve 50 µM CDDP'nin, 24 saat so-

**TABLO 1:** Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yönteminde kullanılan primer dizileri ve prob numaraları.

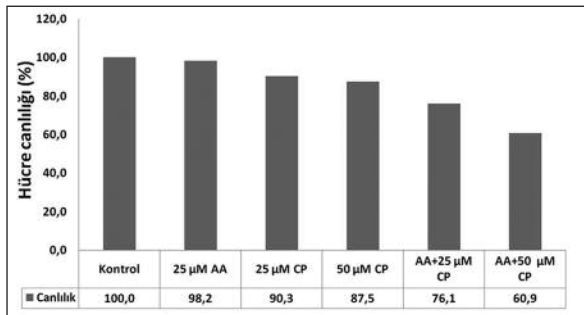
Gen	İleri primer	Geri primer	UPL prob no
<i>cMYC</i>	5'-GCTGCTTAGACGCTGGATTT -3'	5'-TAACGTTGAGGGGCATCG-3'	75
<i>FOXO3A</i>	5'-GATAAGGGCGACAGCAACAG -3'	5'-CGACTATGCAGTGACAGGTTG-3'	58
<i>NFKB</i>	5'-CTGGCAGCTCTTCTCAAAGC-3'	22	
<i>BCL2L1</i>	5'-TTGGACAATGGACTGGTTGA-3'	5'-GTAGAGTGGATGGTCAGTG-3'	28
<i>GAPDH</i>	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	5'-GCCCAATACGCCAAATCC-3'	60



**ŞEKİL 1:** MSTO-211H hücrelerinin (10 000 hücre/kuyu) 24 saat sisplatin inkübasyonu ve 4 saat 25 µM AA uygulamasından sonra 24 saat değişen konsantrasyonlarda sisplatin ile inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları.

CP: Sisplatin, AA: Anakardik asit.

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)



**ŞEKİL 2:** MSTO-211H hücrelerinin (10 000 hücre/kuyu) belirli konsantrasyonlarda 24 saat AA ve sisplatin inkübasyonu ile 4 saat 25 µM AA uygulamasından sonra 24 saat sisplatin inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları.

CP: Sisplatin, AA: Anakardik asit.

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

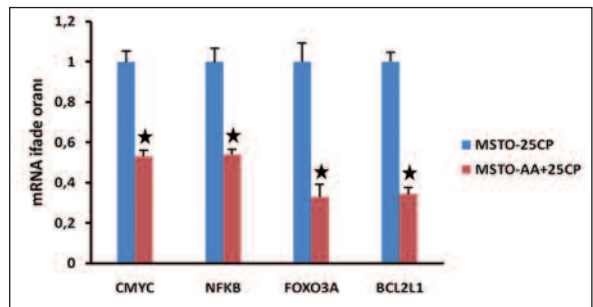
nundaki hücre canlılığı üzerindeki etkisi sırasıyla %76,1 ve %60,9 olarak bulundu (Şekil 2).

25 µM CDDP ile 25 µM AA+25 µM CDDP uygulamaları karşılaştırıldığında, 25 µM AA+25 µM CDDP uygulamasının tek başına CDDP uygulamasına oranla hücre çoğalmasında görevli olan *cMYC*, *NFKB*, *FOXO3A* genlerinin ve antiapoptotik *BCL2L1* geninin mRNA ifade düzeylerinde anlamlı derecede azalma ortaya çıkardığı belirlendi ( $p=0,001$ ) (Şekil 3). Aynı şekilde 50 µM CDDP ile 50 µM CDDP+25 µM AA uygulamaları karşılaştırıldığında, 50 µM CDDP+25 µM AA uygulamasında bu genlerin mRNA ifade düzeylerinde anlamlı derecede azalma olduğu belirlendi ( $p=0,001$ ) (Şekil 4). Sonuç olarak, MSTO-211H

hücrelerine AA ön uygulaması, tek başına CDDP uygulamasına oranla araştırdığımız genlerin mRNA'larının ifade düzeylerinin anlamlı derecede azalmasına neden olduğu saptandı.

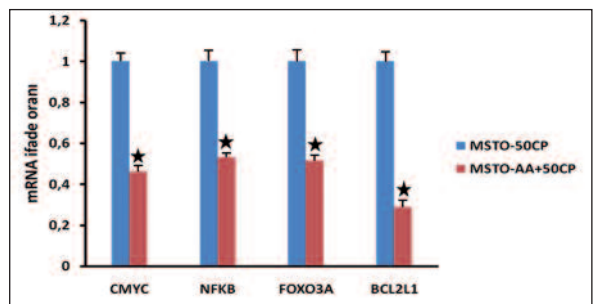
## TARTIŞMA

Mezotelyoma bir çok kemoterapötik ajana dirençli olan bir kanser türüdür ve henüz küratif bir tedavisi bulunmamaktadır.<sup>23</sup> Mezotelyomadaki bu kemorezistansın altında yatan nedenin apoptotik sinyal yolağındaki bozuklukların olduğu düşünülmektedir.<sup>24,25</sup> Proapoptotik ve antiapoptotik genlerin ifade düzeylerini etkileyen bazı genetik değişikliklerin tümörün ilerlemesine neden olduğu düşünülmektedir.<sup>26</sup> Birçok kanser tipinde antiapoptotik etkili BCL-2 alt grubunun indüklendiği



**ŞEKİL 3:** MSTO-211H hücrelerinin 25 µM sisplatin inkübasyonu ve 4 saat 25 µM anakardik asit uygulamasından sonra 25 µM sisplatin inkübasyonu sonrasında *cMYC*, *NFKB*, *FOXO3A* ve *BCL2L1* genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genin ifade düzeyleri *GAPDH* mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi.

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)



**ŞEKİL 4:** MSTO-211H hücrelerinin 50 µM sisplatin inkübasyonu ve 4 saat 50 µM anakardik asit uygulamasından sonra 50 µM sisplatin inkübasyonu sonrasında *cMYC*, *NFKB*, *FOXO3A* ve *BCL2L1* genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genin ifade düzeyleri *GAPDH* mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi.

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

bulunmuştur.<sup>27</sup> Yapılan bir çalışmada malign mezotelyoma hastalarından alınan örneklerde, hücre hatlarında ve neoplastik olmayan mezotelyal epiteliumda *BCL2L1*, *MCL-1* ve *BAX*'ın sürekli ifade edildiği ancak *BCL-2*'nin sadece tümörlerin az bir kısmında ifade edildiği, neoplastik olmayan mezotel hücrelerinde ise ifade edilmediği gösterilmiştir.<sup>28</sup> Varin ve ark.nın yaptıkları bir çalışmada onkojenik stres ve kemoterapiye karşı mezotelyoma hücrelerini korumak için antiapoptotik özellikte olan *MCL-1* ile *BCL2L1* gen ürünlerinin birlikte çalıştığı gösterilmiştir.<sup>5</sup>

MPM tedavisinde kullanılan en önemli kemoterapötik ajanlardan biri sisplatin'dir. Ancak sisplatin kullanımı, yan etkilerinden ve ilaca karşı gösterilen direnç yüzünden sınırlıdır. Bu nedenlerle platin bazlı ilaçların etkinliğinin artırılması ve daha düşük konsantrasyonlarda daha etkili tedavi yapılabilmesi amacıyla, yeni moleküllerin klasik kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanımı planlanarak, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda, platin temelli ilaçlar ile diğer moleküllerin birlikte kullanılmalarının daha etkili sonuçlar verdiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Byrne ve ark.nın yaptığı bir çalışmada, sisplatin ve gemcitabin kombinasyonunun malign mezotelyoma hastalarında tedavi açısından daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir.<sup>29</sup> Verdina ve ark. ise mezotelyoma hücre hatlarında sisplatin ile piroksikamı birlikte kullanmış ve hücrelerin birçok moleküler yolağın etkilenmesiyle duyarlı hale geldiğini göstermişlerdir.<sup>30</sup>

HAT aktivitesindeki değişiklikler kanser ve diğer hastalıklar için temel olaylardan biridir. Meme, over ve gastrik kanserlerde HAT aktivitesinin kontrol kaybı gözlenmiştir.<sup>31,32</sup> Ayrıca, akut miyeloid lösemide HAT genlerinin translokasyonu görülmektedir.<sup>33,34</sup> Bunlara ek olarak kolorektal, gastrik, meme ve pankreatik kanserde ise HAT aktivitesi olan p300 molekülünü kodlayan gende mutasyonların olduğu da bilinmektedir.<sup>35,36</sup>

Bu güne kadar HDAC inhibitörleri ile ilgili birçok çalışma olmasına rağmen HAT inhibitörleri ile ilgili literatürde çok az bilgi vardır. HDAC in-

hibitörlerinin kullanımına benzer olarak, HAT inhibitörleri ile hücre protein/histon asetilasyon kodunun değiştirilmesi, kanser hücrelerinde hücre ölüm programının daha etkili bir şekilde aktifleşmesini sağlayarak yeni antikanser stratejilerinin gelişmesine neden olabileceği akla gelmektedir. HAT inhibitörleri ile yapılan ilk çalışmalarda, Lau ve ark. tarafından koenzim A konjugatı olan potansiyel p300 ve PCAF inhibitörü iki peptid dizayn edilmiş ve sentezlemiştir.<sup>37</sup> Ancak bu inhibitörler hücreye penetrasyonu ve düşük farmakokinetik özelliklerinden dolayı tercih edilmemiştir.<sup>38</sup> Son zamanlarda doğal HAT inhibitörleri (anakardik asit, garsinol, curcumin) tanımlanmıştır.<sup>16,39,40</sup>

Balasubramanyam ve ark. yaptıkları bir çalışmada anakardik asitin PCAF ve p300 HAT'larını in vitro koşullarda 15 µM anakardik asit konsantrasyonunda baskıladığını göstermişlerdir.<sup>16</sup> Daha sonra Sun ve ark.nın yaptığı başka bir çalışmada, in vitro koşullarda AA'nın 10-30 µM konsantrasyonları arasında Tip60 HAT'ın baskılanmasına neden olduğu gösterilmiştir.<sup>17</sup> AA inkübasyonu global hücre HAT aktivitesini baskılayarak bütün histonların ve hücre proteinlerin asetilasyonunda azalmaya neden olur. Histonların N-terminal bölgelerinin asetilasyonu, açık kromatin yapısı ve aktif gen transkripsiyonuna neden olduğundan, AA ile hücre HAT aktivitesinin global inhibisyonu sonucu azalmış histon asetilasyonu, daha sıkı kromatin yapısı ve düşük transkripsiyonel aktivite görülecektir.<sup>41</sup> Bu düşük transkripsiyonel aktivite sonucunda kanser hücrelerinin tedaviye karşı daha fazla cevap verebileceği öngörülmektedir. Örneğin, Sun ve ark.nın yaptığı bir çalışmada, HeLa hücrelerinin hücre HAT aktivitesinin AA ile baskılanması sonucunda iyonize edici radyasyonun sitotoksik etkisine daha duyarlı hale geldiği gösterilmiştir.<sup>17</sup>

Biz de çalışmamızda kullandığımız HAT inhibitörü olan AA'nın, kemoterapi direnci olan MSTO-211H hücrelerinin *BCL2L1* mRNA düzeyinin azalmasına neden olarak sisplatin duyarlılığını arttırdığını gözledik. Bunun sonucu olarak tek başına sisplatin verilen gruba göre mezotelyoma hücrelerinin canlılık oranlarında anlamlı derecede azalma olduğu görüldü. Aynı zamanda, sadece sisp-

latin verilen grupla karşılaştırdığımızda, AA ile birlikte sisplatin verilen hücrelerde proliferasyonla ilgili *cMYC*, *NFKB* ve *FOXO3A* genlerinin mRNA düzeylerinde de anlamlı derecede azalmanın olduğunu belirledik.

## SONUÇ

Elde ettiğimiz veriler, AA ön uygulamasının hücreleri klasik kemoterapi ajanı olan CDDP'ye daha duyarlı hale getirerek etkili bir hücre ölüm ce-

vabına neden olabileceğini göstermektedir. Yapılacak in vitro ve in vivo çalışmalarla sonuçlarımızın desteklenmesi durumunda, epigenetik değişikliklere neden olan ajanların MPM tedavisinde alternatif bir yöntem olabilecektir. Preklinik çalışmamız, mezotelyoma tedavisinde daha etkili olabilecek yeni kemoterapötik ajanların bulunması ve bu ajanların etkilediği moleküler yolların belirlenmesi hastalığın seyrinin iyileştirilmesi ve tedavinin verimli olabilmesi açısından önem taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

- Musk AW, Dolin PJ, Armstrong BK, Ford JM, de Klerk NH, Hobbs MS. The incidence of malignant mesothelioma in Australia, 1947-1980. *Med J Aust* 1989;150(5):242-3, 246.
- Usami N, Fukui T, Kondo M, Taniguchi T, Yokoyama T, Mori S, et al. Establishment and characterization of four malignant pleural mesothelioma cell lines from Japanese patients. *Cancer Sci* 2006;97(5):387-94.
- Battifora H. The pleura. In: Sternberg SS, ed. *Diagnostic Surgical Pathology*. Vol 1. 1<sup>st</sup> ed. New York: Raven Press; 1989. p.829-55.
- Boutin C, Schlessler M, Frenay C, Astoul P. Malignant pleural mesothelioma. *Eur Respir J* 1998;12(4):972-81.
- Varin E, Denoyelle C, Brotin E, Meryet-Figuière M, Giffard F, Abeillard E, et al. Downregulation of Bcl-xL and Mcl-1 is sufficient to induce cell death in mesothelioma cells highly refractory to conventional chemotherapy. *Carcinogenesis* 2010;31(6):984-93.
- Connelly RR, Spirtas R, Myers MH, Percy CL, Fraumeni JF Jr. Demographic patterns for mesothelioma in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1987;78(6):1053-60.
- Ribak J, Selikoff IJ. Survival of asbestos insulation workers with mesothelioma. *Br J Ind Med* 1992;49(10):732-5.
- Musk AW, Woodward SD. Conventional treatment and its effect on survival of malignant pleural mesothelioma in Western Australia. *Aust N Z J Med* 1982;12(3):229-32.
- Ong ST, Vogelzang NJ. Chemotherapy in malignant pleural mesothelioma. A review. *J Clin Oncol* 1996;14(3):1007-17.
- Baas P. Chemotherapy for malignant mesothelioma: from doxorubicin to vinorelbine. *Semin Oncol* 2002;29(1):62-9.
- Song SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2001;70:81-120.
- Inche AG, La Thangue NB. Chromatin control and cancer-drug discovery: realizing the promise. *Drug Discov Today* 2006;11(3-4):97-109.
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anti-cancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5(9):769-84.
- Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6(1):38-51.
- Stimson L, Rowlands MG, Newbatt YM, Smith NF, Raynaud FI, Rogers P, et al. Isothiazolones as inhibitors of PCAF and p300 histone acetyltransferase activity. *Mol Cancer Ther* 2005;4(10):1521-32.
- Balasubramanyam K, Swaminathan V, Ranganathan A, Kundu TK. Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. *J Biol Chem* 2003;278(21):19134-40.
- Sun Y, Jiang X, Chen S, Price BD. Inhibition of histone acetyltransferase activity by anacardic acid sensitizes tumor cells to ionizing radiation. *FEBS Lett* 2006;580(18):4353-6.
- Muroi H, Nihei K, Tsujimoto K, Kubo I. Synergistic effects of anacardic acids and methicillin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorg Med Chem* 2004;12(3):583-7.
- Paramashivappa R, Phani Kumar P, Subba Rao PV, Srinivasa Rao A. Synthesis of sildenafil analogues from anacardic acid and their phosphodiesterase-5 inhibition. *J Agric Food Chem* 2002;50(26):7709-13.
- Kubo I, Muroi H, Himejima M, Yamagiwa Y, Mera H, Tokushima K, et al. Structure antibacterial activity relationships of anacardic acids. *J Agric Food Chem* 1993;41(6):1016-9.
- Sung B, Pandey MK, Ahn KS, Yi T, Chaturvedi MM, Liu M, et al. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor-kappaB-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor-kappaB/alpha kinase, leading to potentiation of apoptosis. *Blood* 2008;111(10):4880-91.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for groupwise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30(9):e36.
- Ramalingam SS, Belani CP. Recent advances in the treatment of malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol* 2008;3(9):1056-64.
- Villanova F, Procopio A, Rippon MR. Malignant mesothelioma resistance to apoptosis: recent discoveries and their implication for effective therapeutic strategies. *Curr Med Chem* 2008;15(7):631-41.
- Fennell DA, Rudd RM. Defective core-apoptosis signalling in diffuse malignant pleural mesothelioma: opportunities for effective drug development. *Lancet Oncol* 2004;5(6):354-62.
- Tchernev G. Apoptotic pathways, cell cycle regulation and cancer progression. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2009;29(4):952-8.
- Yazıcı P, Alizadehshargh S, Akdoğan GG. [Apoptosis: regulatory molecules, its relationship with diseases and apoptosis detection methods: review]. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2009;29(6):1677-86.
- Soini Y, Kinnula V, Kaarteenaho-Wiik R, Kurttila E, Linnainmaa K, Pääkkö P. Apoptosis and expression of apoptosis regulating proteins bcl-2, mcl-1, bcl-X, and bax in malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res* 1999;5(11):3508-15.
- Byrne MJ, Davidson JA, Musk AW, Dewar J, van Hazel G, Buck M, et al. Cisplatin and gemcitabine treatment for malignant mesothelioma: a phase II study. *J Clin Oncol* 1999;17(1):25-30.

30. Verdina A, Cardillo I, Nebbioso A, Galati R, Menegozzo S, Altucci L, et al. Molecular analysis of the effects of Piroxicam and Cisplatin on mesothelioma cells growth and viability. *J Transl Med* 2008;6:27.
31. Sakakura C, Hagiwara A, Yasuoka R, Fujita Y, Nakanishi M, Masuda K, et al. Amplification and over-expression of the AIB1 nuclear receptor co-activator gene in primary gastric cancers. *Int J Cancer* 2000;89(3): 217-23.
32. Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, et al. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 1997;277(5328): 965-8.
33. Panagopoulos I, Fioretos T, Isaksson M, Samuelsson U, Billström R, Strömbeck B, et al. Fusion of the MORF and CBP genes in acute myeloid leukemia with the t(10;16)(q22;p13). *Hum Mol Genet* 2001;10(4):395-404.
34. Aguiar RC, Chase A, Coulthard S, Macdonald DH, Carapeti M, Reiter A, et al. Abnormalities of chromosome band 8p11 in leukemia: two clinical syndromes can be distinguished on the basis of MOZ involvement. *Blood* 1997;90(8): 3130-5.
35. Gayther SA, Batley SJ, Linger L, Bannister A, Thorpe K, Chin SF, et al. Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nat Genet* 2000;24(3):300-3.
36. Muraoka M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Shitara N, Chong JM, et al. p300 gene alterations in colorectal and gastric carcinomas. *Oncogene* 1996;12(7):1565-9.
37. Lau OD, Kundu TK, Soccio RE, Ait-Si-Ali S, Khalil EM, Vassilev A, et al. HATs off: selective synthetic inhibitors of the histone acetyltransferases p300 and PCAF. *Mol Cell* 2000; 5(3):589-95.
38. Cebrat M, Kim CM, Thompson PR, Daugherty M, Cole PA. Synthesis and analysis of potential prodrugs of coenzyme A analogues for the inhibition of the histone acetyltransferase p300. *Bioorg Med Chem* 2003;11(15):3307-13.
39. Balasubramanyam K, Altaf M, Varier RA, Swaminathan V, Ravindran A, Sadhale PP, et al. Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression. *J Biol Chem* 2004; 279(32):33716-26.
40. Balasubramanyam K, Varier RA, Altaf M, Swaminathan V, Siddappa NB, Ranga U, et al. Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. *J Biol Chem* 2004;279(49):51163-71.
41. Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. *Curr Biol* 2004;14(14):R546-51.