

Meme kanseri MCF-7 hücre hattında paklitaksel ve vinkristin'e karşı gelişmiş çoklu ilaç direnci mekanizmalarının mikrodizin analizi ile belirlenmesi

Determination of mechanisms of multiple drug resistance in MCF-7 cell line developed against paclitaxel and vincristine by microarray analysis

Meltem DEMİREL KARS,¹ Özlem DARCANSOY İŞERİ,² Fikret ARPACI,³ Ufuk GÜNDÜZ¹

¹Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Bölümü, Ankara; ²Başkent Üniversitesi, Transplantasyon ve Gen Bilimleri Enstitüsü, Ankara; ³Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Onkoloji Anabilim Dalı, Ankara.

AMAÇ

Sonradan kazanılan veya tedavi öncesi varolan çoklu ilaç dirençliliği (ÇİD) kemoterapide başarıyı engelleyen nedenlerden biridir. Bu çalışmada, paklitaksel ve vinkristin'e karşı gelişen ÇİD mekanizmaları MCF-7 hücre hattında araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

MCF-7 hücreleri önce kademeli olarak paklitaksel ve vinkristin doz artışlarına maruz bırakıldı. Hücrelerin direnç seviyeleri XTT testi ile belirlendi. Tüm dirençli ve duyarlı hücrelerde genlerin düzeyleri mikrodizin yöntemiyle belirlendi.

BULGULAR

MCF-7/400nMPak ve MCF-7/120nMVink hücre hatlarının orijinal hücrelere göre 150 ve 30 kat daha dirençli oldukları bulundu. *MDR1* genin ifadesindeki artışın dirençlilik mekanizmaları arasında önemli olduğu bulundu. Hücrelerde toksik maddelerin metabolize edilmesiyle ilgili genlerin ifade düzeylerinde artışlar gözlenirken, apoptozla ilgili bazı genlerin ifadelerinde azalmalar olduğu görüldü. Metastaz genlerinde, bazı onkojenlerde, hücre döngüsünü düzenleyen ve tübülün metabolizmasıyla ilgili genin ifade düzeylerinde değişimler saptandı.

SONUÇ

ÇİD'de *MDR1* genindeki değişikliğin MCF-7'de paklitaksel ve vinkristin dirençliliğinde temel mekanizma olduğu görülmüştür.

Anahtar sözcükler: Apoptotik yolak; beta tübülün; çoklu ilaç dirençliliği; MCF-7; mikrodizin analizi.

OBJECTIVES

Acquired or intrinsic multiple drug resistance (MDR) is one of the limitations for successful chemotherapy. In this study, MDR mechanisms developed after paclitaxel and vincristine application in MCF-7 cell line were investigated.

METHODS

Paclitaxel and vincristine were applied to MCF-7 cell line in stepwise manner. The resistance levels of the cells were determined by XTT test. The levels of all of the genes in resistant and sensitive cells were determined by microarray assay.

RESULTS

MCF-7/400nMPac and MCF-7/120nMVinc cells are 150- and 30-fold resistant compared to sensitive MCF-7. Upregulation of *MDR1* gene is found to be important in resistance. The expression levels of the genes encoding detoxifying enzymes were upregulated and some apoptotic gene levels were down-regulated. Changes in expression levels of metastatic genes, some oncogenes, cell cycle, and tubulin-related genes were found.

CONCLUSION

According to these results, change in expression level of *MDR1* gene seems to be important in resistance in MCF-7 cells.

Key words: Apoptotic pathway; beta tubulin; multiple drug resistance; MCF-7; microarray analysis.

18. Ulusal Kanser Kongresi'nde sunulmuştur (21-26 Nisan 2009, Antalya). Presented at the 18th National Cancer Congress (April, 21-26 2009, Antalya, Turkey).

İletişim (Correspondence): Dr. Ufuk GÜNDÜZ. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Bölümü, Ankara, Turkey.

Tel: +90 - 312 - 210 51 83 Faks (Fax): +90 - 312 - 210 79 76 e-posta (e-mail): ufukg@metu.edu.tr

© 2009 Onkoloji Derneği - © 2009 Association of Oncology.

Kemoterapi, meme kanseri tedavisinde uygulanan en yaygın ve etkili yöntemdir. Ancak, kemoterapi süresince, hastaların tedaviye cevap vermemesi veya tedavi sonrası kanserin tekrarlaması sıklıkla görülen bir durumdur.^[1] Kanser tedavisinde başarıya ulaşmak için genellikle birden fazla antikanser ilacı uygulanmaktadır. Ancak, sonradan kazanılan ya da tedavi öncesi kişide varolan ilaç dirençliliği, kanser kemoterapisinde başarıya ulaşmayı büyük ölçüde engellemektedir. Bu duruma “çoklu ilaç dirençliliği” (ÇİD, *multiple drug resistance*; MDR) denilmektedir.^[2] Kemoterapiye karşı geliştirilen dirençlilik pekçok antikanser ilacın hastalar üzerinde beklenen etkisini gösterememesine ve hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır. Artırılan ilaç dozları ise hastalarda görülen yan etkilerin artmasına neden olmaktadır. Ayrıca, dirençlilik nedeniyle zaman ve ilaç kaybı olmakta, hastaların tedavisi zorlaşmaktadır.

Bu çalışmada amaç, paklitaksel ve vinkristin'e karşı gelişen ÇİD mekanizmalarının meme kanserine model hücre hattında (MCF-7'de) belirlenmesidir. MCF-7 hücre hattında ilaç dirençliliği fenotipine neden olan moleküler mekanizmaların incelenmesi, hastalığı moleküler düzeyde anlamayı ve hücrelerin kemoterapötiklere olan direncini önleyebilmek için yöntem geliştirilmesini sağlayacaktır.

Bitki alkaloidlerinden taksoid grubu ilaçlardan olan paklitaksel mitoz bölünme sırasında mikrotübüllerin β -tübülün alt grubuna bağlanarak, mikrotübüllerin tübülünlere dönüşmesini ve mitoz bölünme sırasında oluşan iğ ipliklerinin yıkımını engeller ve hücre bölünmesini durdurur.^[3] Memelilerde altı β -tübülün izotipi bulunmaktadır ve izotiplerin ekspresyonları dokulara özgündür. Vinka alkaloidler, Cezayir menekşesinden (*Catharanthus roseus*) elde edilmektedir. Vinkristin uygulanan hücreler, zayıf olan mitotik iğ iplikleri yüzünden normal mitozu devam edemezler ve hasar gören bu hücreler ölürler.^[4]

Hücrelerdeki, zararlı ve toksik maddeleri uzaklaştıran biyokimyasal sistemlerin olduğu bilinmektedir. İlaç tedavileri sırasında bu sistemlerin güçlendiği ve kemoterapötik ilaçların etkili bir şekilde hücre dışına atıldığı görülmüştür. Çoklu ilaç dirençliliğine neden olan mekanizmalardan bazıla-

rı, ABC taşıyıcı gen ailesi proteinlerinin ekspresyonlarındaki artış, hücreleri programlanmış ölüme (apoptoz) götüren yollardan bazılarının bloke olması ve ilaç hedef moleküllerindeki değişimlerdir.^[5-8]

Moleküler düzeyde yapılacak çalışmalar, kanser tedavi stratejilerinin belirlenmesinde önemlidir. Çoklu ilaç dirençliliğine sebep olan genlerin etkisinin tanımlanması sonucunda kemoterapi için kullanılan ilaç stratejilerine kişiye özel olarak şekillendirilebilir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Dirençli Hücre Hatlarının Geliştirilmesi, Kültür Ortamı

Meme kanserine model hücre hatlarından biri olan MCF-7 hücreleri, 69 yaşında beyaz ırk bir bayan hastanın meme epitel dokusundan elde edilmiştir. Tek katmanlı büyüyen yapışkan hücre hattıdır. Hücrelerde %10'luk (v/v) fetal dana serumu (Fetal bovine serum, FBS, Biochrom AG, Berlin) 2 mM L-glutamin, içeren RPMI 1640 (Biochrom AG, Berlin) kullanılır; mikrobiyal enfeksiyonu önlemek için de vasata gentamisin (1 mg/mL, Biological Industries, Israel) eklenerek, 37°C'de, %5'lik CO₂'de Heracell inkübatörde üretilmiştir.^[9] Yapışkan hücreler, hücre kültür kabının %70'ini kapladığında tripsin-EDTA ile pasajlanmıştır. Hücreler kademeli olarak paklitaksel (0.1 nM- 400 nM) ve vinkristin (2 nM- 120 nM) doz artışlarıyla muamele edilerek dirençli hale getirilmiştir. Elde edilen hücreler MCF-7/400nMPak ve MCF-7/120nMVink olarak adlandırılmıştır.

Sitotoksite Analizi (XTT)

XTT yönteminde^[10] 96 kuyulu plaklarda, her kuyuya 5000 hücre ekildi. Bir gece inkübasyondan sonra, hücrelerin üzerine artan dozlarda antikanser ilaç eklenmiştir. 72 saat inkübasyonun ardından her kuyuya XTT (Sodium 3,3'-{1-[(phenyl amino) carbonyl]-3,4 tetrazolium}-Bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate; Biological Industries, Israel) solüsyonu eklenmiştir (50 μ l/kuyu). 2-3 saat inkübasyondan sonra, ELISA okuyucuda (Spectromax 340 96-well plate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 500 nm arasında optik yoğunluklar belirlenerek her ilaç

için IC_{50} hesaplanmıştır. Duyarlı ve dirençli hücrelerin IC_{50} değerleri kullanılarak hücrelerin dirençlilik indisleri $R = IC_{50} \text{ dirençli hat} / IC_{50} \text{ duyarlı hat}$ denklemi ile belirlenmiştir.

RNA İzolasyonu ve Komplement RNA Sentezi

Duyarlı ve dirençli hücre hatlarından TRI Reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA) kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA kalitesi OD_{260nm} / OD_{280nm} : 1.8-2.0 oranında ve konsantrasyonu en az $2.5 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ dir.^[11] Her hücre hattından iki RNA örneği alınmıştır. Mikrodizin analizi her hat için iki defa yapılmıştır. RNA örneklerinden komplement DNA One-Cycle Target Labelling Assay (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) ile elde edilmiştir. IVT işaretleme yöntemi ile biyotinli cRNA Affymetrix GeneChip kit kullanılarak elde edilmiş ve cRNA örnekleri Mg^{+2} ile muamele edilerek kırılmış ve hibridizasyon işlemi için hazırlanmıştır.

Hibridizasyon ve Örneklerin Taranması

Biyotin ile işaretlemiş ve kırılmış olan komplement RNA örnekleri kontrol cRNA'lar ile birlikte 49/64 format tip Affymetrix GeneChip® (Human Genome U133 Plus 2.0 Array) çiplerine yüklenmiştir. Hibridizasyon işlemi Affymetrix GeneChip® Hybridization Oven 640 hibridizasyon fırınında 45°C 'de, 60 rpm'de 17 saat yapılmıştır. Yıkama ve tarama Affymetrix GeneChip® Fluidics Station 450 ve Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 yıkama-tarama istasyonunda yapılmıştır.

Data Analizi ve Gen Listelerinin Belirlenmesi

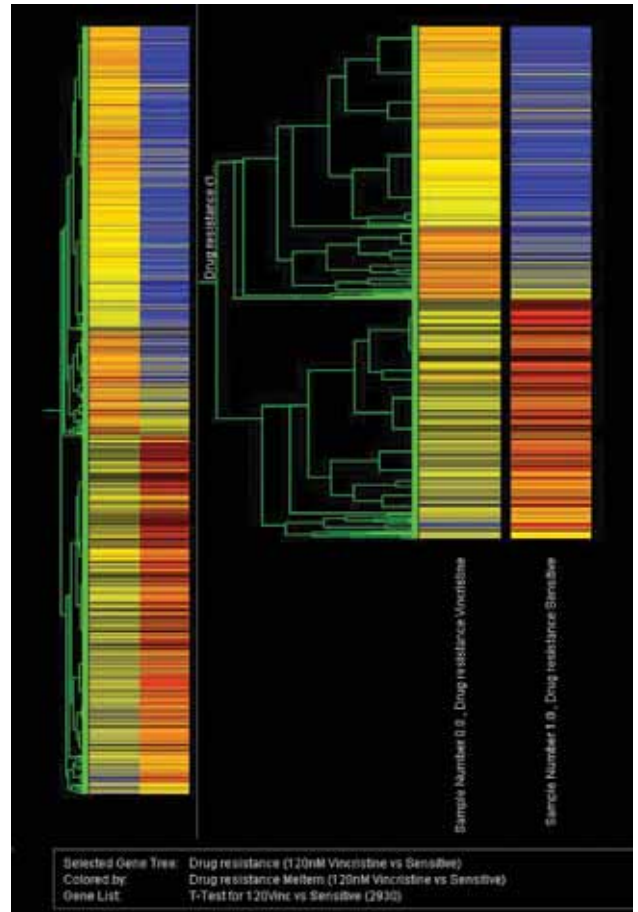
İlk analiz Affymetrix GeneChip Operating Software (GCOS) program kullanılarak yapılmıştır. Kalite kontrol için poliA kontrol sinyalleri ve çip arka plan sinyalleri temel olarak değerlendirilmiştir. GeneSpring GX 7.3.1 programı (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) kullanılarak ileri data analizi ve değerlendirmesi yapılmıştır. Data Robust Multichip Average (RMA) normalizasyon algoritmaları ile normalleştirilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı replica data bağımsız t-test ($\alpha=0.05$) ile seçilmiştir. Dirençli ve duyarlı hücre hatları arasında anlamlı olarak ifade düzeyi değişmiş olan genlerle standart korelasyon kullanılarak gen ağaçları oluşturulmuştur (Şekil 1). Genler volcano plot ile (Şekil 2) filtrelenmiştir. İfade düzeyi iki kat ve daha fazla

artan ve azalan genler filtrelenip listelenmiştir. Paklitaksel ve vinkristin dirençliliği gelişiminde etkili olan genler ve dirençlilik gelişirken ifade düzeyleri değişen genler belirlenmiştir.

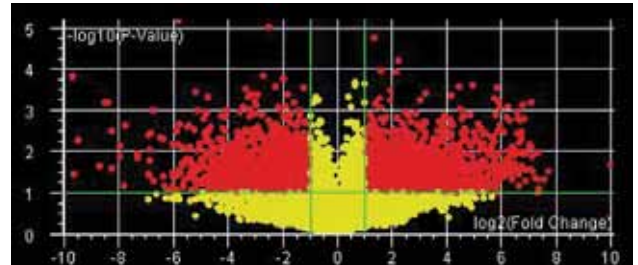
BULGULAR

Sitotoksosite Analizi (XTT)

XTT sitotoksosite sonuçlarına göre (Tablo 1) MCF-7/400nMPak ve MCF-7/120nMVink hü-



Şekil 1. MCF-7/120nMVink ve MCF-7/S karşılaştıran gen ağacı.



Şekil 2. MCF-7/120nMVink hücre hattında duyarlı hücreye göre ifadesi iki kat ve daha fazla artan ve azalan genlerin Volcano plot ile filtrelenmesi.

Tablo 1

Antikanser ajanların duyarlı ve dirençli MCF-7 hücre hatlarına antiproliferatif etkisi ve dirençlilik indisleri

Hücre hattı	Antikanser ajan	IC ₅₀ (µM) ± SEM ^γ	Dirençlilik indisi
MCF-7/S	Paklitaksel	2.12±0.23	–
	Vinkristin	5.45±0.66	–
MCF-7/400nMPak	Paklitaksel	317.94±0.20	149.98*
MCF-7/120nMVink	Vinkristin	162.29±2.19	29.78*

^γ Standart error of the means: standart hata; * Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır (p<0.05).

re hatları uygulanan seçici ajanlara 150 ve 30 kat dirençlilik geliştirmişlerdir. Gelişen dirençlilikte hangi genlerin ifade düzeylerinin değişimlerinin etkili olduğu mikrodizin analizleri sonucunda belirlenmiştir.

Hibridizasyon ve Örneklerin Taranması

Hibridizasyon, yıkama ve tarama işlemlerinden sonra tüm örnekler kalite kontrollerinden geçmiş ve Şekil 3'deki görüntü elde edilmiştir.

Mikrodizin Analizi

Mikrodizin analizi duyarlı ve dirençli MCF-7 hücre hatlarında paklitaksel ve vinkristin dirençliliğinin mekanizmalarının detaylı olarak belirlenmesini sağlamıştır. Pek çok biyolojik yollar ile ilaç dirençliliği ilişkileri değerlendirilmiştir. Mikrodizin analiz sonuçları seçilen bazı gen ve proteinler için GT-PZR, Western Blot ve İmmün Sitokim-

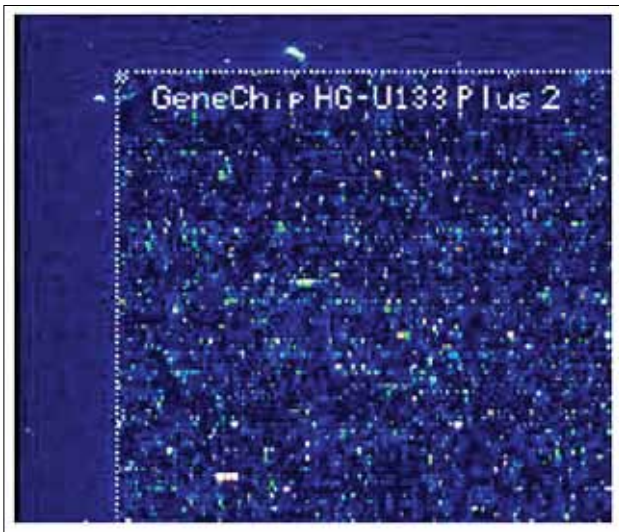
ya teknikleri ile de doğrulanmıştır. MCF-7 hücre hattında paklitaksel ve vinkristin dirençliliği gelişimiyle önemli bağlantısı olan genler ilişkilendirilerek paklitaksel ve vinkristin dirençliliğine neden olan ve dirençlilik gelişirken ortaya çıkan mekanizmalar şematize edilmiştir (Şekil 4, 5).

TARTIŞMA

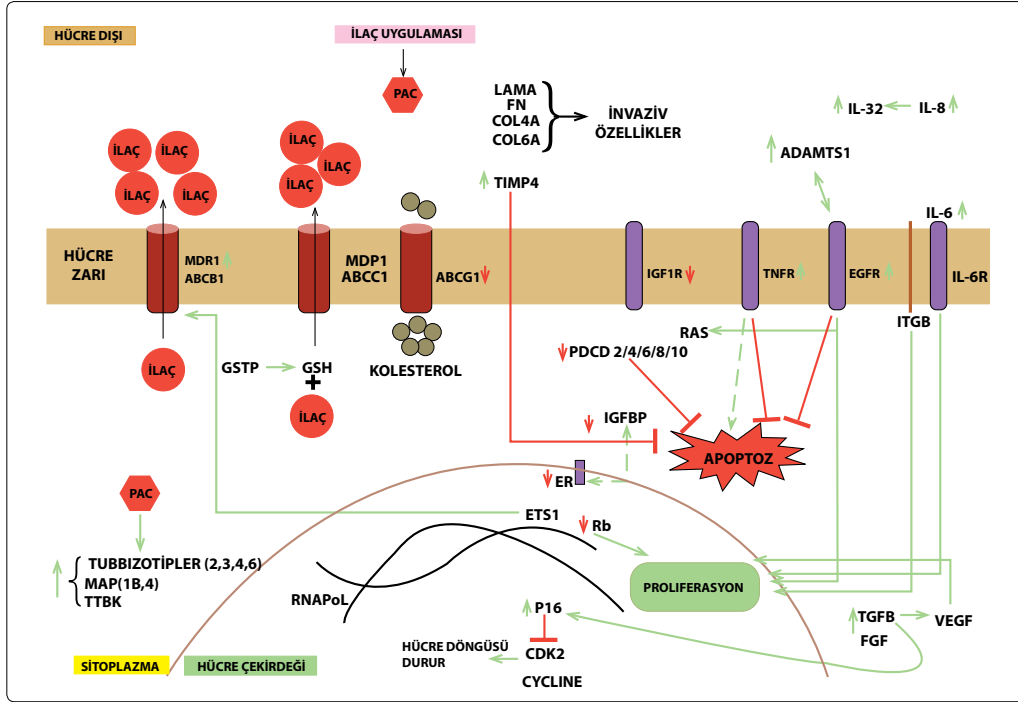
Mikrodizin analiz sonuçlarına göre, *MDR1* geni aşırı ifadesinin MCF-7/400nMPak and MCF-7/120nMVink hücrelerindeki dirençliliğin en önemli nedeni olabileceği tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra ilaçları detoksifiye eden glutathion-S-transferaz (GST) enzimini kodlayan gen (*GSTP1*) ifade düzeyindeki artışında hücre hatlarında önemli bir dirençlilik mekanizması olduğu ve MRP1 proteini yardımıyla ilaç pomplanmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu bulgular literatürdeki bilgilerle paraleldir.^[12]

Beta-tübülün izotiplerinin ifade düzeylerindeki değişimler de adı geçen ilaçlara gelişen dirençlilik için önemli görülmektedir. Tau tübülün kinaz enzimini kodlayan *TTBK* gen ifadesindeki artış da meme kanserinde paklitaksel dirençliliği için önemli bir mekanizma olabilir. Rouzier ve grubu mikrotübül ile ilgili protein tau meme kanserinde paklitaksel dirençliliği ile ilgisinin olduğunu göstermiştir.^[13] Mikrotübül ile ilgili genlerin ifade düzeyleri iki hücre hattında da çoğunlukla artış göstermiştir. Mikrotübül dinamiğindeki değişimler antikanser ilaçların mikrotübüllere olan bağlanma özelliklerinde etkili olarak ilaç dirençliliği gelişimine neden olmuş olabilir.

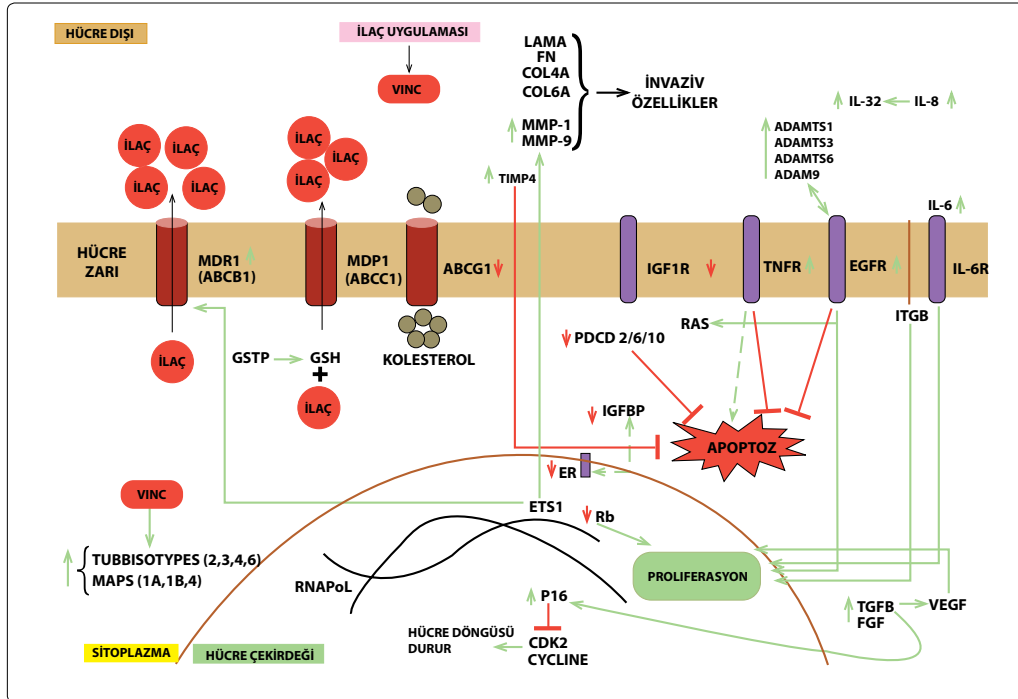
Apoptotik yollarda bulunan, büyüme faktörlerini ve reseptörlerini kodlayan, tümör mikro çevresinde rol alan ve hücre döngüsünde etkili olan



Şekil 3. Yıkama ve tarama işlemini sonucunda elde edilen çip görüntüsü.



Şekil 4. MCF-7 hücrelerinde paklitaksel dirençliliğinde önemli mekanizmalar.



Şekil 5. MCF-7 hücrelerinde vinkristin dirençliliğinde önemli mekanizmalar.

bazı genlerin ifade düzeylerindeki değişimler dirençli hücre hatlarında artan bölünme özelliğine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu bulgular daha önce yapılan çalışmalarla benzerdir.^[14-20]

Çalışmadan elde edilen bulguların değerlendirilmesi ile klinikte sıkça kullanılan ilaçların direnç geliştirme özelliklerinin klinisyenler tarafından önceden bilinmesine yardımcı olacaktır. Bu ara-

tırmalar, bireysel ilaç tedavi stratejilerinin ve yeni terapi yöntemleri geliştirilmesini sağlayacaktır. Kişiyeye özel ilaç tedavileri ve ilaç dirençliliğinin geri dönüşürülmesi kanser tedavisinin klinik başarısını artıracaktır.

Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından SBAG 106S019 kodlu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Krishan A, Fitz CM, Andritsch I. Drug retention, efflux, and resistance in tumor cells. *Cytometry* 1997;29(4):279-85.
2. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(9):3004-8.
3. Fitzpatrick FA, Wheeler R. The immunopharmacology of paclitaxel (Taxol), docetaxel (Taxotere), and related agents. *Int Immunopharmacol* 2003;3(13-14):1699-714.
4. Drukman S, Kavallaris M. Microtubule alterations and resistance to tubulin-binding agents (review). *Int J Oncol* 2002;21(3):621-8.
5. Liu Y, Peng H, Zhang JT. Expression profiling of ABC transporters in a drug-resistant breast cancer cell line using AmpArray. *Mol Pharmacol* 2005;68(2):430-8.
6. Reed JC. Bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995;9(2):451-73.
7. Kavallaris M, Tait AS, Walsh BJ, He L, Horwitz SB, Norris MD, et al. Multiple microtubule alterations are associated with Vinca alkaloid resistance in human leukemia cells. *Cancer Res* 2001;61(15):5803-9.
8. Huzil JT, Luduena RF, Tuszynski J. Comparative modelling of human β tubulin isotypes and implications for drug binding. *Nanotechnology* 2006;17:90-100.
9. Kars MD, Iseri OD, Gündüz U, Ural AU, Arpacı F, Molnár J. Development of rational in vitro models for drug resistance in breast cancer and modulation of MDR by selected compounds. *Anticancer Res* 2006;26(6B):4559-68.
10. İşeri ÖD, Kars MD, Eroğlu S, Gündüz U. Drug Resistant MCF-7 Cell Lines Also Developed Cross-resistance to Structurally Unrelated Anticancer Agents. *Int J Hematol Oncol* 2009;19(1):1-8.
11. İşeri OD, Kars MD, Arpacı F, Gündüz U. Gene expression analysis of drug-resistant MCF-7 cells: implications for relation to extracellular matrix proteins. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009 Jun 19. DOI 10.1007/s00280-009-1048-z.
12. Lage H. Drug resistance in breast cancer. *Cancer Therapy* 2003;1:81-91.
13. Rouzier R, Rajan R, Wagner P, Hess KR, Gold DL, Stec J, et al. Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(23):8315-20.
14. Lee JH, Rho SB, Chun T. Programmed cell death 6 (PDCD6) protein interacts with death-associated protein kinase 1 (DAPk1): additive effect on apoptosis via caspase-3 dependent pathway. *Biotechnol Lett* 2005;27(14):1011-5.
15. Baron BW, Anastasi J, Thirman MJ, Furukawa Y, Fears S, Kim DC, et al. The human programmed cell death-2 (PDCD2) gene is a target of BCL6 repression: implications for a role of BCL6 in the down-regulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(5):2860-5.
16. Shih SC, Claffey KP. Role of AP-1 and HIF-1 transcription factors in TGF-beta activation of VEGF expression. *Growth Factors* 2001;19(1):19-34.
17. Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Julien S, Prévost G, Zimmer A, et al. Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. *Drug Resist Updat* 2008;11(4-5):123-51.
18. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 1993;54:1-78.
19. Hazlehurst LA, Landowski TH, Dalton WS. Role of the tumor microenvironment in mediating de novo resistance to drugs and physiological mediators of cell death. *Oncogene* 2003;22(47):7396-402.
20. O'Loughlin C, Heenan M, Coyle S, Clynes M. Altered cell cycle response of drug-resistant lung carcinoma cells to doxorubicin. *Eur J Cancer* 2000;36(9):1149-60.