

## RETİNOİK ASİT İLE İN VİTRO İNSAN KOLON ADENOKANSER HÜCRELERİNDE BASKILANAN PROLİFERASYONDA PROTEİN KİNAZ C ENZİM AKTİVİTESİNDE DEĞİŞİM

Timur Tuncalı<sup>1</sup>

### PROTEIN KINASE C ACTIVITY DIFFERENCE IN THE INHIBITION OF PROLIFERATION OF HUMAN COLON ADENOCANCER CELLS IN VITRO WITH RETINOIC ACID

**Summary:** Retinoic acids as the active metabolites of vitamin A and its analogues have pleiotropic effects on growth, differentiation, proliferation, and development. Retinoic acid, and its analogues determine pattern formation and inhibit tumor growth. There is a potential clinic use for retinoids in cancer prevention and treatment. The biological effects of retinoic acid are mediated by its receptors; to date several of them have been characterized. The presence of multiple receptors for one ligand is adding difficulties to the understanding of the underlying mechanisms of diverse actions of retinoic acids especially for their antiproliferative and differentiative effects in the cell. It's known that protein kinase C (PKC) has a role in a multitude of cellular functions such as growth and differentiation controls, and in the transformation of the cells to lead tumorigenesis true viral oncogenes. Present study aimed to investigate the relation of PKC enzyme with its cellular signal transduction function to the effect of one of the synthetic metabolites of retinoic acids, 13-cis-retinoic acid, causing inhibition of proliferation of human colon adenocancer cell line HT-29 cells. The results showed statistically significant increase in the total cellular PKC activity with 10<sup>-6</sup> molar concentration of 13-cis-retinoic acid in paralel to cells under this influence demonstrating dose and time dependent decrease in proliferation in the range of 10<sup>-10</sup>-10<sup>-5</sup> molar concentrations in 24 to 120 hours of incubation periods. This observation indicated that the activation of PKC involves translocation of PKC from the cytosol to the membrane and the translocation was at its maximum after 96 hours of incubation with retinoic acid. Furthermore, the increase in the total PKC content indicated that retinoic acid induced new protein synthesis.

**Key Words:** Retinoic acid, human colon cancer cells, proliferation, PKC activity.

**Özet:** A vitamininin aktif metaboliti olan retinoik asit büyüme, çoğalma, farklılaşma ve gelişme üzerine değişik etkilere sahiptir. Retinoik asit ve analogları doku ve organ oluşumlarını belirleyebilmekte ve tümör büyümesini durdurabilmektedir. Retinoidlerin kanserden korunma ve tedavi amacıyla kullanımı klinik açıdan önem taşımaktadır. Retinoik asitlerin biyolojik etkileri reseptörleri üzerinden olup bugüne kadar bir çoğu tanımlanabilmiştir. Bir liganda karşılık birden çok reseptörün varlığı, retinoik asit ve reseptörlerinin çeşitli kompleks biyolojik işlevleri özellikle antiproliferatif ve diferansiyatif etkilerindeki mekanizmaların anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. Hücre bölünmesinin büyüme faktörleriyle kontrolünde ve çeşitli viral onkogenler ile sağlanan transformasyonlarla hücrelerin tümörleşmesinde protein kinaz aktivitesinin rolü olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, retinoik asit sentetik metabolitlerinden 13-cis-retinoik asitin insan kolon adenokanser hücreleri HT-29'larda in vitro antiproliferatif etkisinin hücrede sinyal iletiminden sorumlu protein kinaz C (PKC) enzim sistemi ile olan ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bulgular, HT-29 hücrelerinin retinoik asitin 10<sup>-10</sup>-10<sup>-5</sup> molar konsantrasyonlarında 24-120 saat süreyle inkübasyonu ile doza ve zamana bağlı olarak proliferasyon inhibisyonu sağladığını, buna paralel olarak 10<sup>-6</sup> molar konsantrasyonda retinoik asit etkisi altında total hücre PKC enzim aktivitesinde istatistiksel



anlamli artış olduğunu göstermektedir. PKC enzim aktivitesi sitoplazma ve membranda farklılık göstermekte ve zamana bağlı olarak enzim aktivitesi membrana doğru yer değiştirmektedir. Bununla birlikte total hücresel PKC aktivitesindeki artış retinoik asitin yeni protein sentezini de indüklediğinin göstergesidir.

**Anahtar Kelimeler:** Retinoik asit, insan kolon kanser hücreleri, proliferasyon, PKC aktivitesi

## GİRİŞ

Retinoidler, A vitamininin sentetik ve doğal türevlerini içeren bir kimyasallar grubudur. A vitamininin in vivo ve in vitro: normal, premalin ve malin epitelyal ve mezenşimal hücrelerde çoğalmayı ve farklılaşmayı düzenleyici etkisi vardır (1). Retinoidlerin in vivo fizyolojik etkileri içinde, morfojenik ve gelişimsel düzenlenmeler, keratinize olmayan epitel dokularda skuamöz hücrelere farklılaşmadan korunma, bazı mezenşimal dokuların farklılaşmasının kontrolü ve immün yanıtın belli aşamalarının düzenlenmesi sayılmaktadır (2). Retinoidler farklı tümör hücrelerinde çoğalma ve farklılaşma üzerine in vivo ve in vitro özgül olarak etki gösterirler. Örneğin, embriyonal karsinoma hücrelerinde, nöronal, endodermal veya mezenşimal yönde farklılaşmayı arttırmakta; nöroblastoma hücrelerinde nöronal farklılaşmayı, promyelositik lösemi hücrelerinde miyeloid farklılaşmayı, premonositik lösemi hücrelerinde monositoid farklılaşmayı, eritrolösemik hücrelerde eritroyid ve melanoma hücrelerinde melonositik farklılaşmayı uyarabilmektedirler(3). Deney hayvanlarında karsinogenezi baskılaması ve tümör büyümesini durdurması ve bazı malign tümörlerde etkili kemopreventif ve terapötik etkileri gözlenmiştir (4,5).

All-trans retinoik asit (RA) akut promyelositik lösemide remisyona giriş açısından etkili bir ajan olarak son on yıldır klinikte tedavi şemalarına alınmış ve farklılaşma tedavisi açısından umut verici olmuştur (6). Retinoidlerin farklılaşma ve hücre çoğalmasına etkilerinin özgül reseptörleri üzerinden olduğu saptanmış ve işlevleri aydınlatılmaya başlanmıştır. Retinoik asit reseptörleri, steroid, D vitamini, tiroid hormon reseptörleri ve peroksizom proliferatör ile uyarılan reseptörlerin de içinde

olduğu, ligand ile uyarılabilen transkripsiyon faktörleri ailesi içinde sayılmaktadır. Bu reseptörlerin hepsinin ortak özelliği DNA üzerinde hedef diziler veya hormon yanıt elemanları diye adlandırılan regülatör bölgelere bağlanmaları ve liganda sınırlı olarak genlerde transkripsiyonu uyarabilmeleridir(7). Hücresel retinoik asit reseptörleri (RAR), farklı retinoid analoglarının bağlanarak üzerlerinden etki göstermeleri nedeniyle iki grupta toplanmaktadırlar. Bunlar, RAR'ler ve retinoid X reseptörleri (RXR'leri)'dir (8).

Kolon kanseri yüksek insidansı ve yüksek mortalite oranı ile kanser ölümlerinde ikinci sıradadır (9). Birbiri peşi sıra oluşan mutasyonlar ile normal kolon mukoza hücreleri malinleşmeden önce poliplere (adenom aşaması) değişmektedirler. Hücresel onkogenlerin nokta mutasyonları veya amplifikasyonlar ile somatik aktivasyonu ve yine aynı mekanizmalar veya delesyonlarla tümör süpresör genlerin inaktivasyonu gibi genetik değişikliklerin birbiri üstüne birikmesi ile klinik açıdan da paralellik gösteren kanser oluşmaktadır (10). Kolon kanserinde konvansiyonel tedaviler yanı sıra alternatifleri üzerinde de çalışılmaktadır. "Nonsitotoksik" terapi olarak olarak adlandırılan ve aralarında RA'lerin de bulunduğu diferansiye edici ajanların kullanıldığı yöntemlerde tedavi ilkesi farklılaşmanın indüklenmesi veya kanser hücresinin normal büyüme mekanizmasının geri kazandırılması temeline dayanmaktadır (11).

Protein kinaz C (PKC) enzim ailesi kalsiyum ve fosfolipitlere bağlı çalışan enzimlerin izoformlarıdır. Bu enzimler proteinlerin serin ve treonin kısımlarını fosforile ederler. Bir çok hormon, büyüme faktörü ve nörotransmitter hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak fosfolipaz C'yi aktive ederek fosfo-

tidilinozitol fosfatı inozitol trifosfata (IP3) ve diaçilgliserole (DAG) dönüştürür. IP3 intrasellüler kalsiyum salınımını artırırken DAG PKC'ye bağlanarak aktivasyonunu sağlar (12). PKC'nin forbol ester tümör oluşturuçuları ile uyarıldıkları bilinmektedir. PKC'nin hücre çoğalma ve farklılaşmasında ve tümör oluşumunda farklı ve çeşitli işlevleri olduğu düşünülmektedir. PKC'nin fosforile edebileceği ve hücrede proliferasyon ve diferansiyasyonda rolü olabilecek substratlar bütünüyle ortaya konamamış olsa da tanımlananlar arasında büyüme faktörleri, nükleer ve ekstranükleer kompartmanlarda etkili protoonkogen ürünleri bulunmaktadır. Hücre çoğalmasının kontrolü, viral onkogenler ile transformasyon ve büyüme faktörleri PKC'nin aktivasyonu ile birliktelik göstermektedir. Normal kolon epitel hücrelerinde PKC aktivasyonu proliferasyonu arttırmaktadır (13). Bu enzim grubunun moleküler ve biyokimyasal özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalar PKC'nin memeli canlılarda yedi izoformu olduğunu göstermektedir. Bu izoformlardan a, b (I/II), g ve d iyi tanımlanmışlardır. RA etkisi altındaki normal ve tümör hücrelerinde PKC izoformları dokuya özgü farklı ifade göstermektedir (14). Örneğin insan nöroblastoma hücrelerinde RA diferansiyasyonu indüklerken PKC-a ve N-myc mRNA sentezinde azalma gözlenmiştir (15). Buna karşın B16 fare melanoma hücrelerinde RA ile baskılanan çoğalma ve indüklenen diferansiyasyon PKC-a ve -b mRNA'larında ifade artışı ile birliktelik göstermekte, -g mRNA ifadesini etkilememektedir (16). Hormon etkisi ile çoğalan T-47D insan meme kanseri hücrelerinde RAR aktivasyonu aynı zamanda PKC-a ifadesini de arttırarak proliferasyonu baskılamaktadır(17). Saptanan izoformlar ile total hücre PKC ifade ve aktivitesinin karşılaştırılmasıyla anlaşılmıştır ki, RA etkisi altında gözlenen PKC ifade değişiklikleri PKC'yi uyaran, bilinen diğer etkenlerden farklı olarak enzimin bilinmeyen izoformları üzerinden de anlamlı şekilde oluşmaktadır(18). İn vitro çalışma sonuçları RA ile oluşturulan hücresel işlev

değişikliklerinin PKC'nin sitoplazmik ve membran kompartmanlarında aktivite farklılığı ile sağlanan pozitif intrasellüler hücre sinyallerine bağlı olabileceğini de desteklemektedir (11).

Bu çalışmada, retinoidlerin insan kolon kanser hücrelerinde antiproliferatif etkilerininin PKC enzim aktivasyonu ile ilişkisini incelemek üzere model bir sistem öngörülmüştür. Bu model için insandan elde edilmiş bir adenokanser eşsoyu olan HT-29 (19) seçilmiştir. HT-29 hücreleri epitel benzeri, orta farklılaşma düzeyinde, normal kolonik epitel özelliklerini tamamen kaybetmemiş ve tümörojenik potansiyeli iyi bilinen bir hücre eşsoyudur (20).

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Hücre kültürü:

HT-29 hücreleri (ATCC) ilk pasajlarından başlayarak McCoy 5A (Gibco BRL) besi yeri, ısı ile inaktive edilmiş %10 fetal dana serumu, 2mM L-glutamin, 100unite/ml penisilin streptomisin içeren ortamda çoğaltılmışlardır. Kültürler 37oC'de %5 CO2 ve %95 nemlilik içeren etüvde tutulmuştur. Kültür ortamı düzenli olarak pasajlardan dört gün sonra değiştirilmiş ve her yedi-sekiz günde bir pasaj yapılmıştır. Pasaj veya deney amacıyla, hücreleri adere oldukları plastik kültür şişelerinden ayırmak için magnezyum ve kalsiyumsuz Na fosfat tamponunda hazırlanmış EDTA solüsyonu (%0.025 trypsin-0.02% EDTA v/v final konsantrasyonda) ile tripsinleme işlemi yapılmış ve bu işlem serum içeren besi yeri ile durdurulmuştur.

### Hücrelerin retinoidlerle inkübasyonu ve proliferasyon deneyleri:

13-cis-RA, (Sigma Co.) stok solüsyonları 10-2 molar konsantrasyonda absöü etanol içinde hazırlanmıştır. Kullanımlarına kadar -80oC'de ve ışığa olan duyarlılıkları nedeniyle karanlıkta saklanmışlardır. RA'lerle ilgili tüm çalışmalar zayıf sarı ışık altında yapılmıştır. İki haftayı aşkın saklanmış RA stokları oksidasyon ve degradesyon



nedeniyle aktivite kaybına uğrayabileceğinden kullanılmamış ve yeni stoklar hazırlanmıştır.

Her deney öncesinde protokole uygun olarak, HT-29 hücreleri çoğalmalarının log fazında 20,000 hücre/cm<sup>2</sup> olacak şekilde flasklara ekilmiş ve yukarıda tanımlanan ortam ve besi yerinde çoğaltılmışlardır. Hücre sayımları, %0.2 konsantrasyonda tripan mavisi ile supravital boyama ile hemositometre kullanılarak yapılmıştır. Kültürlerde retinoid inkübasyonuna başlamak için 24 saat hücrelerin kültür şişesinin tabanına yapışmaları beklenmiştir. Retinoidler sonrasında %0.01 (v/v) oranını aşmayacak şekilde etanol içindeki solüsyonları hazırlanmış olarak kültürlerle eklenmişlerdir. Kontrol kültürlerine eşit oranlarda yalnızca etanol eklenmiştir. Hücre kültürleri 1-5 günlük inkübasyon süreleri sonunda sonlandırılmışlardır.

Hücre çoğalmasının saptanmasında kolorimetrik bir yöntem kullanılmıştır. Bu teknik canlı hücrelerin tetrazolyum yapısındaki (dimetiltiazol-difeniltetrazolyumbromid, MTT, Sigma Co.) bir bileşiği mitokondriyal dehidrogenaz enzimi ile mavi formazan ürününe indirilmesi ilkesine dayanmaktadır. Canlı hücre sayısı ve hücre süspansiyonunun optik dansitesi arasında yüksek korelasyon göstermektedir (21).

Hücrelerin retinoid içeren ve içermeyen gruplar şeklinde 6 kuyulu hücre kültürü plaklarındaki inkübasyonundan sonra, her kuyuya 0.1mg (2 mg/ml'den 50ml) MTT eklenmiş ve 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Besiyerinin aspirasyonundan sonra mavi MTT-formazan oluşumu 2ml dimetil sülfoksit içinde çözülmüş ve plaklar 10 dakika yatay çalkalayıcı platform üzerinde karıştırılmışlardır. Optik dansiteleri 540nm'deki absorpsiyonları olarak saptanmıştır (Shimadzu-Bosch&Lomb -200UV).

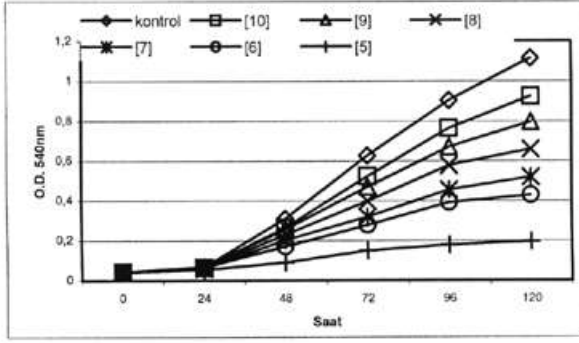
MTT deneylerinin istatistik değerlendirilmesinde parametrik testler kullanılmış ve anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak student t testi ve karşılaştırmalı t testleri sonucuna göre verilmiştir. PKC enzim aktivite değerlerinin koşullar arasında karşılaştırılması için iki

yollu varyans analizi ve en küçük karalar farkı testi uygulanmıştır.

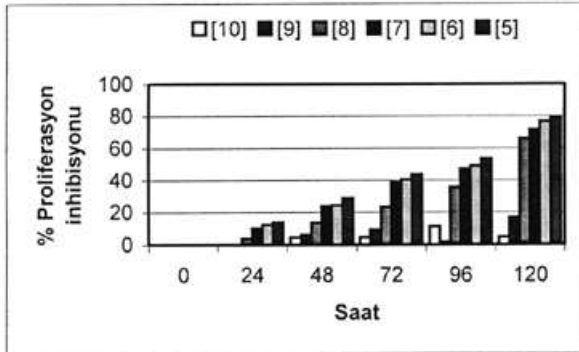
#### PKC enzim aktivitesi çalışması

RA varlığında 24, 48, 72, 96 ve 120 saatlik sürelerle inkübe edilen hücre kültürleri daha önce tanımlandığı gibi sonlandırılmış ve fosfat-tuz tamponu ile iki defa yıkanmıştır. 13-cis-RA, proliferasyon çalışmalarında etkili inhibisyon sağlanan 10<sup>-6</sup>M konsantrasyonda kullanılmıştır. Kontrol kültürlerine RA eklenmemiştir. Sitoplazmik fraksiyon eldesi için 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 50 mM 2-merkaptotanol; 1 mM PMSF; and 10 mg/ml leupeptin içeren 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 tamponu içinde dounce camında homojenize edilmiştir. Homojenatlar 100,000xg'de 4°C ortamda 90 dak. santrifüj edildikten sonra üst kısımlar sitoplazmik fraksiyonlar olarak ayrılmıştır. Kalan pelletlere aynı tampon 5 mM CHAPS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ilavesi ile tekrar eklenmiş ve 4°C'de 2 saatlik beklemeden sonra 100,000xg'de 1 saat santrifüj edilerek üst kısımlar çözülmüş membran fraksiyonları olarak toplanmıştır. Her iki fraksiyona ait örneklerde Bradford yöntemi ile protein düzeyi saptanmıştır. PKC aktivitesi dana timus histon-1 proteinine lipid varlığı ve yokluğunda bağlanan g-32P işaretli ATP düzeylerinin farkları olarak belirlenmiştir.(22). Reaksiyon karışımları, 0.05 mg/ml örnek protein; 20 mM Tris pH 7.5; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM ATP; 100 mM [g-32P]ATP; 0.2 mg/ml histon-1 proteini ile lipid varlığı için 0.025 mg/ml fosfatidilserin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ve 0.005 mg/ml 1,2-diöleoilgliserol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ile hazırlanmıştır. Çok kuyulu plakalarda tripliketler halinde 37°C'de 5 dakika sürdürülen reaksiyonlar 1 mM ATP içeren %10 soğuk triklorasetikasit eklenmesiyle presipite edilerek durudurulmuştur. Nitrosellüloz membranlar üzerine aktarılan presipitatlar 15 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve %5 soğuk triklorasetikasit ile üç kez yıkandıktan sonra sintilasyon sıvısı içine alınmış beta sayacında sayılmışlardır. PKC aktiviteleri 1 mg örnek protein

çözeltilisi ile histon proteinine dakikada transfer edilen pmol fosfatın lipid varlığı ve yokluğu arasındaki farkı olarak ifade edilmiştir.



Şekil 1. HT-29 hücrelerine 6 kuyulu doku kültürü plastiklerinde tanımlı sürelerle, konsantrasyonları  $-\log$  olarak belirtilmiş 13-cis-RA varlığı ve yokluğundaki (120 saat kontrol kültürü) kültürlerini takiben, 0.1 mg (50 ul 2 mg/ml) MTT eklenmiş ve 37°C de 4 saat inkübe edilmiştir. Vasat aspire edilerek mavi renkli formazan bileşik dimetisülfoksid içinde çözülmüş ve 540 nm'de okunmuştur. Veriler tripliketler halinde çalışılan bağımsız üç deneyin ortalamalarıdır.



Şekil 2. Proliferasyon deneylerinde elde edilen değerler doza  $-\log$  molar konsantrasyon olarak) ve zamana bağlı olarak 24. saatten başlayarak kontrol kültürüne göre normalize edilerek % proliferasyon baskılanması olarak çizdirilmiştir.

## BULGULAR

### Proliferasyonun inhibisyonu:

13-cis-RA'in HT-29 hücrelerinin proliferasyonu üzerinde doza ve zamana bağlı tasarlanmış çalışmalarında (Şekil. 1) 72. saatten başlamak üzere 10-6 M ve altı dozlarda anlamlı ( $p < 0.05$ ) inhibisyon etkileri gözlenmiştir. 120. saatte istatistik anlamlı inhibisyonun gözleendiği en düşük doz 10-9 M ( $p < 0.01$ ) olarak saptanmıştır. 120 saatlik RA

uygulanması sonunda 10-10 M konsantrasyonda dahi anlamlı ( $p < 0.05$ ) bir proliferasyon inhibisyonu saptanmıştır. Bu inhibisyonlar elde edildiği en küçük ve en büyük doz aralığında: 72., 96. ve 120. saat değerleri için sırasıyla %4.5-43.61, %11-53, %4.5-79% olarak hesaplanmıştır (Şekil. 2).

### Protein kinaz C aktivitesi

PKC aktivitesine RA etkisini incelemek için HT-29 hücrelerinde 24-120 saatlik inkübasyonlarda tek doz 13-cis-RA kullanılmıştır. Bu doz en yüksek proliferasyon inhibisyonu sağlayan dozdan kültür ortamında 10 kat seyreltik RA konsantrasyonu sağlayacak şekilde 10-6 molar olarak seçilmiştir. Hücrelerde sitoplazmik ve membran fraksiyonlarının toplamı olarak PKC aktivitesinde, 24 saatlik RA etkisi ile %35, 48. saatte %75 ve 72 saatten sonra %100'ün üzerinde artış belirlenmiştir (Tablo I). İki yönlü varyans analizi ile oluşturulan üç hipotez: günler arasında, fraksiyonlar arasında, ve gün ve fraksiyonlarının etkileşimleri açısından oluşabilecek farklılıklar test edildi ve her üç hipotez de reddedildi. Buna göre PKC aktivitesi açısından fraksiyonların kaynağı ve zamana bağlı farklılıklar olduğu anlaşıldı (Tablo II).

Tablo 1. HT-29 Hücrelerinde RA etkisi altında PKC aktivitesi

| Koşul                | Aktivite (pmol/dak/mg protein)* |                               |
|----------------------|---------------------------------|-------------------------------|
|                      | Sitoplazmada $\pm$ sh           | Membranda $\pm$ sh            |
| Kontrol <sup>‡</sup> | 4.01 $\pm$ 0.29                 | 1.98 $\pm$ 0.53               |
| 24 saat <sup>†</sup> | 3.96 $\pm$ 0.9                  | 4.12 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>  |
| 48 saat <sup>†</sup> | 4.71 $\pm$ 0.6                  | 5.81 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>  |
| 72 saat <sup>†</sup> | 4.77 $\pm$ 0.62                 | 7.47 $\pm$ 0.87 <sup>b</sup>  |
| 96 saat <sup>†</sup> | 4.95 $\pm$ 0.61                 | 15.29 $\pm$ 1.08 <sup>b</sup> |
| 120saat <sup>†</sup> | 6.34 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>    | 16.54 $\pm$ 1.44 <sup>c</sup> |

\*Her örnek için sitoplazmik ve membran fraksiyonlarındaki ölçülmüş PKC aktivitesi değerleri. Değerler tripliketler şeklinde yapılmış reaksiyonların sonuçlarından elde edilmiştir. (‡) Kontrol değerleri 120 saatlik RA'siz kültürlerin sonuçlarıdır. Bu sonuçlar arasında zamana bağlı anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır (veriler sunulmamıştır). (†) En küçük kareler farkı testi ile kontrol ve örnek çiftleri

karşılaştırılmıştır. (a,b,c) sırasıyla  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  ile anlamlı artış belirlenmiştir. (sh: standart hata)

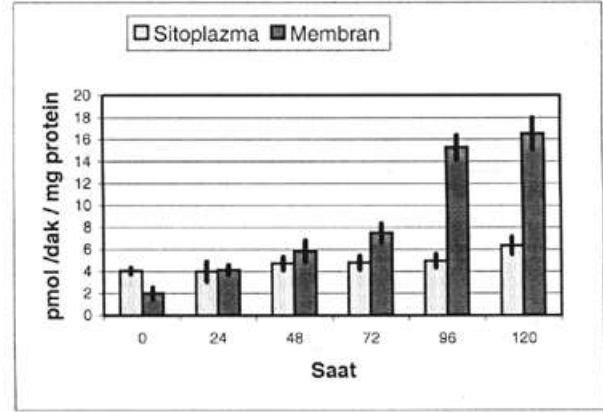
Tablo II. HT-29 Hücrelerinde Ra'in Total Pkc Aktivitesine<sup>1</sup> Etkisi Üzerine İki Yollu Varyans Analizi

| Varyans kaynağı                 | Kareler toplamı | s.d. | Kareler ortalaması | Fs      |
|---------------------------------|-----------------|------|--------------------|---------|
| Fraksiyonlar arası <sup>2</sup> | 993344.4        | 1    | 993344.4           | 63.418* |
| Günler arası <sup>2</sup>       | 2708553         | 5    | 541710.5           | 34.584* |
| Etkileşim                       | 1645237         | 5    | 329047.3           | 21.007* |
| Hata                            | 375921.3        | 24   | 15663.39           |         |
| Toplam                          | 5723055         | 35   |                    |         |

İki yollu varyans analizi ile <sup>1</sup>PKC aktivitesinin sitoplazmik ve membran fraksiyonları için elde edilen her örneğin <sup>2</sup>triplet deney sonuçlarının dökümü. \*İstatistiksel anlamlılık:  $F_{0.01}(1,24) = 7.82$ ;  $F_{0.01}(5,24) = 3.90$ . (sd= serbestlik derecesi;  $F_s = F$  istatistiği)

Fraksiyonlar arasındaki farklılığın istatistiksel anlamlılığını saptamak için en küçük kareler farkı testi kullanılmıştır. Bu test sonucunda sitoplazmik fraksiyonlar arasında 5. gün dışında PKC aktivitesinde zamana bağlı anlamlı bir farklılık saptanmazken, membran fraksiyonlarında her beş günün, kontrollara göre ve zamana bağlı artış şeklinde birbirlerine göre, istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar içerdiği belirlenmiştir.

HT-29 hücrelerinde PKC aktivitesinin RA varlığı ve yokluğunda hücre içi dağılımı şekil.3 de gösterilmektedir. Bu aktivitenin membran ile ilişkili kısmı RA inkübasyonunun 24. saatinden başlamaya üzere artmaktadır. Bu gözlem PKC'nin sitoplazmada kovalent modifikasyona uğramayıp membrana transloke olduğuna işaret etmektedir. Bu yer değişimi 4. günde maksimum düzeye erişmekte ve PKC aktivitesinin %51'i membrana taşınmaktadır (Tablo III). Total PKC artışı RA etkisinin yeni protein sentezini de indüklediğinin bir göstergesidir. Proliferasyon çalışmaları ile birlikte yorumlandığında, zamana bağlı hücre baskılanmasının PKC enzim aktivitesindeki artışı paralel olarak izlediği saptanmaktadır.



Şekil 3. 13-cis-RA etkisinde HT-29 hücreleri sitoplazmik ve membran fraksiyonlarında PKC aktivitesi (Tablo I'deki verilere göre çizdirilmiştir).

Tablo III. Pkc Aktivitesinin 13-Cis Ra Etkisi Altında Hücre İçi Dağılımı

|                | İnkübasyon koşulları (saat) |    |      |    |      |      |
|----------------|-----------------------------|----|------|----|------|------|
|                | Kontrol*                    | 24 | 48   | 72 | 96   | 120  |
| % Sitoplazmik  | 66.9                        | 49 | 44.8 | 39 | 24.5 | 27.7 |
| % Membran      | 33.1                        | 51 | 55.2 | 61 | 75.5 | 72.3 |
| % Yer değişimi | 0*                          | 2  | 10.4 | 22 | 51   | 44.6 |

\*Kontrol koşulu, RA etkisi olmayan hücrelerde enzim aktivitesi ile ilgili başlangıç aşamasını gösterdiğinden enzimin fraksiyonlara göre dağılımında yer değişimi 0 olarak kabul edilmiştir.

## TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında, antitümör mekanizması tamamen anlaşılammış RA'lerin aktif bir metaboliti olan 13-cis-RA ile in vitro kolon kanserleri üzerinde proliferasyonu baskılayıcı etkisinin PKC enzim aktivitesi ile olan ilişkisi gösterilmiştir. Çalışmanın sonuçları 13-cis-RA'nın HT-29 kolon adenokanser hücrelerinde PKC enzim aktivitesini arttırdığını göstermektedir. Sitoplazmik fraksiyonda enzim aktivitesinde değişiklik olmamasına karşın, PKC aktivitesinin membran ile ilişkili olan kısmında kontroller ile karşılaştırıldığında RA ile muamele edilen hücrelerde belirgin bir artış saptanmıştır. Bu bulgular, hücrelerdeki enzim düzeyinin önemli bir oranının aktif forma geçmiş olabileceğini yani, PKC'nin kalsiyum ve fosfolipidler ile kompleks oluşturarak sitoplazmadan membrana doğru yer

değiştirdiğini düşündürmektedir. Bununla birlikte RA etkisi altında total PKC aktivitesindeki artış bu enzimin sentezinde de artış olmasını akla getirmektedir. Bazı araştırma sonuçlarında PKC aracılı iletimin çelişkili bulgular gösterdiği dikkat çekmektedir. Örneğin, PKC $\beta$ 1'in sıçan fibroblast hücre eşsoylarında aşırı ifadesi proliferasyonu arttırmakta ve yumuşak agarda kolay çoğalmalarını sağlamaktadır (23). Diğer bir çalışma PKC $\gamma$ 'in NIH 3T3 fibroblast hücrelerinde tümörojenisiteyi arttırdığı gözlenmiştir. Buna karşın, kolon kanser hücrelerinde PKC $\beta$ 1 aşırı ifadesi proliferasyon ve tümör oluşturma potansiyelini azaltmaktadır (13). HT-29 hücrelerinde PKC'nin davranışı bu çalışma ile uyumluluk göstermekte ve RA'in çoğalmayı baskılayıcı etkisi ile birliktelik göstermektedir.

RA'lerin hücrelerde diferansiyasyonu artırıcı ve proliferasyonu azaltıcı etkisi kanser tedavisinde dokuya odaklı sitostatik etki ile yalnız ya da kombine şekilde alternatif terapi olanaklarını sunabilir. RA'lerin etki mekanizmalarının aydınlatılması ise bu sürece olumlu katkıda bulunabilir. RA etkili hücre proliferasyonu baskılanmasında PKC enziminin sinyal iletimi ile olası ilişkisi bu mekanizmaların ileri basamaklarını aydınlatmada rol oynayabilir. Benzeri çalışmalarda PKC'nin hangi izoformlarının bu iletimden sorumlu olduğunun ortaya konması ve bu izoformların transkripsiyonel aktivitelerinin saptanmasının da yararlı olacağı düşünülmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Sherman M.I. (1986) Retinoids and Cell Differentiation. Boca Raton: CRC Press.
2. Sporn M.B, Roberts A. B, Goodman D.S, Dennert G. (1984) Retinoids and the immune system: immunostimulation by retinoids, s. 373-390, Academic Press New York.
3. Amos B, and Lotan R. (1990) Retinoid sensitive cells and cell lines. Methods. Enzymol 190, 217-225.
4. Halter SA, Fraker L.D, Adcock D, Vick S. (1988) Effects of retinoids on xenotransplanted human mammary carcinoma cells in athymic mice. Cancer Res. 48, 3733-3736.
5. Lippman S.M, Garewal H.S, Myskens F.L. Jr. (1989) Retinoids as potential chemopreventive agents in squamos cell carcinoma of the head and neck. Prev. Med. 18, 740-748.
6. Castaigne S, Chomienne C, Daniel M.T, Ballerini P, Berger N, Fenaux D.L. (1990) All-trans retinoic acid as a differential therapy for acute promyelocytic leukemia. Clinical results. Blood 76, 1704-1709.
7. Valcarcel R, Holz H, Jimenez C.G, Berettino D, Stunnenberg H.G. (1994) Retinoid-dependent in vitro transcription mediated by the RXR/RAR heterodimer. Genes and Development. 8. 3068-3079.
8. Pemrick S.M, Lucas D.A, Grippo J.F. (1994) The retinoid receptor. Leukemia. 8, 11, 1797-806.
9. Schwartz M.K. (1990) Enzymes used in predicting high risk to colon cancer. Clin. Biochem. 23, 395-398.
10. Cho K.R, Vogelstein B. (1992) Genetic alterations in the adenoma sequence. Cancer Supplement 70, 1727-1731.
11. Pinedo, H.M, Longo D.L, Chabner G (1992) Differentiating agents in cancer therapy. Elsevier Science Publishers.
12. Nishizuka Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. Nature 334, 661-665.
13. Persons D.A, Wilkison W.O, Bell R.M, Finn O.J. (1988) Altered growth regulation and enhanced tumorigenicity of NIH 3T3 fibroblasts transfected with protein kinase C-I cDNA. Cell. 52, 447-458.
14. Ohno S, Akita Y, Hata A, Osada S, Kubo K, ve ark. (1991) Structural and functional diversities of a family of signal transducing protein kinases, protein kinase C family; two distinct classes of PKC, conventional cPKC and novel nPKC. Adv. Enzyme Regul. 43, 287-303.
15. Tonini G.P, Parodi M.T, Di Martino D, Varesio L. (1991) Expression of protein kinase C-alpha (PKC-alpha) and MYCN mRNAs in human neuroblastoma cells and modulation during morphological differentiation induced by retinoic acid. FEBS. Lett. 280, 221-224.
16. Rosenbaum S.E, Niles R.M. (1992) Regulation of protein kinase C gene expression by retinoic acid in B16 mouse melanoma cells. Arch. Biochem. Biophys. 294, 123-129.



17. Cho Y, Talmage D.A. (2001) Protein kinase Calpha expression confers retinoic acid sensitivity on MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 10;269 (1):97-108.
18. Carter C.A. (2000) Protein kinase C as a drug target: implications for drug or diet prevention and treatment of cancer. *Curr Drug Targets.* 1(2):163-83.
19. Fogh J, Trempe G. (1975) New human tumor cell lines. Plenum Press, New York.
20. Trainer D.L, Kline, T, McCabe F.L. (1988) Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer* 41, 287-296.
21. Carmicheal J, DeGraff W.G, Gazdar A.F, Minna J.D, Mitchell J.B. (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer. Res.* 47, 936-942.
22. Hass R, Pfannkuche H.J, Kharbanda S, Gunji H, Meyer G, ve ark. (1991) Protein kinase C activation and protooncogene expression in differentiation/retrodifferentiation of human U-937 leukemia cells. *Cell. Growth Differ.* 2, 541-548.
23. Housey G.M, Johnson M.D, Hsiao W.L, O'Brian C.A, Murphy J.P, Kirschmeier P, Weinstein I. B. (1988) Overproduction of protein kinase C causes disordered growth control in rat fibroblasts. *Cell* 52, 343-354.