

L929 Fibroblast Hücre Hattında Topoizomeraz İnhibisyonunun DNA Onarımı ve Apoptozis Üzerine Etkisi

[The Effects of Topoisomerase Inhibition on DNA Repair and Apoptosis in L929 Fibroblasts]

İrem Doğan,
Atiye Seda Yar,
Volkan Ergin,
Sevda Menevşe,
Adnan Menevşe,
Abdullah Ekmekçi

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Ankara

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

İrem Doğan

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
06500 Ankara Türkiye
Tel. 90 312 2024714
E-posta. doganirem@gmail.com

Kayıt Tarihi: 30 Kasım 2012; Kabul Tarihi: 12 Mart 2013
[Registered: 30 November 2012; Accepted: 12 March 2013]

ÖZET

Amaç: Canlı sistemler genomun işlevsel ve yapısal bütünlüğünün korunması ve tümör oluşumunun engellenmesi için çeşitli DNA onarım mekanizmaları geliştirmişlerdir. Topoizomeraz II enzimi de DNA replikasyonu ve transkripsiyonu sırasında görev yapan nükleer bir proteindir. Topoizomeraz II inhibitörü olan etoposid, DNA hasarı oluşturarak apoptozun uyarılmasını sağlayan antineoplastik bir kimyasaldır. Etoposid, topoizomeraz II'ye bağlanarak DNA'nın yeniden birleşmesini engeller ve çift zincir DNA kırıkları oluşturarak hücre döngüsünü durdurur. Topoizomeraz II inhibitörleri uzaklaştırıldıktan sonra oluşan çift zincir DNA kırıkları hızlı bir şekilde onarılabilir. Bu çalışmada L929 hücrelerinde etoposid uygulamasının ardından gelişen apoptotik olayları ve apoptozu engelleyebilecek DNA onarım mekanizmalarını araştırdık.

Yöntemler: Çeşitli etoposid konsantrasyonlarındaki hücre canlılığı zamana bağlı olarak MTT testi ile belirlendi. Çift zincir kırıklarının varlığı komet deneyi ile gösterildi. Akridin turuncusu/etidyum bromür floresan boyalar ve kaspaz 3/7 aktivite deneyleri ile apoptoz değerlendirildi. DNA onarımı ile bağlantısı bilinen Ku70, Ku80, BRCA2, RAD51, XRCC4 genlerinin mRNA ifade düzeyleri çeşitli etoposid konsantrasyonlarında zamana bağlı olarak belirlendi.

Bulgular: Etoposidin çift zincir DNA kırıkları yaparak sitotoksik ve apoptozisi uyaran bir ajan olduğu hücre canlılığı, komet ve floresan boyama deneylerinde gösterildi. Ku80 mRNA düzeyleri etoposid uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre azalırken, RAD51, XRCC4 ve BRCA2 mRNA düzeylerinde gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi. Ku70 ifadesi ise 9 ve 12. saatlerde kontrol grubuna göre artış gösterdi.

Sonuç: Sonuçlarımıza göre, etoposid apoptozisi uyarmakta, ayrıca DNA onarım enzimlerinin mRNA ifade düzeylerinin kontrol grubuna göre genellikle daha az olması hücrede DNA hasarının onarımını engellemektedir.

Anahtar Kelimeler: Etoposid, topoizomeraz II, DNA onarımı, apoptozis

Çıkar Çatışması: Bu çalışmada yazarlar, konuyla ve/veya herhangi başka bir yazar ile ilgili maddi veya manevi bir çıkar ilişkisi içinde bulunmamaktadır.

ABSTRACT

Objective: DNA repair pathways in cells are essential for the maintenance of genome integrity, and for countering the induction of tumorigenesis. Topoisomerase II is a nuclear enzyme that functions during both DNA replication and transcription. The topoisomerase II inhibitor etoposide is an antineoplastic drug that has been used to generate DNA damage and maintain apoptosis. Etoposide blocks cell division by interfering with the topoisomerase II and generates double strand breaks. Application of topoisomerase II inhibitors leads to the formation of double strand breaks that are rapidly repaired following removal of the drug. In the present study, we searched the apoptotic events and early double strand DNA repair process that prevent the apoptotic cell death of L929 fibroblasts in response to treatment with etoposide.

Methods: Cytotoxicity of etoposide on L929 cells was determined in a time and dose dependent manner with MTT assay. The double strand DNA breaks were determined with comet assay. Acridin orange/Ethidium bromide fluorescence staining and Caspase 3/7 activity assays were performed in determined etoposide concentrations at 24 hour. Quantitative mRNA expressions of DNA repair genes (Ku70, Ku80, BRCA2, Rad51, XRCC4) were determined after etoposide treatment.

Results: The levels of apoptotic cell markers and DNA double strand breaks were elevated in the increasing doses and time. The relative expression levels of Rad51, XRCC4 and BRCA2 were unstable in a time and dose dependent manner. Ku80 levels were generally decreased in etoposide treated groups when compared with controls. However, Ku70 was highly expressed at 9 and 12 hour with the increasing doses.

Conclusion: According to the results of this study, etoposide activates apoptotic events. Also, low expression levels of DNA repair enzymes prevent cell survival from DNA damage.

Key Words: Etoposide, topoisomerase II, DNA repair, apoptosis

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest.

Giriş

Hücreler, DNA hasar tipine bağlı olarak farklı mekanizmaları işleterek oluşan hataları düzeltmeye çalışırlar. İyonize radyasyon, oksidatif stres ve kimyasal ajanlar gibi etkenlerle oluşan DNA çift zincir kırıklarının onarımı serbest uçların non-homolog şekilde bağlanması (NHEJ) ya da homolog rekombinasyon ile olur [1]. DNA çift zincir kırıklarının belirlenmesi ve onarılması hücre sağkalımı için gereklidir. Düzeltilemeyen çift zincir kırıkları DNA'da duplikasyon, translokasyon, delesyon gibi değişimlere neden olabilmektedir. Tüm bu DNA-yeniden düzenlenmeleri genomik kararsızlığa ve tümör oluşumuna yol açabilir.

DNA'da hasarlı bölge tanıdıktan sonra en önemli aşama, bu lezyonun onarımı için hangi yolağın kullanılacağıdır. Non-homolog rekombinasyon gibi bazı onarım mekanizmaları hataya yatkındır ve kırılan bölgelerde genetik bilginin kaybıyla sonuçlanabilir. Çift zincir kırıklarının tamirinde en temel mekanizmalardan biri ise homolog rekombinasyondur [1].

Çift zincir DNA kırıklarının NHEJ yolağı ile onarımı DNA bağımlı protein kinaz (DNA-PK) ve DNA ligaz IV-XRCC4 protein kompleksleri aracılığı ile olur. DNA-PK; Ku70/80 heterodimeri ve DNA-PK'nin katalitik alt ünitesinden (DNA-PKc) oluşur [2].

Çift zincir DNA kırığı oluştuğunda, kırık bölgeye ilk gelen proteinler MRX/MRN kompleksidir (Mre11-Rad50-Nbsl). Eğer hücreler G1 fazında ise non-homolog ve uç birleştirici mekanizmalar tercih edilir [3]. Ku70/80 (XRCC6/XRCC5) protein heterodimeri DNA'ya bağlanır ve kırılan uçları stabilize eder. Uçlar MRX proteinleri ve DNA ligaz-XRCC4 ile birleştirilir. Eğer hücreler S ya da G2 fazında ise onarım RAD, BRCA1 ve BRCA2'nin görev aldığı homolog rekombinasyon ile olur [1]. Hücre döngüsü sinyallerinin farklı onarım mekanizmalarına nasıl etkilediği halen tam olarak bilinmemektedir.

DNA topoizomerazlar DNA'da geçici kırıklar oluşturan ve hücre sağkalımı için gerekli olan ve evrimsel açıdan son derece iyi korunmuş çekirdek enzimleridir [1]. Topoizomeraz I tek zincir kırığı oluştururken, topoizomeraz II ATP kullanarak, çift zincir kırıkları oluşturur ve sarmal DNA'nın çözülmesini sağlar [2]. Fonksiyonel olarak tüm topoizomeraz enzimlerinin DNA'ya bağlanma, çift zincir DNA yıkımı ve birleştirilmesi gibi işlevleri vardır. İn vitro moleküler etkileşim çalışmaları etoposid, amsakrin, genistein ve florokinol gibi anti-neoplastik inhibitörlerin ökaryotik topoizomeraz II'ye bağlandığını göstermiştir [3]. Günümüzde kullanılan topoizomeraz I inhibitörleri irinotecan (CPT-11) ve topotecan, FDA onaylı topoizomeraz II inhibitörleri ise etoposid, teniposid, doksorubisin, idarubisin, epirubisin ve mitoksantronedur [4].

Etoposid akciğer kanseri, lösemiler, non-Hodgkin's lenfoma, Kaposi sarkomu, yumuşak doku sarkomu ve nöroblastoma gibi birçok farklı hastalıkta kemoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır [5].

DNA çift zincir kırıklarının onarımı sırasında hatalar

oluşabilmekte, bu hatalar da hücrenin onkolojik transformasyonuna neden olabilmektedir. Hata onarımında işlevsel olan bazı genlerin bu süreçte önemli rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca DNA onarımının bazı durumlarda, hasar sonucu oluşan apoptozise engel olduğu ve bu durumun hücrede ilaca karşı gelişen direnç mekanizmalarından biri olduğu belirlenmiştir [2-4]. Çalışmamızda, sitotoksosite ve DNA hasar çalışmalarında sıklıkla kullanılan ve tümörjenik özelliği olan fare fibrosarkoma L929 hücre hattında etoposid kullanımının hücre canlılığı ve apoptozise etkisi araştırılmıştır. Ayrıca etoposid induklü çift zincir DNA kırık onarımının ardından gelişen DNA onarım mekanizmasının apoptozise etkisi araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hücre Kültürü

L929 hücreleri, %10 fetal dana serumu içeren DMEM besiyerinde %95 nem ve %5 CO₂'li ortamda 37°C'de inkübe edilerek çoğaltıldı. 75 cm²'lik flasklarda çoğaltılan hücreler, hücre kültür kaplarını kapladıkları zaman %0.05 tripsin/EDTA çözeltisi ile flask yüzeyinden kaldırıldı. Pasajlama sırasında yeni pasajda 1:2 hücre olacak şekilde hücre aktarımı yapıldı. Kültür besiyeri pasajdan sonra her iki günde bir değiştirildi. Hücreler, 0-1000 µM arasında çeşitli konsantrasyonlarda etoposid ile 3, 6, 9, 12 ve 24 saat inkübe edildi. DMSO çözücü kontrolü olarak kullanıldı ve aynı süreler için inkübe edildi.

MTT Sitotoksosite Deneyi

L929 hücrelerinde etoposidin sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi için MTT kolorimetrik kiti kullanıldı. Aynı pasaj numarasına sahip L929 hücreleri, hücre kültür kaplarının ortalama %70'ini kapladığı zaman besiyerleri uzaklaştırıldı. Tripsin-EDTA karışımı kullanılarak hücrelerin tabandan ve birbirlerinden ayrılması sağlandı. Daha sonra hücreler sayılarak her kuyucuğa 10⁴ hücre/200 µL gelecek şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. Hücreler 37°C ve %5 CO₂'li etüvde bir gece inkübe edildikten sonra besiyerleri uzaklaştırıldı. Daha sonra hücreler yukarıda belirtilen dozlarda etoposid içeren besiyerinde, 3, 6, 9, 12 ve 24 saat inkübe edildi. Belirtilen sürelerin sonunda her bir kuyucuğa 10 µL gelecek şekilde MTT karışımı eklendi ve oluşan formazan kristallerinin DMSO ile çözülmesi ile ortaya çıkan renk değişimi 4 saat sonunda mikropilaka ELISA okuyucu ile 572 nm dalga boyunda belirlendi.

Floresan Mikroskopunda Apoptozun Değerlendirilmesi

L929 hücreleri 24'lü kültür kaplarına her bir kuyuda 2x10⁵ hücre olacak şekilde ekildi ve bir gece bekledikten sonra, 24 saat boyunca 1, 10 ve 50 µM etoposid ile inkübe edildi. Hücre kültürlerinin sonlandırılmasını takiben hücreler 3 µL akrinin turuncusu (0.1mg/ml) ve 3 µL etidyum bromür (0.1mg/ml) ile boyanarak floresans mikroskopunda apoptozis açısından değerlendirildi.

Akridin turuncusu sadece canlı hücrelerin DNA'sına bağlandığından canlı hücreler yeşil renkte görülürken, etidyum bromür nekrotik hücrelerde kırmızı rengin oluşmasına neden oldu. Buna karşın iki boya birlikte kullanıldığında, apoptotik hücreleri boyayarak sarı-turuncu renkte ve karakteristik apoptotik çekirdek görünümünü yansıtarak apoptozun belirlenmesine olanak sağladı. Hücreler Leica DM6000 mikroskobunun Leica DFC420C kamerası ile, Leica Application Suite v.2.8.1 programı kullanılarak görüntülendi.

Kaspaz 3/7 Aktivitesinin Belirlenmesi

L929 hücreleri 6'lı kültür kaplarına herbir kuyuda 1×10^6 hücre olacak şekilde ekildi ve bir gece bekledikten sonra, 24 saat boyunca 1,10 ve 50 μM etoposid konsantrasyonları ile inkübe edildi. İnkübasyon süresi bittiğinde kuyucuklar, PBS ile yıkandı ve hücreler kazınarak epondorf tüplerde toplandı. Hücre lizis tamponu ile protein izolasyonu yapıldı ve üreticinin önerdiği protokole göre kaspaz 3/7 aktivitesi florometrik olarak APC konjugatının açığa çıkmasıyla 376/499 nm dalga boyunda ölçüldü (Anaspec, Fremont, CA, ABD).

Comet Deneyi

Comet deneyi ile DNA çift zincir kırıkları belirlenebilmektedir. Hücreler agaroz kaplı mikroskop camlarının üzerine aktarılıp, deterjan ve yüksek tuz içeren çözelti ile patlatılmakta ve yüksek pH'da elektrik alana maruz bırakılmaktadır. Deney sonunda hücrelerin mikroskopta elde edilen görüntüleri kuyruklu yıldız benzemektedir ve bu kuyruğun uzunluğu DNA fragmentasyonunun yoğunluğunu göstermektedir [2]. Çeşitli etoposid (1, 5, 10, 50, 100 μM) konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edilen hücreler Comet Assay (Trevigen, Gaithersburg, MD, ABD) protokolüne göre analiz edildi. Değerlendirmeler Leica DFC420C floresan mikroskobunda, Leica Application Suite v.2.8.1 programı ile yapıldı.

Hücre Kültüründen Total RNA Saflaştırılması ve cDNA Sentezi

L929 hücreleri 25cm²'lik flasklarda herbir kuyuda 1.5×10^6 hücre olacak şekilde ekildi ve bir gece bekledikten sonra, 3, 6, 9, 12 ve 24 saat boyunca 1, 5, 10 ve 50 ve 100 μM etoposid konsantrasyonları

ile inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda steril flasklarda ekili bulunan hücrelerden RNA izolasyonu kit (Roche Applied Science, Almanya) yardımıyla önerilen protokole uygun olarak yapıldı. Elde edilen RNA'lar spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda ölçülerek mikrolitredeki nanogram değerleri belirlendi. Primer olarak random hekzamerler kullanılarak cDNA sentez kiti (Roche Applied Science, Almanya) ile total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. Kontaminasyonu engellemek amacı ile saflaştırma işlemi biyogüvenlik kabininin içinde gerçekleştirildi.

Gen İfadelerinin Real-Time PCR ile Ölçümü

Ku70, Ku80, BRCA2, Rad51, XRCC4 genlerinin mRNA ifadenme düzeylerini ölçmek için, 2 μl cDNA, 0,5 μl ileri ve geri primerler (Tablo 1) 0,2 μl prob (Tablo 1) (Universal Probe Library, Roche Applied Science, Almanya), 2,5 μl TaqMan master karışım (Roche Applied Science, Almanya), 4mM MgCl₂ ve toplam hacim 10 μl olacak şekilde saf su karıştırılarak Real-time PCR reaktantları hazırlandı. Real-time PCR cihazında (LC480, Roche Applied Science, Almanya) 95 °C 10 dakika başlangıç inkübasyonu, 55 tekrarlı 95°C 10 saniye, 60°C 20 saniye, 60°C 1 saniyelik primer yapışma döngüsü sonucu elde edilen Ct değerleri kaydedildi. Ku70, Ku80, BRCA2, Rad51, XRCC4 mRNA ifadenmesini normalize etmek için β -Actin mRNA düzeyi referans olarak alındı.

İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Deneyler üçlü tekrarlar halinde yapıldı. Doza ve zamana bağlı olarak değişen Ku70, Ku80, BRCA2, Rad51 ve XRCC4 mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar Relative Expression Software Tool (REST, 2008 Beta V2.0.7) istatistik programı ile karşılaştırıldı. Diğer analizler ise tek yönlü ANOVA testiyle yapıldı. Veriler SPSS 15.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

Bulgular

Etopositin L929 hücre canlılığı üzerine etkileri

Etopositin L929 hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için MTT deneyi yapıldı. Hücreler etopositin artan konsantrasyonları ile zamana bağlı olarak

Tablo 1. mRNA düzeylerinin belirlenmesi için Real Time PCR yönteminde kullanılan prob numaraları ve primer dizileri

Gen ismi	TaqMan Prob No	Sol Primer	Sağ Primer
BRCA2	63	GACTTTGTTTAATTCGAGAAGTAGGAA	TCTTTTGATTGGGGGTTGTC
Ku70	63	AACTGAGGGCGAGGAAGAG	TCAACCAGAAAAATCAAGCTATCTC
Ku80	64	AGAAAGAAGAAGATCACATCAGCA	CAGGATTCACACTCCAACCT
Rad51	22	GGCTGTACATGCCAGCTC	AATGTACATGGCCTTCCCTTC
XRCC4	64	CCGGCTTTGTTATTACACTTACTG	TCTTGGGAAATCTCCAATTCTAG
B-Actin	64	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	ACCAGAGGCATACAGGGACA

inkübe edildi. Kontrol grubu ile etoposid uygulanan gruplar hücre canlılığı açısından kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark gözlemlendi ($p < 0.05$). Her ne kadar düşük etoposid konsantrasyonları L929 hücrelerinde canlılık üzerinde etkili olsa da belirli bir doza kadar hücreler ilaca direnç göstermişlerdir. Şekil 1'de gösterildiği gibi etoposid 24 saatlik zaman diliminde 1 mM'da IC50'ye ulaşırken, diğer zaman dilimlerinde daha yüksek konsantrasyonlarda sitotoksikite göstermiştir (Şekil 1).

Etoposid uygulaması apoptotik hücre sayısını arttırmıştır

Apoptozun görüntülenmesi için etidyum bromür ve akridin turuncusu kullanılarak floresan mikroskopunda hücre sayımı yapılmıştır (Şekil 2a). Etoposid uygulamasından 24 saat sonra ilacın artan dozları apoptotik hücre sayısında da anlamlı düzeyde artışa neden olmuştur (Şekil 2b). En yüksek apoptoz oranına 10 mM etoposid konsantrasyonunda erişilmiştir. Nekrotik hücre sayıları, beklenildiği gibi apoptotik hücre sayısından daha az belirlenmiştir. En yüksek nekrotik hücre sayısına, apoptotik hücre sayısına paralel şekilde 10 mM etoposid konsantrasyonunda gözlenmiştir.

Etoposid, kaspaz 3/7 aktivitesini etkilememiştir

Apoptotik hücre ölümü, kaspaz proteazların aktifleşmesi sayesinde gerçekleşir. Çalışmamızda artan apoptotik hücre sayısına bağlı olarak, etoposid uygulanan gruplarda kaspaz aktivitesini de araştırdık. Ancak uygulanan doz ve zamanda kaspaz aktivitesinde belirgin bir artış gözlenmemiştir (Şekil 3). Bu sonuç hücre canlılığı ve apoptozun görüntülenmesi deneylerinde gözlenen sonuçtan farklılık göstermektedir.

Etoposid uygulamasının ardından oluşan DNA hasarı

Genotoksik etkinin değerlendirilmesinde yardımcı bir yöntem olan komet deneyi ile etoposidin L929 hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Etoposid L929 hücrelerinde çift zincir DNA kırıkları oluşturmuştur ve bu durum floresan mikroskopunda hücrenin arkasında uzayan kuyruk şeklindeki yeşil görüntü ile belirlenmektedir (Şekil 4). L929 hücrelerinde 24 saat çeşitli etoposid konsantrasyonları ile yaptığımız deneyde, 50 ve 100 μ M etoposid inkübasyonu, 1, 5 ve 10 μ M'a göre daha fazla kuyruklu yıldız görünümüne neden olmuştur.

Etopositin DNA onarım gen ifadeleri üzerindeki etkisi

Etoposid uygulanan ve uygulanmayan L929 hücre gruplarında 3, 6, 9, 12 ve 24 saatlik Ku70, Ku80, Rad51, BRCA2 ve XRCC4 mRNA ifadenme düzeyleri Real-time PCR yöntemi ile araştırıldı. Rad51, BRCA2 ve XRCC4 genlerinin göreceli ifadenme düzeyleri zamana ve doza bağlı olarak anlamlı bir artış ya da azalış göstermedi (Şekil 5). İstatistiksel olarak bir anlam bulunmamasına rağmen, Ku80 mRNA ifade düzeyinin etoposid uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre ge-

nellikle daha az olduğu görülmüştür. Bunun yanında Ku70 mRNA düzeyi, 9 ve 12. saatlerde etoposid uygulanan gruplarda, uygulanmayan gruba göre anlamlı derecede artmıştır. BRCA2 ifade düzeyi ise etoposid uygulanan gruplarda 3, 6 ve 12. saatte azalmış, 9. saatte anlamlı şekilde artmış, 24. saatte 1 ve 5 mM etoposid konsantrasyonlarında artmış, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda ani bir düşüş göstermiştir. XRCC4 mRNA ifadenmesi gruplar arasında anlamlı şekilde değişmemiştir. RAD51 mRNA düzeyi 3, 6 ve 9. saatlerde azalmış, daha sonra artmaya başlamıştır; fakat bu artış ya da azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

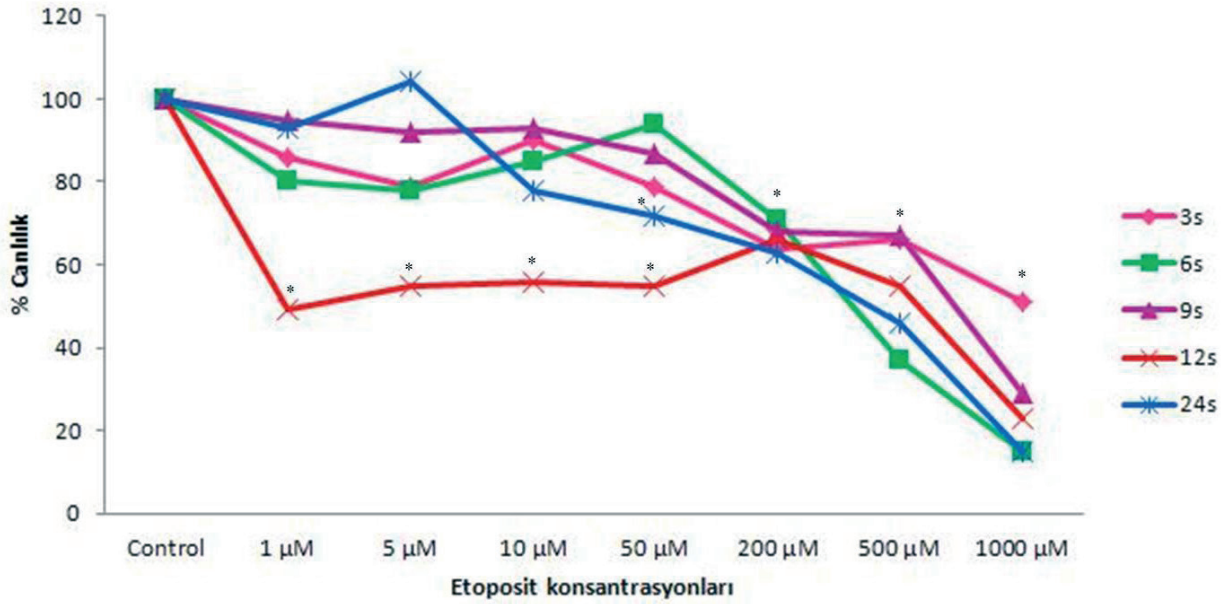
Tartışma

Topoizomerazlar DNA replikasyonu, transkripsiyon, rekombinasyon, kromozom yoğunlaşması ve ayrılması gibi süreçlerde ortaya çıkan topolojik sorunların giderilmesinde görev alırlar. Günümüzde pek çok FDA onaylı kemoterapötik ajan, topoizomerazlar ile etkileşime girebilmektedir. Topoizomeraz II'nin alfa ve beta olmak üzere iki alt ünitesi vardır. Alfa izoformunun konsantrasyonu hızlı çoğalan hücrelerde ve G2/M geçişinde artar. Alfa izoformunu hedefleyen bir ajan olan etoposid topoizomeraz II'nin kırık DNA'yı tekrar birleştirmesini engeller ve apoptozu uyarır [14].

Çalışmamızda L929 hücrelerine çeşitli konsantrasyonlarda etoposid uygulanarak, DNA hasarı oluşturulmuş ve hücreler apoptozise yönlendirilmeye çalışılmıştır. DNA onarım sürecinde çeşitli gen ifadeleri, onarım sürecini etkilemekte ve bazı genlerin fazla ya da az ifadesi hücre canlılığı, apoptozis ve onkogenез üzerinde etkili olmaktadır [10-12]. Bu nedenle L929 hücrelerinde etoposid uygulamasının ardından apoptozise karşı gelişen bir direnç mekanizması olabilecek DNA onarımında etkili bazı gen ifadeleri RNA düzeyinde araştırılmıştır. Sonuçlarımıza göre etoposid hücre canlılığını azaltmakta ve çift zincir DNA kırığı yaparak apoptozise neden olmaktadır. L929 hücrelerinde DNA hasarı sonrası aktifleşen onarım mekanizması apoptozisi engelleyememiştir.

Topoizomeraz uyarımlı DNA hasarı ile gelişen apoptozun mekanizması tam olarak bilinmese de, kaspaz 2'nin mitokondriyal apoptotik yolak ve topoizomeraz uyarımlı DNA hasarında önemli bir molekül olduğu düşünülmektedir [15]. Kaspaz 2 enzimi, kaspaz 8'i aktiveleştirerek mitokondriyal apoptotik yolağı uyarır. Ardından kaspaz 9 ve kaspaz 3 aktivasyonu gerçekleşir [16]. Kaspaz 3, apoptoz aracılı DNA fragmentasyonu ve nükleer yıkımda kritik bir moleküldür. Kaspaz 3 enzimi olmayan hücreler etoposite dirençlidir [17].

p53, c-myc gibi hücre döngüsü düzenleyicisi proteinler etoposid uyarımlı apoptoz için de önemlidir [18]. Etoposid, G2-M geçişini inhibe eden iki yolağı aktiveleştirir. Bunlardan birisi p53 bağımlı, diğeri p53 bağımsızdır. G2-M geçişinde ve DNA onarım mekanizmasında görevli olan bcr-abl, etopositin sitotoksitesini düşürür. ATM (ataxia-telangiectasia mutated) olmayan fibrob-



Şekil 1. Çeşitli etoposid konsantrasyonlarının L929 fibroblast hücre canlılığı üzerine zamana bağlı etkisi. L929 hücrelerinde etopositin hücre canlılığına etki etmeye başladığı konsantrasyon 50 µM, en etkili zaman aralığının ise 12 saat olduğu belirlenmiştir.

* L929 hücrelerinde çeşitli saat ve konsantrasyonlarda etoposid uygulamasının ardından hücre canlılığı kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (p<0.05).

lastlarda olduğu gibi G2/M kontrol noktası olmayan hücrelerde etoposid uygulamasının ardından kromozomal anomaliler artmıştır [19].

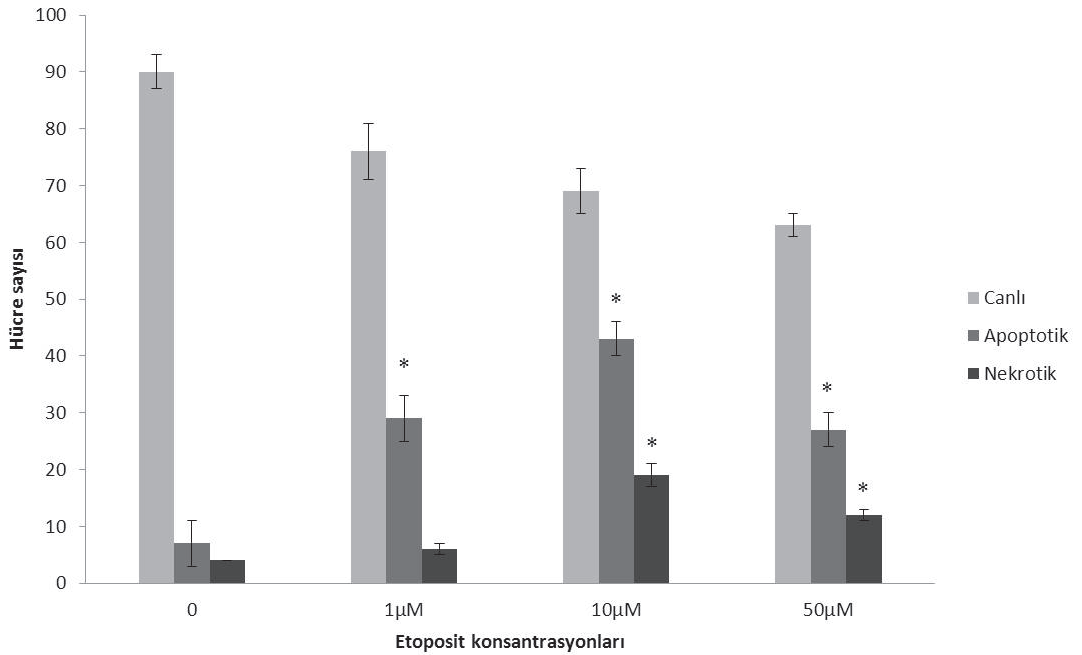
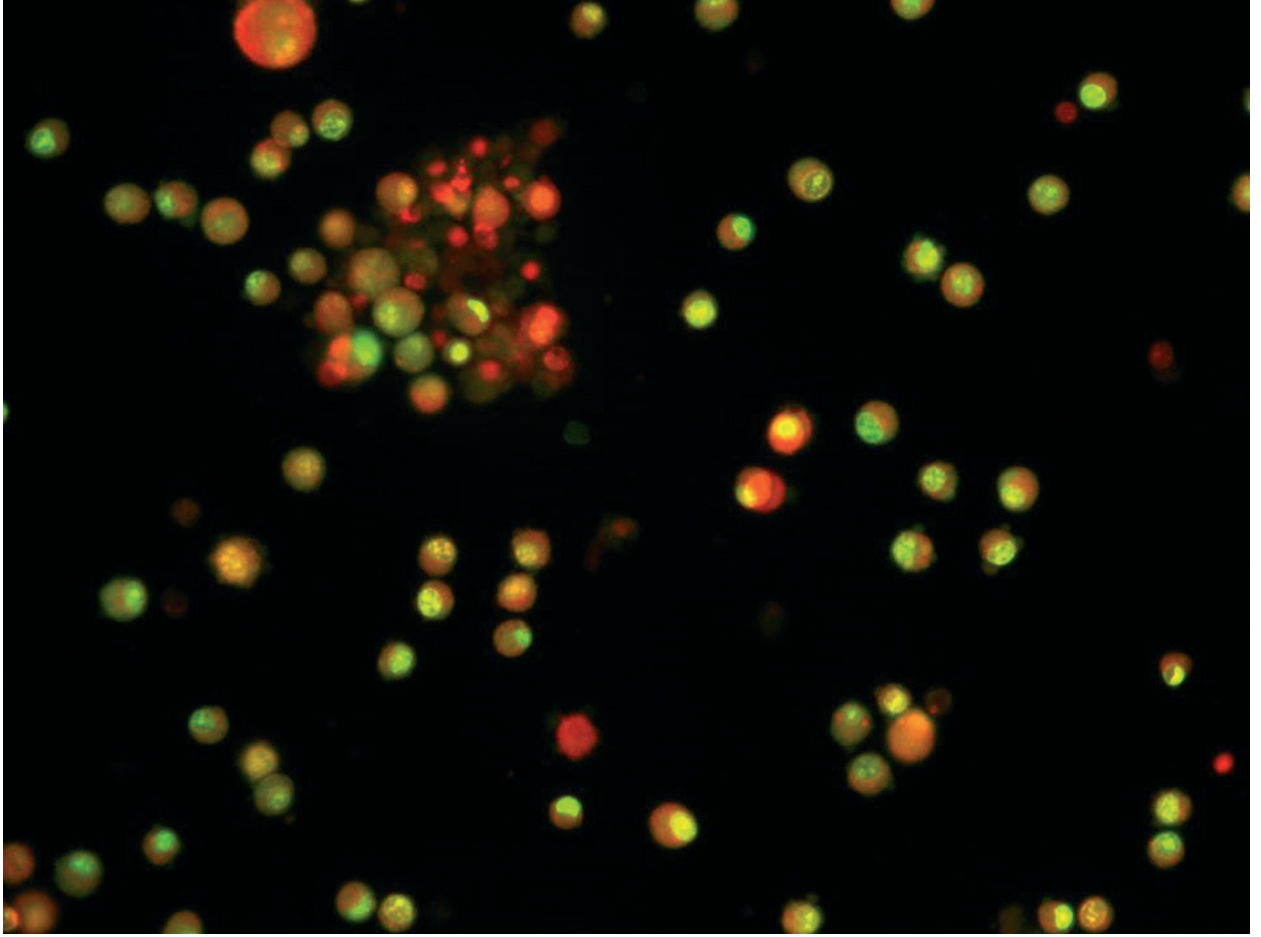
Bir çalışmada MEK-ERK yolunun DNA-PKc aracılı NHEJ yolunda görev aldığı gösterilmiştir. MCF7 hücrelerinde etoposid DNA çift zincir kırıkları oluşturmuş ve bu kırıklar bir MEK inhibitörü olan U0126 varlığında daha hızlı tamir edilmiştir. Bu durum ERK'in DNA-PKc aracılığı ile çift zincir kırığı tamirini azalttığını göstermiştir [20]. Korwek ve arkadaşları etopositin DNA kırıkları oluşturup replikasyonu ve aynı zamanda transkripsiyonu da etkilediğini göstermişlerdir. Etoposid ATM ve onun substratları H2AX ve p53'ün fosforilasyonunu etkilemekte ve böylece apoptotik hücre ölümünü aktifleştirmektedir [21].

Çeşitli kanser hücre hatlarında, HDAC6'nın inhibisyonu hücreleri etoposid ve doksorubisin gibi antineoplastik ajanlara duyarlı hale getirmiştir. Bu duyarlılığın ATR/Chk1 yolunun apoptozu aktifleştirmesiyle oluştuğu düşünülmektedir [22]. Hep3B hepatoma hücrelerinde etopositin apoptotik etkilerinin yanında otofajik etkilerinin de olduğu gözlenmiştir. Anti-apoptotik ve anti-otofajik bir protein olan Bcl-2'yi aşırı ifade eden Hep3B hücrelerinde etoposid uyarımlı programlanmış hücre ölümünde Bcl-2'nin Beclin 1'den ayrıldığı ve apoptozun uyarıldığı gösterilmiştir [23]. PI3K ve DNA-PK'nin ikili inhibitörü olan KU-0060648 etoposid ve doksorubisin birlikte kullanıldığında DNA-PKc olan hücrelerde sitotoksiteyi arttırırken, DNA-PKc olmayanlarda etkili olmamıştır. Bu bulgu DNA-PK inhibisyonunun sitotoksitede önemli olduğunu göstermiştir [24].

Çalışmamızda, etoposid L929 hücrelerinde hücre canlılığını doz ve zamana bağlı olarak azaltmıştır. Yu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada gastrik kanser hücrelerinde etoposid daha düşük dozlarda hücre ölümünü sağlarken [25], bizim çalışmamızda IC50 yaklaşık 500 mM civarında bulunmuştur. Bu konsantrasyon farkının hücre tipleri arasındaki değişikliklerden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Bonelli ve arkadaşları etoposid uygulamasının L929 hücrelerinde hücre döngüsünü durdurduğunu ve apoptozis uyarıldığını göstermişlerdir. Ancak, bizim çalışmamızda olduğu gibi apoptozisi mikroskobik olarak göstermişler, fakat kaspaz uyarımlı DNA fragmentasyonu gözlememişlerdir [26]. Çeşitli çalışmalarda da gösterildiği üzere apoptotik süreç bazı durumlarda kaspaz proteinlerinden bağımsız olarak da ilerleyebilmektedir (*caspase-independent apoptosis*). Ayrıca apoptozisin belirteçleri olan DNA fragmentasyon, apoptozom gibi apoptotik protein komplekslerinin oluşumu gözlenmektedir (*atipik apoptozis*) [27,28]. Çalışmamızda elde ettiğimiz apoptozisin mikroskobik olarak ve fragmentasyon ile gözlenip, kaspaz aktivitesinin değişmesi bu olgu ile açıklanmaktadır.

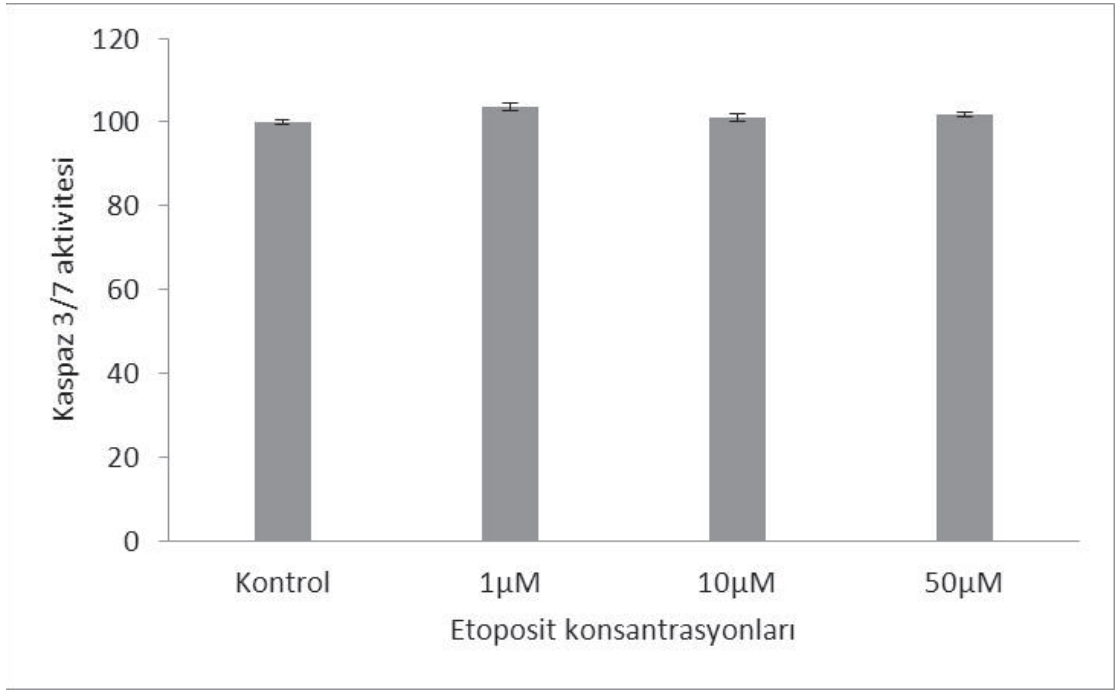
Abe ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Ku70, Ku80, DNA-PKc ve Artemis proteinlerinin yüksek etoposid dozlarında apoptotik yolağı uyardığını, ancak düşük etoposid dozlarında ise DNA onarım mekanizmasında bu proteinlerin beraber çalıştığını göstermişlerdir [30]. Ku70'in Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik bir üyesi olan Bax'a bağlandığı ve onun fonksiyonunu baskıladığı gösterilmiştir, bu Ku70'in aynı zamanda anti-apoptotik bir



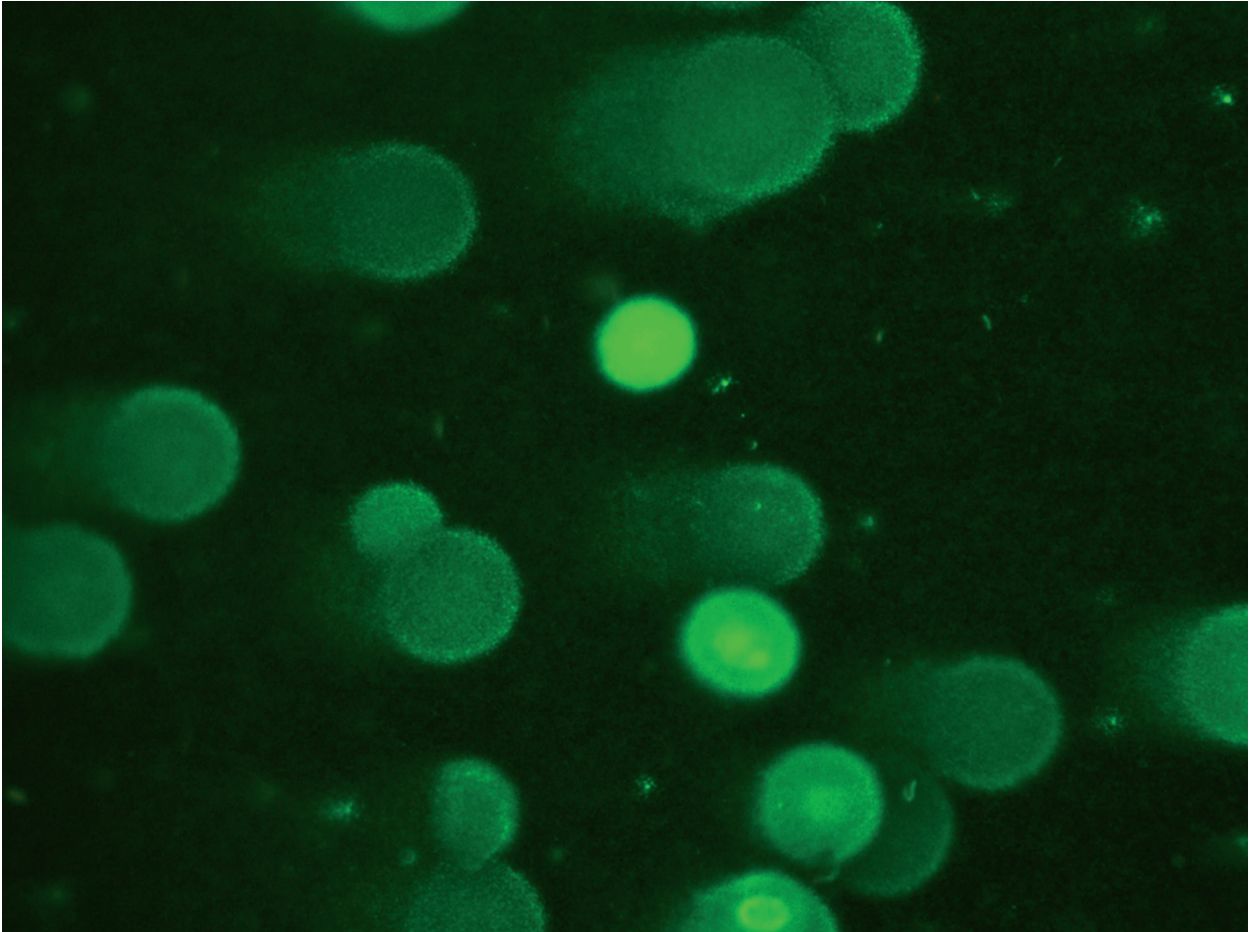
Şekil 2. (a) L929 hücrelerinde 24. saatte etoposit uygulamasının ardından gerçekleşen apoptozisin floresan mikroskop görüntüleri (20X) Yeşil hücreler canlı, kırmızı hücreler nekrotik, turuncu hücreler ise apoptotik hücrelerdir.

(b) L929 hücrelerinde 24. saatte etoposit uygulamasının konsantrasyona bağlı olarak hücre ölümüne etkisi

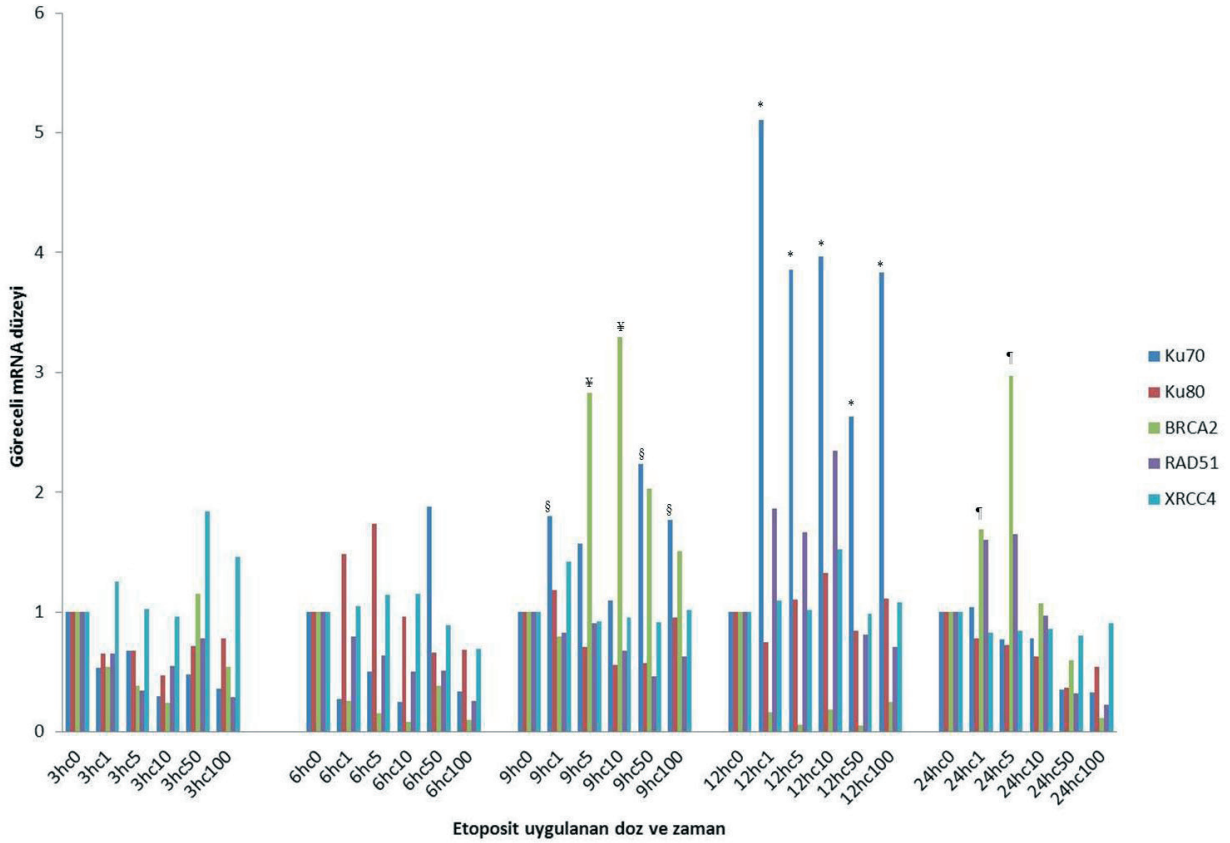
* L929 hücrelerinde 24 saat sonra çeşitli konsantrasyonlarda etoposit uygulamasının ardından apoptotik hücre sayısı kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p < 0.05$).



Şekil 3. L929 hücrelerinde 24. saatte etoposit uygulamasının konsantrasyona bağlı olarak kaspaz 3/7 aktivitesi üzerine etkisi. Etoposit 24. saatte kaspaz aktivitesini gruplar arasında değiştirmemiştir ($p<0.05$).



Şekil 4. Etoposit uygulamasından 24 saat sonra oluşan çift zincir DNA kırıklarını belirleyen komet görüntüsü (40X)



Şekil 5. Çeşitli konsantrasyonlarda etoposid uygulanan ve kontrol grubu L929 hücrelerinde 3, 6, 9, 12 ve 24 saatlik Ku70, Ku80, Rad51, BRCA2 ve XRCC4 genlerinin göreceli mRNA ifade düzeyleri. Her gruptaki gen ifadeleri b-Actin ifadesine göre normalize edilmiştir.

¥ L929 hücrelerinde 9 saat etoposid uygulamasının ardından BRCA2 mRNA ifade düzeylerindeki değişim kontrol grubuna göre anlamlıdır ($p < 0.05$)

§ L929 hücrelerinde 9 saat etoposid uygulamasının ardından Ku70 mRNA ifade düzeylerindeki değişim kontrol grubuna göre anlamlıdır ($p < 0.05$)

* L929 hücrelerinde 12 saat etoposid uygulamasının ardından Ku70 mRNA ifade düzeylerindeki değişim kontrol grubuna göre anlamlıdır ($p < 0.05$)

¶ L929 hücrelerinde 24 saat etoposid uygulamasının ardından BRCA2 mRNA ifade düzeylerindeki değişim kontrol grubuna göre anlamlıdır ($p < 0.05$)

görevi olduğunu da göstermektedir [31]. Çalışmamızda etoposid uygulanan gruplarda Ku70 mRNA ifade düzeyleri 9 ve 12. saatlerde kontrol grubuna göre artarken, 24. saatte doza bağımlı olarak azalmıştır. Bu durum etoposite saat ve doza bağlı olarak maruziyetin artmasıyla apoptozun da arttığını göstermektedir. Ku80 mRNA ifade düzeylerinde ise kontrol grubuna göre genellikle bir azalış gözlenmiştir.

Kolorektal adenokarsinoma hücrelerinde etoposid varlığında RAD51 protein ifadesinin arttığı gözlenmiştir [32]. Bununla birlikte, BRCA2 ve RAD51 mutant Chinese hamster hücrelerinin topoizomeras 2 inhibitörlerine daha duyarlı olduğu belirlenmiştir [33]. Çalışmamızda RAD51 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir azalış ya da artış göstermese de etoposid uygulanan gruplarda 3, 6, 9. saatlerde azalırken, 12 ve 24. saatte artması etoposite maruziyetin artmasıyla apoptozun artmasının diğer bir göstergesi olarak düşünülebilir.

Etoposid, topoizomeras II varlığında görev yapmaktadır ve BRCA1, BRCA2 gibi DNA onarım enzimleri olmayan hücrelerin etoposite duyarlılığının arttığı gösterilmiştir

[33]. Çalışmamızda BRCA2 mRNA ifade düzeyleri zaman ve konsantrasyonlar arasında farklılık göstermiştir. Ancak yüksek etoposid konsantrasyonlarında BRCA2 ekspresyon düzeyindeki azalışa, etoposidin etki ettiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, etoposidin L929 fare fibroblastlarında DNA kırıkları oluşturduğunu, bu kırıkların zamanla ve yüksek konsantrasyonlarda arttığını gözledik. Literatürde bir ilk olarak L929 hücrelerinde çift zincir kırığı oluştuktan sonra DNA onarım mekanizmalarında görev alan çeşitli enzimlerin mRNA ifadeleri doza ve zamana bağlı olarak değişse de apoptozu engelleyecek kadar etkili olmadığı belirlenmiştir. Bu durum etoposid aracılığıyla oluşturulmuş DNA çift zincir kırıklarının L929 hücreleri üzerinde de apoptozu uyaran etkili bir mekanizma olduğunu göstermektedir.

Bilgi ve Teşekkür

Çalışma, 2010 yılında The EMBO Meeting 2010'da poster olarak "The role of double strand DNA repair gene expressions in the cytotoxicity of the topoisomeras in-

hibitor etoposide to L929 fibroblasts” başlığı ile sunulmuştur.

Çıkar çatışması

Bu çalışmada yazarlar, konuyla ve/veya herhangi başka bir yazar ile ilgili maddi veya manevi bir çıkar ilişkisi içinde bulunmamaktadır.

Kaynaklar

- [1] Zhang Y, Rohde LH, Wu HL. Involvement of nucleotide excision and mismatch repair mechanisms in double strand break repair. *Curr Genomics* 2009; 10:250-258.
- [2] Hande KR. Topoisomerase II inhibitors. *Update on Cancer Therapeutics* 2008; 3: 13-26.
- [3] Drouet J, Delteil C, Lefrancois J, Concannon P, Salles B, *et al.* DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem* 2005; 280:7060-7069.
- [4] Frank-Vaillant M, Marcand S. Transient stability of DNA ends allows nonhomologous end joining to precede homologous recombination. *Molecular Cell* 2002; 10:1189-99.
- [5] Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:430-40.
- [6] Kellner U, Sehested M, Jensen PB, Gieseler F, Rudolph P. Culpit and victim- DNA topoisomerase II. *Lancet Oncol* 2002; 3:235-43.
- [7] Elsea SH, Westergaard M, Burden DA, Lomenick JP, Osheroff N. Quinolones share a common interaction domain on topoisomerase II with other DNA cleavage-enhancing antineoplastic drugs. *Biochemistry* 1997; 36:2919-24.
- [8] Attia SM, Aleisa AM, Bakheet SA, Al-Yahya AA, Al-Rejaie SS, *et al.* Molecular cytogenetic evaluation of the mechanism of micronuclei formation induced by camptothecin, topotecan, and irinotecan. *Environ Mol Mutagen* 2009; 50:145-151.
- [9] Hande KR. Etoposide: Four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* 1998; 34:1514-1521.
- [10] Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1-6.
- [11] Burt RK, Poirier MC, Link CJ, Bohr VA. Antineoplastic drug-resistance and DNA-repair. *Ann Oncol* 1991; 2: 325-334.
- [12] Norbury CJ, Zhivotovsky B. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 2004; 23: 2797-2808.
- [13] Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair - principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004; 26: 249-261.
- [14] Fortune JM, Osheroff N. Topoisomerase II as a target for anti-cancer drugs: when enzymes stop being nice. *Prog Nucleic Acid Re* 2000; 64: 221-253.
- [15] Robertson JD, Enoksson M, Suomela M, Zhivotovsky B, Orrenius S. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 29803-29809.
- [16] Lin CF, Chen CL, Chang WT, Jan MS, Hsu LJ, *et al.* Sequential caspase-2 and caspase-8 activation upstream of mitochondria during ceramide- and etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279:40755-40761.
- [17] Yang XH, Sladek TL, Liu XS, Butler BR, Froelich CJ, *et al.* Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res* 2001; 61: 348-354.
- [18] Tao W, Hangoc G, Hawes JW, Si Y, Cooper S, *et al.* Profiling of differentially expressed apoptosis-related genes by cDNA arrays in human cord blood CD34(+) cells treated with etoposide. *Exp Hematol* 2003; 31: 251-260.
- [19] Nakada S, Katsuki Y, Imoto I, Yokoyama T, Nagasawa M, *et al.* Early G2/M checkpoint failure as a molecular mechanism underlying etoposide-induced chromosomal aberrations. *J Clin Invest* 2006; 116: 2306-2307.
- [20] Wei F, Yan J, Tang D, Lin X, He L, *et al.* Inhibition of ERK activation enhances the repair of double-stranded breaks via non-homologous end joining by increasing DNA-PKcs activation. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1833(1):90-100.
- [21] Korwek Z, Sewastianik T, Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G, Alster O, *et al.* Inhibition of ATM blocks the etoposide-induced DNA damage response and apoptosis of resting human T cells. *DNA Repair* 2012; 11:864-73.
- [22] Wang L, Xiang SY, Williams KA, Dong HQ, Bai WL, *et al.* Depletion of HDAC6 enhances cisplatin-induced DNA damage and apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *PLoS One* 2012; 7(9):e44265.
- [23] Yoo SH, Yoon YG, Lee JS, Song YS, Oh JS, *et al.* Etoposide induces a mixed type of programmed cell death and overcomes the resistance conferred by Bcl-2 in Hep3B hepatoma cells. *Int J Oncol* 2012; 41:1443-1454.
- [24] Munck JM, Batey MA, Zhao Y, Jenkins H, Richardson CJ, *et al.* Chemosensitization of cancer cells by KU-0060648, a dual inhibitor of DNA-PK and PI-3K. *Mol Cancer Ther* 2012; 11:1789-98.
- [25] Yu LL, Wu JG, Dai N, Yu HG, Si JM. Curcumin reverses chemoresistance of human gastric cancer cells by downregulating the NF-kappaB transcription factor. *Oncol Rep* 2011; 26:1197-203.
- [26] Bonelli G, Sacchi MC, Barbiero G, Duranti F, Goglio G, *et al.* Apoptosis of L929 cells by etoposide: a quantitative and kinetic approach. *Exp Cell Res* 1996; 228:292-305.
- [27] Abraham MC, Shaham S. Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol* 2004; 14: 184-193.
- [28] Zhang Y, Zhang QH, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, *et al.* Atypical apoptosis in L929 cells induced by evodiamine isolated from *Evodia rutaecarpa*. *J Asian Nat Prod Res* 2004; 6: 19-27.
- [29] Abe T, Ishiai M, Hosono Y, Yoshimura A, Tada S, *et al.* KU70/80, DNA-PKcs, and Artemis are essential for the rapid induction of apoptosis after massive DSB formation. *Cell Signal* 2008; 20: 1978-85.
- [30] Cohen HY, Lavu S, Bitterman KJ, Hekking B, Imahiyerobo TA, *et al.* Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell* 2004; 13:627-38.
- [31] Schonn I, Hennesen J, Dartsch DC. Cellular responses to etoposide: cell death despite cell cycle arrest and repair of DNA damage. *Apoptosis* 2010; 15:162-72.
- [32] Jensen LH, Dejligbjerg M, Hansen LT, Grauslund M, Jensen PB, *et al.* Characterisation of cytotoxicity and DNA damage induced by the topoisomerase II-directed bisdioxopiperazine anti-cancer agent ICRF-187 (dexrazoxane) in yeast and mammalian cells. *BMC Pharmacol* 2004; 4:31.
- [33] Treszezamsky AD, Kachnic LA, Feng Z, Zhang J, Tokadjian C, *et al.* BRCA1- and BRCA2-deficient cells are sensitive to etoposide-induced DNA double-strand breaks via topoisomerase II. *Cancer Res* 2007; 67: 7078-81.