



VI. ULUSLARARASI KATILIMLI DENEYSEL HEMATOLOJİ KONGRESİ 19-21 NİSAN 2019 – GAZİANTEP NOVOTEL

Ruxolitinib multipl miyelom hücrelerinde enerji metabolizmasını düzenler

Yazarlar : Öğrenci Alican Kuşoğlu - Araştırma Görevlisi Bakiye Göker Bağca - Araştırma Görevlisi Neslihan Pınar Özateş Ay - Prof. Cumhur Gündüz - Prof. Güray Saydam - Doç.Dr. Çığır Biray Avcı

Kurum : Ege Üniversitesi

GİRİŞ - AMAÇ

Multipl miyelom, bağışıklık sisteminin temel düzenleyicilerinden olan kemik iliği plazma hücrelerinin kanseridir. Malign plazma hücrelerinin klonal proliferasyonunu özellikle çeşitli sitokinler aracılığıyla gerçekleşen sinyal iletiminde, hücre döngünde, apoptozda görev alan genlerle ilişkilendirilmiştir. Janus kinaz ailesi tirozin kinazları, STAT transkripsiyon faktörleriyle birlikte JAK-STAT sinyal iletim yolağını oluşturur. Bu yolak gen ekspresyonunu düzenleyen etkili ve karmaşık bir sistemdir. Çeşitli etkenlerle JAK'ın aktive olması STAT' ların seçici olarak fosforillenmesine neden olur. Fosforillenen STAT' lar dimerize olarak nükleusa yönelir ve gen regülasyonunu düzenlemek üzere hedef genin promotör bölgesine bağlanır. JAK/STAT yolağının düzenlenmesindeki problemler hematolojik malignitelerin oluşumunda kritik rol oynamaktadır. JAK1 ve JAK2 inhibitörü ruxolitinibin temel etkisi JAK'ın STAT'ı fosforile edebilmesini önleyerek hücre bölünmesini engellemesidir. Ruxolitinib bu özelliği ile miyelofibroz tedavisinde kullanılan FDA onaylı ilk ajandır.

Warburg etkisi, kanser hücrelerinin kendilerine büyüme, çoğalma, hayatta kalma avantajı sağlamak için metabolizmalarında glikoz alımı ve metabolizmasının artışı şeklinde değişiklik meydana getirmesi olarak tanımlanabilmektedir. Glikolizdeki artış, hücre dışında pH düşüşüne neden olarak tümör mikroçevresinin asidifikasyonunda artışa neden olmaktadır. Bu durum kanserlerin başlangıç aşamasında rol oynama potansiyeli taşıdığı gibi progresyon aşamasında da yer almaktadır.

Bununla birlikte ARH77 hücrelerinde ruxolitinibin hücrenin enerji metabolizması üzerindeki etkileri henüz incelenmemiştir. Bu çalışmada, ARH77 hücrelerinde ruxolitinibin hücrenin enerji metabolizması üzerindeki olası etkilerini belirlemeyi amaçlamaktayız.



VI. ULUSLARARASI KATILIMLI DENEYSEL HEMATOLOJİ KONGRESİ 19-21 NİSAN 2019 – GAZİANTEP NOVOTEL

METOD

Ticari olarak temin edilen ARH77 insan multipl miyelom hücre hattı, 2mM L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin içeren, %10 fetal bovin serumla desteklenmiş olan RPMI-1640 besi yeri kullanılarak deneyler için yeterli hücre ve pasaj sayısına ulaşılan kadar 37°C de %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilerek çoğaltılmıştır. Ruxolitinib etken maddesinin hücre metabolizması üzerindeki fenotipik ve genetik etkilerini belirlemek amacıyla sırasıyla için Seahorse XFp enerji fenotipi testi ve gerçek zamanlı kantitatif PCR yöntemleri uygulanmıştır. Bu amaçla, daha önceden belirlemiş olduğumuz IC₅₀ dozunda (20,03 uM) ARH77 hücrelerine uygulanmış ve 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodunun ardından Seahorse XFp enerji fenotipi testi kitinin protokolü doğrultusunda hücrelerin bazal metabolizma, oksijen tüketim ve hücre dışı asidifikasyon seviyeleri Seahorse XF24 Bioanalizer cihazıyla ölçülmüştür. Eş zamanlı olarak ruxolitinib uygulanan hücrelerden RNeasy Plus Mini Kit aracılığıyla total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve "Glucose Metabolism RT2 Profiler PCR Array" plakası kullanılarak etken maddenin hücre metabolizmasını düzenleyen genlerin ekspresyon seviyelerine olan etkileri 2-ΔΔCt yöntemi ile hesaplanarak belirlenmiştir. Tüm çalışmalar üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve ruxolitinib uygulanmayan hücre grupları kontrol olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Seahorse metabolik analiz yöntemi uygulanarak ARH77 hücrelerinde Ruxolitinib etken maddesinin hücre metabolizması üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Kontrol ve ruxolitinib uygulanmış grupta metabolik potansiyeller arasında anlamlı fark gözlenmesi de ruxolitinib uygulanmış hücre grubunda hem ekstraselüler asidifikasyon seviyelerinde, hem de oksijen alım düzeylerinde anlamlı ölçüde artış belirlenmiştir. Ayrıca ruxolitinibin hücrenin enerji metabolizmasını düzenleyen PYGM, PGM2, PHKB, PCK2, H6PD, PDK4 ve GYS2 genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı değişim oluşturduğu belirlenmiştir.

SONUC

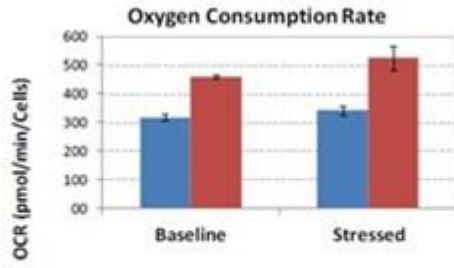
Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular, ruxolitinibin ARH77 hücrelerinde daha önce değerlendirilmemiş olan hücre enerji metabolizmasını genetik olarak düzenlediğini ve bu değişimin fenotipte de yansıdığını göstermektedir. İleri çalışmalarla ruxolitinibin daha önce üzerinde durulmamış olan enerji metabolizmasındaki olası potansiyel rolünün araştırılması, kanser araştırmalarındaki yerine yeni bir bakış açısı kazandıracaktır.



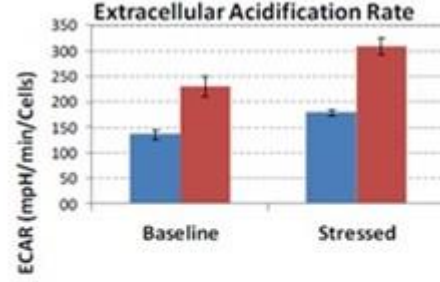
VI. ULUSLARARASI KATILIMLI DENEYSEL HEMATOLOJİ KONGRESİ 19-21 NİSAN 2019 – GAZİANTEP NOVOTEL

ANAHTAR KELİMELEER

Multipl miyelom, ruxolitinib, kanser metabolizması



Grafik 1. Oksijen alım düzeyi



Grafik 2. Ekstrasellüler asidifikasyon düzeyi