

# Aurora Kinaz İnhibitörü CCT137690, Kronik Miyeloid Lösemi Hücrelerinde Apoptozu Uyarabilir

## CCT137690, Inhibitor of Aurora Kinase, Can Stimulate Apoptosis in Chronic Myeloid Leukemia Cells

Aycan AŞIK<sup>1</sup>, Çağla KAYABAŞI<sup>1</sup>, Besra ÖZMEN YELKEN<sup>1</sup>, Tuğçe BALCI OKCANOĞLU<sup>2</sup>,  
Sevil GONCA<sup>1</sup>, Fatma SÖĞÜTLÜ<sup>1</sup>, Röya GASIMLI<sup>1</sup>, Sunde YILMAZ SÜSLÜER<sup>1</sup>,  
Çiğir BİRAY AVCI<sup>1</sup>, Cumhur GÜNDÜZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

<sup>2</sup> Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti

### ÖZET

**Amaç:** Serin/treonin protein kinaz olan aurora kinazlar, hücrelerin uygun mitotik ilerlemeden sorumlu önemli moleküllerdir. Kanser hücrelerinde anormal olarak ifade edildikleri bilinmekte ve bu nedenle önemli bir terapötik hedefler olarak görülmektedir. CCT137690, yüksek oranda seçici özellik gösteren sentetik bir aurora kinaz inhibitörüdür. Bu çalışmada CCT137690'un KU812 hücreleri (insan kronik miyeloid lösemi-KML) üzerinde apoptotik ve antiproliferatif etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Hastalar ve Yöntem:** CCT137690'ın KU812 hücrelerindeki sitotoksik etkisi, WST-8 ile belirlenmiştir. IC<sub>50</sub> dozunun apoptoz üzerine etkisi Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I, hücre döngüsü üzerine etkisi BD Cycletes Plus DNA Reagent Kiti ile akım sitometrisinde değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** KU812 KML hücre hattında CCT137690'ın 48 saatlik IC<sub>50</sub> dozu 6.24 µM olarak belirlenmiştir. CCT137690'ın 48 saatlik IC<sub>50</sub> dozunun apoptozu yaklaşık 7,2 kat indüklediği, G<sub>2</sub>/M fazında hücre döngüsünün durdurulmasına yol açtığı bulunmuştur.

**Sonuç:** CCT137690'ın, KU812 hücrelerindeki etkinliği, aurora kinaz inhibitörlerinin KML tedavisinde potansiyel avantajlarının olabileceği görüşünü destekler niteliktedir.

**Anahtar Sözcükler:** Kronik miyeloid lösemi (KML); Aurora kinazlar; Kinaz inhibitörleri; CCT137690

### ABSTRACT

**Objective:** Aurora kinases, which are serine/threonine protein kinases, are important molecules responsible for proper mitotic progression of cells. It is known that Aurora kinases are abnormally expressed in cancer cells. Therefore, they are seen as an important therapeutic target. CCT137690 is a synthetic aurora kinase inhibitor with high selectivity. In this study, it was aimed to determine apoptotic and antiproliferative effects of CCT137690 on KU812 cells (human chronic myeloid leukemia-CML).

**Patients and Methods:** The cytotoxic effect of CCT137690 in KU812 cells was determined by WST-8. Effect of IC<sub>50</sub> dose on apoptosis and on cell cycle was assessed with flow cytometry after using Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I and BD Cycletes Plus DNA Reagent Kit, for apoptosis and cell cycle, respectively.

### Yazışma Adresi

Araş. Gör. Aycan AŞIK

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji  
Anabilim Dalı, İzmir-Türkiye

Geliş: 30.11.2017 - Kabul: 14.12.2017

E-posta: aycan.ask@gmail.com

**Results:** The IC<sub>50</sub> of CCT137690 was determined as 6.24 µM in KU812 CML cell line for 48 hours. It was found that the IC<sub>50</sub> of CCT137690 for 48-hours induced apoptosis about 7.2 fold and caused cell cycle arrest in G<sub>2</sub>/M phase.

**Conclusion:** The activity of CCT137690 in KU812 cells supports the view that aurora kinase inhibitors may have potential advantages in the treatment of CML.

**Key Words:** Chronic myeloid leukemia; Aurora kinases; Kinase inhibitors; CCT137690

## GİRİŞ

Kronik miyeloid lösemi (KML), transforme hematopoetik kök hücre kaynaklı klonal miyeloproliferatif bir hastalıktır (1). Hastaların hemen tümüne yakınında kromozom 9 ve 22 arasındaki resiprokal translokasyon t(9;22) (q34;q11.2) sonucunda meydana gelen Philadelphia (Ph) kromozomu yapısı gözlenmekte ve bu translokasyon sonucunda KML'nin patogenezinde rol alan tirozin kinaz aktiviteli bir ürün kodlayan *Bcr-Abl* füzyon geni oluşmaktadır (2). *Bcr-Abl* onko-proteini lösemi fenotipinden sorumlu olmasının yanı sıra, PI3K, MAP kinaz, NFκB, RAS ve STAT5 gibi aşağı yönlü sinyal molekülleri ile anormal etkileşimler kurarak lösemi hücrelerinde malign transformasyon, genetik istikrarsızlık ve antiapoptotik durumların artışı da teşvik etmektedir (3). *Bcr-Abl*'nin KML'de merkezi rol üstlenmesi onu KML tedavisi için başlıca terapötik hedef haline getirmiştir (4). *Bcr-Abl*'nin hedeflenmesi amacıyla geliştirilen ilk ilaç imatinib olmuştur; fakat T315I başta olmak üzere *Bcr-Abl* kinaz domainlerindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan ilaç direnci nedeniyle hedeflemenin etkinliğini artırmak için ikinci jenerasyon (nilotinib ve dasatinib) ve üçüncü jenerasyon (ponatinib) *Bcr-Abl* tirozin kinaz inhibitörleri geliştirilmiştir (5). Bununla birlikte mevcut tedavi stratejilerinin güçlendirilmesi ve yeni stratejilerin geliştirilmesi amacıyla doğrudan *Bcr-Abl*'nin hedeflenmesinin yanı sıra farklı moleküllerin hedeflenmesine yönelik araştırmalar da mevcuttur (6).

Aurora A, B ve C olmak üzere üç izoformu bulunan aurora kinazlar, uygun mitotik ilerleme için sentrozomların, iğ ipliklerinin ve kinetokorların fonksiyonunu düzenleyen en önemli serin/treonin protein kinazlardır (7). Çeşitli çalışmalarda aurora A ve aurora B'nin, meme, kolon, nöroblastoma, pankreas ve over kanser gibi çeşitli malignitelere aşırı ifade edildiği belirtilmiş olmakla birlikte, bir çalışmada KML hücrelerinde de *Bcr-Abl*'nin bu kinazların ifadesini indüklediğini belirtilmiştir (8,9). *Bcr-Abl* kinaz domainlerindeki mutasyonlardan kaynaklanan direnç mekanizmalarının üstesinden gelmek amacıyla in vitro çalışmalarda MK-0457, PHA-739358 ve AT9283 aurora kinaz inhibitörlerinin yabancıl tip ve T315I mutasyonlu KML hücrelerinde hücre döngüsünü blokladığı ve apoptozu tetiklediği gösterilmiştir. Ayrıca MK-0457 kullanımında KML veya Ph<sup>+</sup> akut lenfoblastik lösemi (ALL) hastalarında klinik yanıtın gözlenmesi sonucu

aurora kinaz inhibitörlerinin KML hastalığının tedavisinde potansiyel avantajlarının olabileceği ileri sürülmüştür (6). CCT137690, yüksek oranda seçici özellik gösteren sentetik bir aurora kinaz inhibitördür (10).

Bu çalışmada KU812 Ph<sup>+</sup> insan KML hücre hattında CCT137690 uygulamasının apoptoz ve hücre döngüsü üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## HASTALAR ve YÖNTEM

KU812 (ATCC, Amerika), T315I mutasyonu içermeyen Ph<sup>+</sup> insan KML hücre hattıdır. KU812 hücreleri, %10 FBS (Fetal Bovine Serum), 2mM L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren RPMI 1640 (Biological Industries, İsrail) besi ortamında, standart hücre kültürü inkübatöründe (%5 CO<sub>2</sub>'lik atmosfer, %95 nispi nem, 37°C) kültürü sağlandı.

CCT137690'nun sitotoksik etkisini belirlemek için WST-8 analizi (Sigma-Aldrich, Almanya) kullanıldı. Öncelikle 1 × 10<sup>5</sup> hücre 96-kuyulu plaklara ekilerek ve hücrelere 50 – 0.78 µM ardışık doz aralıklarında CCT137690 muamelesi yapılarak 48 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası deney üreticinin önerdiği protokole uygun olarak yürütüldü. CCT137690'nun IC<sub>50</sub> dozu Calcusyn v.2 yazılımı (Biosoft, ABD) ile hesaplandı.

CCT137690'nun KU812 hücrelerindeki apoptotik etkisini değerlendirmek için FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, ABD) kullanıldı. Öncelikle 1 × 10<sup>6</sup> hücre IC<sub>50</sub> dozu ile 48 saat için muamele edildi, muamele edilmeyen hücreler kontrol olarak kabul edildi. İnkübasyon sonrası hücreler toplanıp PBS ile yıkandıktan sonra deney üreticinin önerdiği protokole uygun olarak yürütüldü. Hücreler akım sitometrisinde (BD Accuri C6, ABD) değerlendirildi.

CCT137690'nun KU812 hücrelerindeki hücre döngüsüne etkisini değerlendirmek için BD Cycletes Plus DNA Reagent Kit (BD Biosciences, ABD) kullanıldı. Öncelikle 1 × 10<sup>6</sup> hücre IC<sub>50</sub> dozu ile 48 saat için muamele edildi, muamele edilmeyen hücreler kontrol olarak kabul edildi. İnkübasyon sonrası hücreler toplandı, PBS ile yıkandıktan sonra deney üreticinin önerdiği protokole uygun olarak yürütüldü. Hücreler akım sitometrisinde (BD Accuri C6, ABD) değerlendirildi.

## BULGULAR

CCT137690 ile 48 saatlik inkübasyon sonucunda CCT137690'ın KU812 hücrelerindeki  $IC_{50}$  dozu  $6.24 \mu M$  olarak bulunmuştur (Şekil 1).

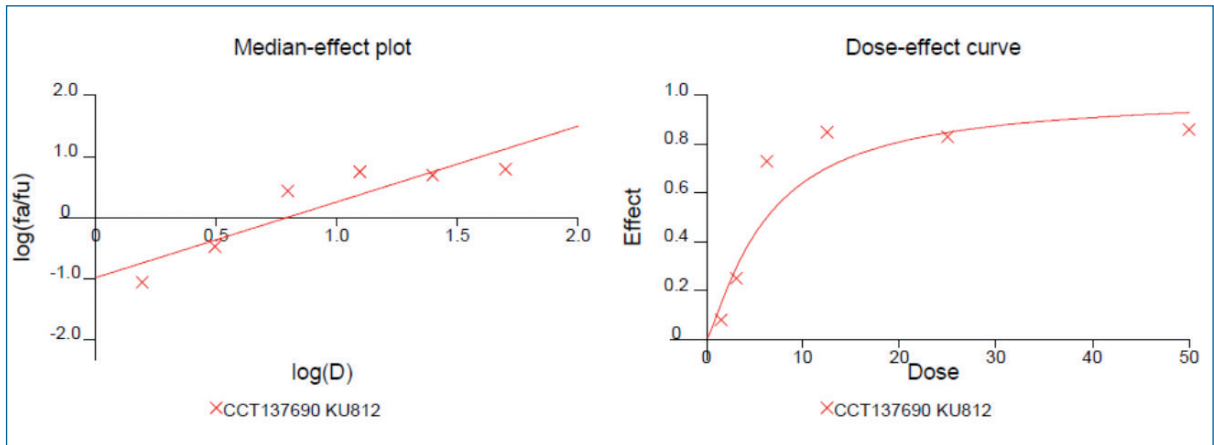
CCT137690'un KU812 hücrelerindeki apoptotik etkinliği değerlendirildiğinde etken madde ile muamele edilmeyen kontrol grubuna kıyasla CCT137690'ın  $IC_{50}$  dozu, erken apoptozu yaklaşık 3.4 kat, geç apoptozu 10.7 kat genel olarak ise yaklaşık 7.2 kat indüklediği bulunmuştur (Şekil 2).

CCT137690'un KU812 hücrelerindeki hücre döngüsü üzerindeki etkinliği değerlendirildiğinde ise etken madde ile muamele edilmeyen kontrol grubuna kıyasla CCT137690'ın  $IC_{50}$  dozunun,  $G_2/M$  fazında birikime yol açarak döngünün bu fazda durdurduğu bulunmuştur.

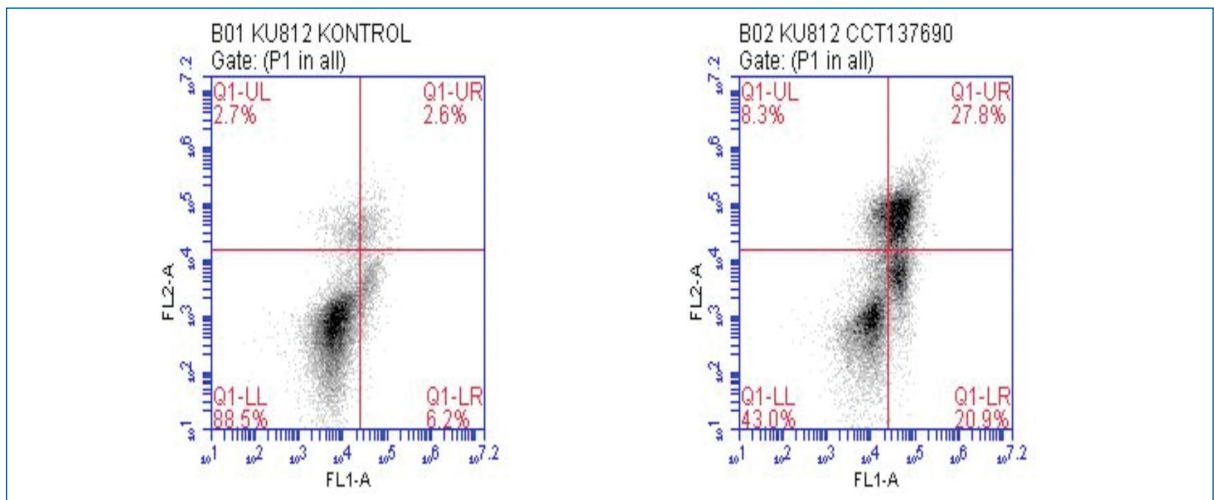
## TARTIŞMA ve SONUÇ

Hücre döngüsünün mitotik sürecindeki önemli rolleri ile proliferasyona sağladığı katkı ve malignitelerdeki aşırı ifadesi göz önüne alındığında aurora kinaz ailesi üyelerinin, kanser tedavisinde önemli terapötik hedef oluşturduğu bildirilmiştir (7).

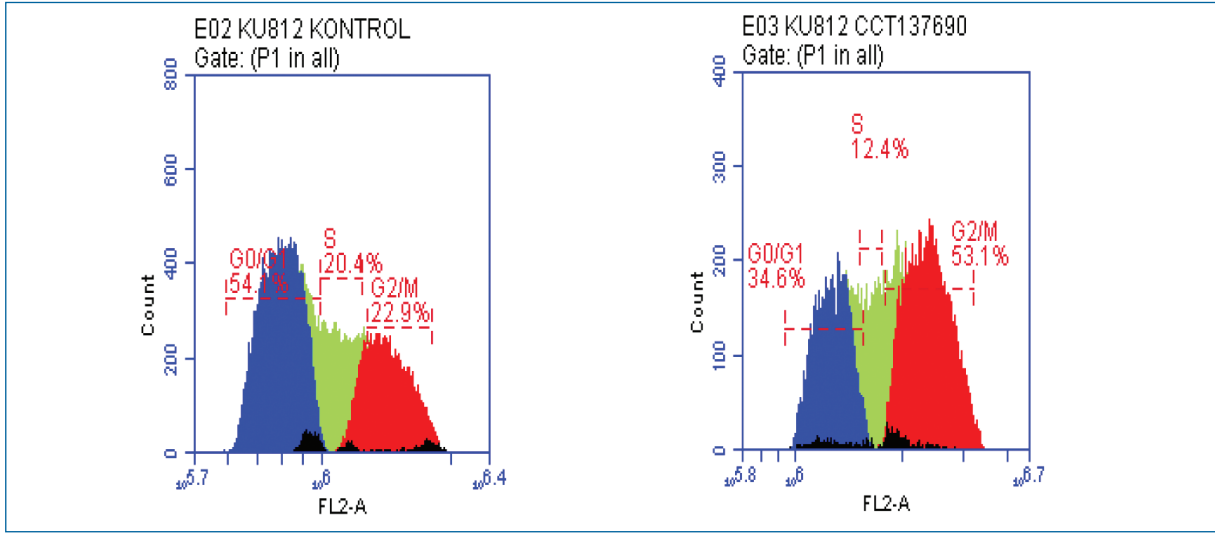
Aurora kinazların, genetik knock-down ya da küçük inhibitör moleküller kullanılarak inhibisyonu sonucu KML'de önemli terapötik yarar sağladığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Kelly ve arkadaşları, Aurora A kinaz inhibitörü MLN8237'in in vitro ve in vivo olarak nilotinib etkisini artırdığını göstermişler ve MLN8237 ile nilotinib kombinasyonel kullanımının T3151 mutasyonlu KML klon gelişiminin potansiyel baskılayıcısı olabileceğini vurgulamışlardır (11). Yuan



**Şekil 1.** CCT137690'ın KU812 hücrelerindeki  $IC_{50}$  doz ve medyan etki grafiği. KU812 KML hücre hattında CCT137690'ın 48 saatlik  $IC_{50}$  dozu  $6.24 \mu M$  olarak belirlenmiştir.



**Şekil 2.** CCT137690'ın  $IC_{50}$  dozunun KU812 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi. Şekildeki bölmelerde Q1-LL, canlı hücre yüzdesini; Q1-LR, erken apoptotik hücre yüzdesini; Q1-RR, geç apoptotik hücre yüzdesini; Q1-UL, nekrotik hücre yüzdesini göstermektedir. CCT137690'ın 48 saatlik  $IC_{50}$  dozunun apoptozu yaklaşık 7.2 kat indüklediği saptanmıştır.



**Şekil 3.** CCCT137690'ın  $IC_{50}$  dozunun KU812 hücrelerindeki hücre döngüsünün durdurulması. Şekilde mavi renk, hücre döngüsünün  $G_0/G_1$  fazında bulunan hücreleri ( $2n$ ); yeşil renk S fazında bulunan hücreleri ( $2n-4n$ ); kırmızı renk  $G_2/M$  fazında bulunan hücreleri ( $4n$ ) ifade etmektedir. CCT137690'ın 48 saatlik  $IC_{50}$  dozu  $G_2/M$  fazında hücre döngüsünün durdurulmasına yol açtığı saptanmıştır.

ve arkadaşları, Aurora A'nın spesifik inhibisyonunun T3151 *Bcr-Abl* mutasyonlu ve mutasyonsuz KCL-22 KML hücrelerinde apoptozu indüklediği ve hücre büyümesini baskıladığı, ayrıca KML hücrelerini imatinib tedavisine daha duyarlı hale getirdiği ve *Bcr-Abl* mutasyon kazanımını da bloke ettiğini göstermişlerdir (12). Illert ve arkadaşları, dual Abl ve aurora kinaz inhibitörleri PHA-739358 (danusertib) ve R763/AS703569'un yabanıl tip ve tirozin kinaz dirençli *Bcr-Abl* mutant KML hücrelerinde anti-proliferatif etkilerini gösterdikleri çalışmada dual Abl ve aurora kinaz inhibisyonunun Abl-tirozin kinaz inhibitör dirençli KML'nin üstesinden gelmek için kullanımının önemini vurgulamışlardır (13). Wang ve arkadaşları, küçük inhibitör molekül AKI603 ile Aurora A inhibisyonunun imatinib-dirençli KML hücrelerinde hücre proliferasyonunu ve koloni oluşumunu poliploidi birikimi ile hücre döngüsünün durdurulmasını indükleyerek inhibe ettiğini ve hem yabanıl tip *Bcr-Abl* hem de T3151 mutasyonlu hücrelerde lösemi hücre senesensini indüklediğini göstermişlerdir (14).

Çalışmamızda kullandığımız seçici aurora kinaz inhibitörü CCT137690'ın antikanser etkilerini gösteren literatüre geçmiş birkaç çalışma mevcuttur. Faisal ve arkadaşları, CCT137690 etkisi ile in vitroda nöroblastoma hücrelerinde tümör agresifliği ile ilişkili yüksek MYCN ifadesinin azaldığını ve in vivo'da tümör kitlesinin azaldığını göstermişler ve HCT116 insan kolorektal kanser hücrelerinde zamana bağlı olarak artış gösteren şekilde poliploidiye yol açarak hücre döngüsünü etkilediğini ve aynı şekilde artış gösteren apoptozu uyardığını belirtmişlerdir (8). Wu ve arkadaşları, SW-48 ve SW-620 insan kolon adenokarsinom hücrelerinde yap-

tıkları çalışmada CCT137690 etkisiyle hücre döngüsünde  $G_2/M$ 'de yığılma ve poliploidi gerçekleştiğini ve iyonize radyasyonla kombinasyonel uygulanmasıyla apoptoz uyarımının artırdığını göstererek CCT137690'ın iyonize radyasyonla sinerjistik etkisi vurgulanmıştır (10).

Solid tümörlerin yanı sıra akut miyeloid lösemide (AML) de CCT137690'ın antikanser etkisi incelenmiştir. Moore ve arkadaşları, FLT3-ITD<sup>+</sup> alelinde yeni bir D835Y tirozin kinaz domaini mutasyonu barındıran FLT3 inhibitör-dirençli insan AML MOLM-13 (MOLM-13-RES) hücrelerinde, CCT137690'ın önemli derecede hücre büyümesini inhibe ettiğini göstermişler ve sonucunda aurora kinaz inhibisyonunun FLT3 mutant AML tedavisinde yararlı olabileceğini vurgulamışlardır (15).

KU812 hücrelerinde CCT137690'ın etkilerini incelediğimiz bu çalışmada diğer aurora kinaz inhibitörlerinde olduğu gibi apoptozu yüksek oranda uyarak ve  $G_2/M$  fazında hücre döngüsünün durdurulmasına yol açarak antiproliferatif etkisi olduğu ve buna bağlı olarak da önemli ölçüde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. İleri çalışmalarla CCT137690'ın KML direnç modellerinde de yalnız olarak ya da diğer inhibitörlerle kombinasyonel olarak uygulanması sonucu KML için antikanser etkisinin daha derin incelenmesi yapılabilir.

Sonuç olarak bu çalışma, bir aurora kinaz inhibitörü olan CCT137690'ın, yüksek bir oranda apoptozu uyarması ve hücre döngüsünün durdurulmasına neden olmasıyla, aurora kinaz inhibitörlerinin KML tedavisinde potansiyel avantajlarının olabileceği görüşünü destekler niteliktedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarların çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## MALİ AÇIKLAMA

Çalışma için doğrudan veya dolaylı mali destek alınmadı. Çalışma ile ilgili herhangi bir firma veya kişi ile ilgili ticari bağlantı yoktur.

## YAZAR KATKISI

Verilerin toplanması: AA, ÇKB, BÖY, TBO, SG, FS, RG, SYS, ÇBA, CG; Literatür taraması ve makalenin yazımı: AA, CG.

## KAYNAKLAR

1. Kabarowski JH, Witte ON. Consequences of BCR-ABL expression within the hematopoietic stem cell in chronic myeloid leukemia. *Stem Cells* 2000;18:399-408.
2. Thompson PA, Hagop MK, Jorge EC. Diagnosis and treatment of chronic myeloid leukemia in 2015. *Mayo Clin Proc* 2015; 90:1440-54.
3. Valent P. Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia (CML): Current concepts on pathogenesis and new emerging pharmacologic approaches. *Biologics* 2007;1:433-48.
4. Kantarjian HM, Giles F, Quintás-Cardama A, Cortes J. Important therapeutic targets in chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 2007;13:1089-97.
5. Mughal A, Aslam HM, Khan AMH, Saleem S, Umah R, Saleem M. Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors-current status. *Infect Agent and Cancer* 2013;8:23.
6. Alvarado Y, Jorge EC. Emerging role of Aurora kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Clinical Leukemia* 2007;1:325-30.
7. Katayama H, Sen S. Aurora kinase inhibitors as anticancer molecules. *Biochim Biophys Acta* 2010;1799:829-39.
8. Faisal A, Vaughan L, Bavetsias V, Sun C, Atrash B, Avery S, et al. The aurora kinase inhibitor CCT137690 downregulates MYCN and sensitizes MYCN-amplified neuroblastoma in vivo. *Mol Cancer Ther* 2011;10:2115-23.
9. Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Udaka K, Yokoyama A. Bcr-Abl activates AURKA and AURKB in chronic myeloid leukemia cells via AKT signaling. *Int J Cancer* 2014;134:1183-94.
10. Wu X, Liu, W, Cao Q, Chen C, Chen Z, Xu Z, et al. Inhibition of Aurora B by CCT137690 sensitizes colorectal cells to radiotherapy. *J Exp Clin Cancer Res* 2014;33:13.
11. Kelly KR, Ecsedy J, Medina E, Mahalingam D, Padmanabhan S, Nawrocki ST, et al. The novel Aurora A kinase inhibitor MLN8237 is active in resistant chronic myeloid leukaemia and significantly increases the efficacy of nilotinib. *J Cell Mol Med* 2011;15:2057-70.
12. Yuan H, Wang Z, Zhang H, Roth M, Bhatia R, Chen WY. Overcoming CML acquired resistance by specific inhibition of Aurora A kinase in the KCL-22 cell model. *Carcinogenesis* 2012;33:285-93.
13. Illert AL, Seitz AK, Rummelt C, Kreutmair S, Engh RA, Goodstal S, et al. Inhibition of Aurora kinase B is important for biologic activity of the dual inhibitors of BCR-ABL and Aurora kinases R763/AS703569 and PHA-739358 in BCR-ABL transformed cells. *PLoS One* 2014;9:e112318.
14. Wang LX, Wang JD, Chen JJ, Long B, Liu LL, Tu XX. Aurora A kinase inhibitor aki603 induces cellular senescence in chronic myeloid leukemia cells harboring t315i mutation. *Sci Rep* 2016;6:35533.
15. Moore AS, Faisal A, De Castro DG, Bavetsias V, Sun C, Atrash B, et al. Selective FLT3 inhibition of FLT3-ITD+ acute myeloid leukaemia resulting in secondary D835Y mutation: a model for emerging clinical resistance patterns. *Leukemia* 2012;26:1462-70.