

## CD30 AKTİVASYONUNUN NODAL ANAPLASTİK BÜYÜK HÜCRELİ LENFOMA HÜCRE SIKLUSU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Edi LEVI<sup>1</sup>, Walther PFEIFER<sup>2</sup>, Marshall E. KADIN<sup>2</sup>

### ÖZET

**Amaç:** CD30 aktivasyonu sistemik anaplastik büyük hücreli lenfoma hücrelerinde büyümeyi durdurmaktadır. Bu büyüme inhibisyonunun hangi mekanizmalarla meydana geldiği bilinmemektedir. CD30 reseptör molekülü tümör nekrozis faktör ailesinin bir ferdi olmakla birlikte bir ölüm bölgesi (death domain) içermez. Bu nedenle hücre çoğalmasını nasıl olup da durdurabildiği tartışmalı bir konudur.

**Yöntem:** Bu çalışmada bir nodal anaplastik hücre lenfoma hücre serisi olan Karpas 299'u, CD30 aktivasyonunun çoğalma üzerindeki baskılayıcı etkilerini araştırmak amacıyla kullandık. CD30 aktivasyonu bir CD30 agonist antikoru olan HeFi-1 ile sağlandı. CD30 aktivasyonunu takiben Annexin V immun boyası ve akım sitometrik yöntemle apoptoz tespiti yapıldı. 72 saatlik bir gözlem süresince apoptoz gözlenmedi.

**Bulgular:** Apoptoz gözlenmemesi üzerine, hücreler hücre siklusu açısından senkronize edilerek CD30 aktivasyonunu takiben DNA içeriği akım sitometrik yöntemle tespit edildi. Bu yöntemin uygulanmasıyla G1 fazında bir kısmı hücre siklus arresti saptandı. Hücrelerin p21 ve retinoblastoma protein düzeyleri Western blot analizi ile ölçüldü. Bu ölçümler sonunda CD30 aktivasyonu ile birlikte p21 düzeyi artışı ve retinoblastoma proteini hipo-fosforilasyonu tespit edildi. Bu bulgular G1 fazında bir hücre siklusu arresti varlığını ve aracı moleküllerin Rb ve p21 olduğunu ortaya koymaktadır.

**Sonuç:** CD30 aktivasyonunun CD30+ nodal anaplastik lenfoma hücre serilerinde hücre çoğalmasında üzerindeki baskılayıcı etkilerinin zannedildiği gibi apoptoz yoluyla değil, hücre siklusunu düzenleme yoluyla olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu bulgular nodal anaplastik hücreli lenfomaların tedavisinde yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir.

**Anahtar kelimeler:** CD30, anaplastik büyük hücreli lenfoma, hücre siklusu, retinoblastoma proteini, p21

### CD30 Activation Causes Cell Cycle Arrest Of The CD30+ Anaplastic Large Cell Lymphoma Cell Lines

#### Abstract

**Aims:** CD30 activation causes growth inhibition of the systemic anaplastic large cell lymphoma cell lines. The mechanism of growth inhibition is not well characterized. Since CD30 does not have a death domain like the other tumor necrosis factor receptor superfamily members Fas and TNFR1, the mechanism of growth inhibition is a matter of controversy.

**Methods:** In this study, we analyzed the growth inhibitory effects of CD30 activation on the systemic ALCL cell line Karpas 299 by using a CD30 activating antibody HeFi-1. We first investigated the presence of apoptosis by Annexin V and propidium iodide staining using flow cytometric analysis. We did not observe any apoptotic changes or cell death during the 72 hours following CD30 activation, despite a decrease in thymidine incorporation, which prompted us to investigate the possibility of cell cycle arrest caused by CD30 activation.

**Results:** Upon synchronization of the cells and incubation with the HeFi-1 antibody, we observed a partial arrest at G1 phase demonstrated by propidium iodide staining of the permeabilized cells. We then investigated the expression of cell cycle inhibitory proteins p16, p21, p27 and retinoblastoma protein (Rb) by Western blotting. We observed expression of p21 and hypo-phosphorylation of Rb protein secondary to CD30 activation.

**Significance:** These results are consistent with cell cycle arrest in the G1 phase of the cell cycle following CD30 activation. This finding is contrary to the accepted belief that CD30 activation causes apoptosis. These findings may help the development of new therapeutic strategies against nodal anaplastic large cell lymphomas.

**Keywords:** CD30, Anaplastic large cell lymphoma, Hodgkin's disease, NF-kappaB, SN50, HeFi-1, cell cycle arrest.

CD30 molekülü, tümör nekrozis faktör reseptör ailesinin bir üyesi olup normal koşullarda az sayıda aktive B ve T hücrelerinde eksprese edilmektedir.<sup>1</sup> CD30 molekülünün fonksiyonları tamamiyle bilinmemekle birlikte bir inhibitör molekül olduğu yolundaki kanılar

gün geçtikçe güçlenmektedir. Bu kanıların en büyük dayanakları ise knock-out ve transjenik farelerle yapılan çalışmalardır.<sup>2,3</sup> Ayrıca, CD30 molekülünü eksprese eden lenfositlerin varlığı, farelerde otoimmün Tip I diyabet modelinde koruyucu bir rol oynamaktadır.<sup>4</sup> CD30

<sup>1</sup> Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, AYDIN

<sup>2</sup> Beth Israel-Deaconess Medical Center, Department of Pathology Boston MA, ABD

Hodgkin lenfoması ve anaplastik büyük hücreli lenfomalarda da tümör hücreleri tarafından eksprese edilmektedir.<sup>1</sup> CD30 aktivasyonu anaplastik büyük hücreli lenfoma hücrelerinde çoğalmayı baskılamaktadır.<sup>5-7</sup> Bu baskılamanın mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Gruss ve arkadaşları CD30 aktivasyonu sonrasında lenfoma hücrelerinde apoptotik bir yanıt gösterememişlerdir.<sup>5</sup> CD30, lenfoid hücrelerin immün yanıtın düzenlenmesi sırasında rol oynayan tümör nekrozis faktör ailesi üyeleri Fas ve TNF-reseptörü-1'nün aksine bir ölüm bölgesi (death domain) içermemektedir. Bu nedenle inhibitör etkisinin nasıl meydana geldiği bilinmemektedir.<sup>8</sup> Hücre büyümesinin baskılanması ya apoptoz yoluyla ya da hücre siklusunun yavaşlatılması veya durdurulması yoluyla olmak zorunda olduğundan CD30 molekülünün hücre siklusu üzerinde bir etkisi olup olmadığını araştırmayı uygun gördük.

p16, p21, p27, p53 ve retinoblastoma proteini (Rb) inhibitör etkileri nedeniyle hücrelerin sınırsız çoğalmalarını kontrol altına alan, hücre siklusu düzenleyicileridir.<sup>9,10</sup> Bu nedenle çalışmamızda bu proteinlerin ekspresyon ve fosforilasyon düzeylerinin değişikliklerini CD30 aktivasyonu sırasında araştırdık.

## GEREÇVEYÖNTEMLER

**Hücre Serileri:** Karpas 299 bir sistemik ALK+ anaplastik büyük hücreli lenfoma hücre serisidir.<sup>11</sup> Hücreler % 10 fetal calf serum desteğiyle büyümektedirler.

**Antikorlar ve kimyasallar:** HeFi-1 (NCI, Frederick, MD) bir fare monoklonal IgG<sub>1</sub> antikorudur.<sup>12</sup> CD30 ileti yolu üzerinde agonistik bir etkisi vardır. Fare IgG<sub>1</sub> (Caltag, Burlingame CA) izotip spesifik kontrol olarak kullanılmıştır. Aphidicolin bir hücre siklusu senkronizatörüdür (Calbiochem, La Jolla CA). Western blot, da kullanılan primer antikorlar: p21 (clone 187) p27 (F-8) ve Rb (clone IF8), (Santa Cruz, Santa Cruz CA). p16 antikor James DeCaprio, Dana Farber Cancer Institute, Boston MA tarafından hediye edilmiştir.

**<sup>3</sup>H-Thymidine assay:** Hücreler 96'lık kuyucuklarda üçerli seriler halinde büyütülmüştür. Gerekli deneysel ajanlarla inkübasyonu takiben hücreler 24-72 saat arası büyütülmüş ve kuyucuklar 1 mCi <sup>3</sup>H-thymidine ile 18 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler bir otomatik filtre sistemi ile toplanmış (PhD systems, Cambridge MA) ve radioaktivite bir sintilasyon sayacı ile ölçülmüştür (Wallac 1409, Wallac Inc. Gaithersburg MD).

**Hücre siklusu ve apoptoz için akım sitometri:** Apoptoz, hücrelerin FITC işaretli Annexin V ve propidium iodide (PI) (Boehringer Mannheim, Indianapolis IN) ile aynı anda boyanması sonrasında akım sitometrik incelenmesiyle saptanmıştır. CD30

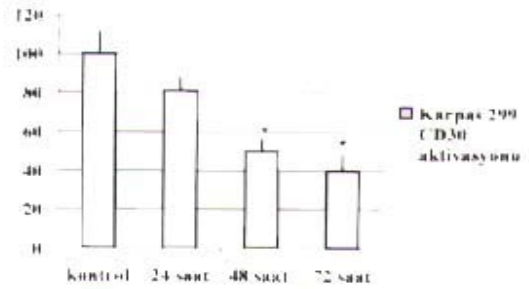
aktivasyonunun hücre siklusu üzerindeki etkilerini ölçme amacıyla hücreler G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazında Aphidicolin ile senkronize edilmiş, bunu takiben hücreler yıkanmış ve ikiye ayrılmıştır. Bir şişeye HeFi-1 antikor (1 mg/ml) diğerine ise izotip spesifik kontrol IgG eklenmiştir. 16 saat sonra hücreler permeabilize edilmiş ve DNA içeriği propidium iodide boyası ile boyanmış, bir akım sitometresi (FACScalibur, Becton Dickinson, San Jose CA) ile DNA içeriği tespit edilmiştir.

**Western blotlar:** Hücre lizatları elde edilerek protein elektroforezinde kullanılmıştır. Denature edici SDS-PAGE jelleri bir nitroselüloz membrana aktarılmış ve antikorlarla inkübe edilmiştir. Bağlanma ImmunStar kemiluminesans deteksiyon sistemi ile önerilen protokole uygun şekilde saptanmıştır (BioRad, Hercules, CA).

## SONUÇLAR

### CD30 aktivasyonuna proliferatif yanıtlar

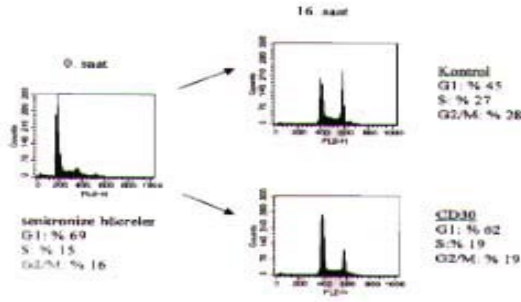
CD30 iletişim yolunun 1mg/ml HeFi-1 ile aktivasyonu nodal anaplastik büyük hücreli lenfoma hücre serisi Karpas 299'da belirgin derecede bir timidin alımı azalmasına yani çoğalma hızında azalmaya yol açtı. Kontrol olarak izotip spesifik antikorlarla inkübe edilmiş hücreler kullanıldı. Bu baskılayıcı etki 24 saatte ortaya çıkıp 48 saatte belirgin hale geldi. Ön çalışmalar sonucunda 1 mg/ml HeFi-1'in maksimum inhibitör etkisi sağlamak için yeterli olduğu tespit edildi. (Şekil 1)



**Şekil 1:** Karpas 299 hücre serisinde CD30 aktivasyonunun timidin alımına etkisi: Karpas 299 hücre serisinde CD30 aktivasyonu <sup>3</sup>H-thymidine uptake assayı ile tespit edilmiş ve sonuçlar kontrollere göre yüzde aktivite olarak ifade edilmiştir (ortalama ± SD). \*: p<0.05

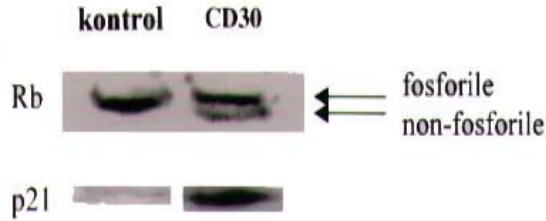
**Karpas 299'un çoğalmasının CD30 yoluyla baskılanması apoptoza değil, hücre siklusu yavaşlamasına bağlıdır:** Karpas 299 hücrelerinde apoptoz CD30 aktivasyonunu takiben 8, 24, 48 ve 72. saatlerde Annexin V boyası ve trypan mavisi boyaması ile tespit edildi. Thymidine alımında bir azalmaya rağmen

apoptoz tespit edilememesi nedeniyle hücre siklusuna bakıldı. Bu amaçla hücreler Aphidicolin ile senkronize edildi. Senkronizasyon kısmen başarılı oldu. Kısmi senkronizasyon zamanı 0 zaman olarak belirlendi. Bu anda G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazındaki hücre oranı %69; G<sub>2</sub>/M ise % 16 idi. Bu ölçüm yapıldığında hücreler yıkanıp iki gruba ayrıldı ve bir gruba % 10 serum değerine serum yanında HeFi-1 eklendi. CD30 aktive Karpas 299 hücreleri G<sub>1</sub> ötesine geçmede bariz bir gecikme gösterdiler (Şekil 2).



**Şekil 2.** CD30 aktivasyonu sonrası gözlenen hücre siklusu arresti: Senkronizasyon sonrası hücreler iki gruba ayrılmış ve 16. saatte her iki grubun çeşitli hücre fazlarındaki oranları tespit edilmiştir.

16. saatte, kontrol hücrelerin % 45'i G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> da, % 28'i ise G<sub>2</sub>/M fazındaydı. CD30 aktive hücrelerin ise % 62'si G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazında; % 19'u ise G<sub>2</sub>/M fazındaydı. Bu veriler yaklaşık yüzde ellilik bir inhibisyona karşılık gelmektedir. Bu ise timidin alımındaki azalmayı açıklayabilmektedir.



**Şekil 3.** CD30 aktivasyonu sonrası Karpas 299 hücre serisinde Rb protein ve p21: Senkronizasyon sonrası hücreler ikiye ayrılmış ve Western blotlar 0 ve 40. saatlerde elde edilen total hücre lizatlarında yapılmıştır. 40. saatte kontrol grubunda bütün retinoblastoma proteini fosforile formdadır, yani inaktiftir. CD30 aktive hücrelerde ise 40. Saatte bir miktar unfosforile Rb proteini mevcuttur. p21 ise kontrol hücrelerde eksprese edilmemekte ancak CD30 aktivasyonu sonrasında bir ekspresyon gözlenmektedir.

**Rb ve p21, in Western blot analizi:** CD30 aktivasyonunun hücre siklusu üzerindeki inhibitör etkilerini daha iyi anlayabilmek amacıyla hücre siklusu inhibitör proteinleri p16, p21, p27 ve Rb düzeyleri Western blot ile incelendi. Hücre protein lizatlarının elde edilmesinde yukarıda açıklanan senkronizasyon protokolleri uygulandı. Lizatlar 0, 20 ve 40. saatlerde toplandı. Non-fosforile Rb düzeyleri CD30 aktive Karpas 299 hücrelerinde 40. saatte bir artma gösterdi. Aynı zaman diliminde kontrol Karpas 299 hücrelerinde tamamen fosforile Rb gözlemlendi (Şekil 3). Benzer şekilde 40. saatte kontrol hücreler p21 eksprese etmezken CD30 aktive Karpas 299 hücreleri yüksek düzeyde p21 eksprese ettiler (Şekil 3). p16 ve p27 ekspresyonu hiçbir zaman diliminde gösterilemedi. Tümörlerde bu iki protein yaygın olarak ekspresyonlarını kaybedebilmektedirler. Rb fosforilasyonu, hücre siklusunun G<sub>1</sub> kontrol noktasından ileri geçebilmesinde en önemli düzenleyicidir. p21 ekspresyonunun artması ve Rb hipofosforilasyonu CD30'un baskılayıcı rolünü gösteren güçlü kanıtlardır.<sup>9,10</sup>

## TARTIŞMA

CD30/CD30 ligand ileti yolunun temel fonksiyonunun hücre çoğalmasını baskılamak olduğuna işaret eden bir çok kanıt vardır. Ancak *in vitro* çalışmalarda çok farklı sonuçlar elde edilmektedir. En sık gözlenen etki ise sistemik anaplastik büyük hücreli lenfomalar üzerindeki inhibitör etkidir.<sup>5</sup> Bu çalışmada CD30 aktivasyonunun bir CD30+, ALK+, sistemik lenfoma hücre serisi Karpas 299 üzerindeki etkilerini araştırdık. Temel stratejimiz büyüme inhibisyonunun doğasını araştırmaktır. Çalışmalarımız, CD30 aktivasyonu ile Rb tarafından düzenlenen bir G<sub>1</sub> fazı yavaşlaması meydana geldiğini ortaya çıkarmıştır. Bilindiği gibi Rb proteini fosforile iken aktif değildir. Fosforile olmayan formu ise siklin D1'i bağlayarak hücre siklusunun G<sub>1</sub> noktasından ileri geçmesini engeller. CD30 aktivasyonu sonrasında Rb proteininin fosforilasyonunda azalma görülmesi, CD30 aktivasyonu sonrasında hücre siklusu üzerinde baskılayıcı bir etkinin ortaya çıktığını çok sağlam kanıtlarla ortaya koymaktadır. p21 aktivasyonu ise p53 proteini üzerinden hücre siklusu üzerinde bir yavaşlama, bazen de apoptoz meydana getirebilir.<sup>9,10</sup>

CD30 aktivasyonu ile apoptoz yerine hücre siklusunda yavaşlama ortaya çıkması daha önceki bazı çalışmalarla tezat teşkil ediyor gibi görünmektedir. Ancak bu çalışmalara baktığımızda hiçbirinin apoptozun varlığını doğrudan gösteremediğini, daha çok indirekt verilerle apoptoz oluştuğunun varsayıldığını gözlemekteyiz.<sup>5,13</sup> Tian ve arkadaşları ise ancak 5 günlük bir inkübasyon sonunda apoptoz tespit etmişlerdir.<sup>6</sup> Biz çalışmamızda 8 ila 72 saat arasında apoptoz tespit edemedik. Ancak timidin alımında 24 saatten itibaren

bir azalma gözledik. Benzer bir durum Tian ve arkadaşlarının çalışmasında da mevcuttur. Bu nedenle geç evrede apoptotik bir yanıt görülüyor olabilsede, timidin alımında erken dönemde başlayan yavaşlamanın daha çok hücre siklusundaki yavaşlamadan olduğunu düşünmekteyiz.

Hücre siklusunda CD30 aracılığıyla oluşan yavaşlamanın mekanizması tam belli değildir. Bu etki TRAF moleküllerinin direkt bir etkisiyle veya TRAF tarafından aktive edildiği bilinen JNK ve NF-kB iletişim sistemleri yoluyla meydana geliyor olabilir.<sup>14-17</sup> CD30 aktivasyonunun NF-kB aktivasyonuna yol açtığını, ancak bu aktivasyonun selektif NF-kB inhibitörleriyle engellenmesinin hücre büyümesinde görülen yavaşlamayı ortadan kaldıramadığını, bu nedenle siklustaki yavaşlamanın NF-kB'ye bağlı olamayacağını düşünmekteyiz (yayınlanmamış çalışmalar). Ön çalışmalarımızda JNK aktivasyonu hücre çoğalmasıyla direkt bir paralellik göstermediğinden bu mekanizmanın da CD30 aktivasyonuna bağlı hücre inhibisyonunu açıklamaktan uzak olduğunu düşünüyoruz.

CD30 ile görülen inhibisyonun mekanizmasının daha detaylı araştırılmasına gereksinim vardır. Bu mekanizmanın anlaşılması ile yeni antikanser ajanların CD30 eksprese eden lenfoma türlerinde kullanıma geçmesi mümkün olabilir. Buna bir örnek olarak CD30 aktive edici ajanların NF-kB inhibitörleriyle kombine kullanılmasını verebiliriz.<sup>18</sup>

#### KAYNAKLAR

1. Falini B, Pileri S, Pizzolo G, Durkop H, Flenghi L, Stirpe F, Martelli MF, Stein H. CD30 (Ki-1) molecule: a new cytokine receptor of the tumor necrosis factor superfamily as a tool for diagnosis and immunotherapy. *Blood* 1995; 85 : 1-14.
2. Amakawa R, Hakem A, Kundig TM, Matsuyama T, Simard J, Timms E, Wakeham A, Mittrucker HW, Griesser H, Takimoto H, Schmits R, Shahinian A, Ohashi PS, Penninger JM, Mak TW. Impaired negative selection of T cells in Hodgkin's disease antigen CD30-deficient mice. *Cell* 1996; 84: 551-62.
3. Chiarle R, Podda A, Prolla G, Podack ER, Thorbecke GJ, Inghirami G: CD30 overexpression enhances negative selection in the thymus and mediates programmed cell death via a Bcl-2 sensitive pathway. *J Immunol* 1999; 163: 194-205.
4. Kurts C, Carbone FR, Krummel MF, Koch KM, Miller JFAP, Heath WR Signaling through CD30 protects against autoimmune diabetes mediated by CD8 T cells. *Nature* 1999; 398: 341-4.
5. Gruss HJ, Boiani N, Williams DE, Armitage RJ, Smith CA, Goodwin RG. Pleiotropic effects of the CD30 ligand on CD30-expressing cells and lymphoma cell lines. *Blood* 1994; 83: 2045-56.
6. Tian SG, Longo DL, Funakoshi S et al. In vivo antitumor effects of unconjugated CD30 monoclonal antibodies on human anaplastic large cell lymphoma. *Can Res* 1995; 55: 5335-41.
7. Pfeifer W, Levi E, Petrogiannis-Haliois T, Lehmann L, Wang ZX, Kadin ME. A murine xenograft model for human CD30+ anaplastic large cell lymphoma: successful growth inhibition with an anti-CD30 antibody (HeFi-1). *Am J Pathol* 1999; 155: 1353-9.
8. Horie R, Watanabe T. CD30: expression and function in health and disease. *Seminars in Immunol* 1998; 10: 457-70.
9. Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 295-312.
10. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; 13: 1501-12.
11. Fischer P, Naheva E, Mason DY, Sherrington PD, Hoyle C, Hayhoe FG, Karpas A. A Ki-1 (CD30)-positive human cell line (Karpas 299) established from a high-grade non-Hodgkin's lymphoma, showing a 2;5 translocation and rearrangement of the T-cell receptor  $\beta$ -chain gene. *Blood* 1988; 72: 234-40.
12. Hecht TT, Longo DL, Cossman J et al. Production and characterization of a monoclonal antibody that binds Reed-Sternberg cells. *J Immunol* 1985; 134: 4231-36.
13. Smith CA, Gruss HJ, Davis T et al. CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. *Cell* 1993; 73: 1349-60.
14. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-71.
15. Duckett CS, Thompson CB. CD30-dependent degradation of TRAF2: implications for negative regulation of TRAF signaling and the control of cell survival. *Genes & Development*. 1997; 11: 2810-21.
16. Song HY, Regnier CH, Kirschning CJ, Goeddel DV, Rothe M. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-kB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *PNAS* 1997; 94: 9792-6.
17. Sonenshein GE. Rel/NF-kB transcription factors and the control of apoptosis. *Seminars in Cancer Biology* 1997; 8: 113-9.
18. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG et al. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; 281: 1680-3.

#### YAZIŞMA ADRESİ

Dr. Edi Levi  
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Patoloji Anabilim Dalı AYDIN

Geliş Tarihi : 25.04.2000

Kabul Tarihi : 09.06.2000