

İlaç Dirençli Meme Kanseri Hücre Hatlarında Protein Kinaz D2 İfadesinin Dirençliliğe Etki Mekanizmalarının İncelenmesi

Proje No: 112T714

Prof.Dr. Ufuk GÜNDÜZ

Dr. Serap YALÇIN

MART 2014

ANKARA

ÖNSÖZ

Kanserde ilaç dirençliliği, kanser tedavisinde en yaygın olarak yöntem olan kemoterapinin önünde ciddi bir engeldir. Tümörlü bölgede en başından beri var olan ya da kemoterapi ile birlikte gelişen ilaç dirençliliği mekanizmalarının bir kısmı ortaya çıkarılmıştır; ancak bilinen mekanizmalar dışında hücre yaşamı için önemli olan diğer faktörlerin de ilaç dirençliliğini dolaylı ya da doğrudan etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu kapsamda, özellikle meme kanser örneklerinde ve hücre hatlarında ifade edildiği ve bu tür kanser hücrelerinin büyümesinde önem arz ettiği gösterilen protein kinaz D üyelerinin de kemoterapi etkinliğinde rolleri olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda laboratuvarımızda geliştirilen ilaç dirençli MCF7 hücre hatlarında protein kinaz D2 gen ifadesi siRNA ile susturularak bunun ilaç dirençliliğine ve apoptoza etkisi incelenmiştir. Çalışmamız 112T714 kodu ile TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek programı kapsamında desteklenmiştir. Bu çalışmanın gerçekleşebilmesi için destek veren TÜBİTAK TBAG Grubu'na teşekkürlerimizi sunarız.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	3
GRAFİK, ŞEKİL ve TABLO LİSTESİ	5
1. Giriş ve Genel Bilgiler	8
1.1. Meme Kanseri ve Tedavisi	8
1.2. Çoklu İlaç Dirençliliği	8
1.3. Protein Kinaz D Ailesi.....	10
1.3.1. Yapısal Özellikler.....	10
1.3.2. PKD Aktivasyonu.....	10
1.3.3. PKD'nin Fizyolojik Rollerini.....	10
1.3.4. PKD ve Kanseri Hücrelerindeki Çoğalma, Apoptozdan Kaçma, İlaç Dirençliliği İlişkisi.....	11
2. Gereç ve Yöntem	14
2.1. Hücre kültürü	14
2.1.1. Hücre hatları.....	14
2.1.2. Hücre kültürlerinin pasajlanması.....	14
2.2. Gen ifade analizi.....	14
2.2.1. RNA izolasyonu.....	14
2.2.2. DNaz I muamelesi.....	14
2.2.3. cDNA sentezi	15
2.2.4. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR).....	15
2.3. Protein izolasyonu ve Western blot.....	16
2.3.1. Total protein izolasyonu	16
2.3.2. Bradford assay.....	16
2.3.3. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	16
2.3.4. Proteinlerin jelden nitroselüloz zara transferi	17
2.3.5. Bloklama, primer ve seconder antikor muamelesi, kemiluminesans görüntüleme.....	17
2.4. siRNA transfeksiyon optimizasyonu	17
2.5. siRNA transfeksiyonu	17
2.5.1. Altı kuyulu plakada transfeksiyon	17
2.5.2. Doksan altı kuyulu plakada transfeksiyon.....	18

2.6.	PKD2 gen ifadesinin susturulmasından sonra mRNA ve protein düzeylerinin incelenmesi	18
2.7.	XTT analizi	19
2.8.	qPCR analizi.....	19
3.	Bulgular	20
3.1.	qPCR için primer optimizasyonu	20
3.2.	Hücre hatlarında PKD2 ifadesinin belirlenmesi	20
3.3.	Transfeksiyon etkinliği.....	21
3.4.	PKD2 susturulmasının gösterilmesi.....	22
3.4.1.	mRNA düzeyinde	22
3.4.2.	Protein düzeyinde	23
3.5.	PKD2 susturulmasının ilaç dirençliliğine etkisi (XTT Hücre Büyümesi Analizi).....	23
3.6.	PKD2 susturulmasının ilaç dirençliliği ve apoptoz ile ilişkili genlerin ifadelerine etkisi.....	26
4.	Tartışma ve Sonuç.....	27
5.	Kaynakça	30
6.	Ekler	33
6.1.	cDNA Sentezinde Kullanılan RNA'ların Miktarları ve Safılıkları.....	33
6.2.	Elde Edilen RNA'ların Sağlamlığı	33
6.3.	qPCR reaksiyon detayları.....	34
6.4.	Bradford assay	34
	PROJE ÖZET BİLGİ FORMU	35

GRAFİK, ŞEKİL ve TABLO LİSTESİ

Grafik 1: Sayılan hücre hatlarında <i>PKD2</i> mRNA ifadesi	20
Grafik 2: MCF7/DOX hücre hattında transfeksiyon optimizasyonu	22
Grafik 3: MCF/ETO hücre hattında transfeksiyon optimizasyonu	22
Grafik 4: <i>PKD2</i> susturulmasının MCF7/DOX ve MCF7/ZOL hücrelerinde mRNA düzeyinde validasyonu ..	23
Grafik 5: MCF7/DOX hücrelerinde transfeksiyonun ilaç dirençliliğine etkisi	24
Grafik 6: 5-FU'nun MCF7/ZOL ve MCF7 hücrelerindeki sitotoksitesi.....	25
Grafik 7: 5-FU'nun <i>PKD2</i> 'nin susturulduğu MCF7/ZOL hücrelerindeki sitotoksik etkisi.	25
Grafik 8: <i>PKD2</i> 'nin MCF7/DOX hücrelerinde susturulmasının ilaç dirençliliği ve apoptoz ile ilişkili gen ifadelerine etkisi.....	26
Grafik 9: Bradford assay standart eğrisi	34
Şekil 1: Taranan hücre hatlarında <i>PKD2</i> protein ifadesi	21
Şekil 2: MCF7/DOX hücrelerinde <i>PKD2</i> susturmasının protein düzeyinde tespiti	23
Şekil 3: Elde edilen RNA'ların sağlamlığını gösteren temsili jel fotoğrafı	33
Şekil 4: İncelenen genlere ait PCR ürünlerinin agaroz jel fotoğrafları	34
Tablo 1: cDNA sentez yöntemi	15
Tablo 2: qPCR'de kullanılan primer çiftleri	15
Tablo 3: qPCR reaksiyon şartları.....	20
Tablo 4: Meme kanseri hücre hatlarının sınıflandırılması.	28
Tablo 5: Elde edilen RNA'ların derişimleri ve saflıkları	33

ÖZET

Kemoterapi, günümüz kanser tedavisinde en çok başvurulan tedavi yöntemidir. Kanser hücrelerinin, hızlı bölünme gibi karakteristik özelliklerini hedefleyecek şekilde tasarlanmış olan kimyasal ajanlar kemoterapinin temel bileşenidir. Bu ajanlar pek çok açıdan etkili olabilmesine rağmen vücuda sistemik olarak uygulanmaları nedeniyle yan etkiye ortaya çıkabilmekte, hasta ikincil sağlık sorunları yaşayabilmektedir. Kemoterapinin bir diğer sorunu da tümörün kullanılan ilaca karşı dirençli olması ya da belli bir süre sonra direnç kazanmasıdır. Belirli bir ilaca karşı olan dirençlilik, kimi zaman yapısal ve işlevsel olarak farklı olan diğer ajanlara karşı da görülebilmektedir. Çoklu ilaç dirençliliği olarak tanımlanan bu durum, diğer kemoterapi seçeneklerinin de başarısızlığına yol açabilmektedir.

Çoklu ilaç dirençliliği pek çok farklı yolla gerçekleşebilmektedir: ilaç dirençli tümörlerde ilacı hücre dışına pompalayan ABC taşıyıcı proteinlerin fazla ifade edilmesi, hücrenin ilaçla gelen stresi algılayan sensör sistemlerin ya da apoptoz başlatıcı sistemlerin devre dışı kalması çoklu ilaç dirençliliğine yol açabilmektedir. Protein kinaz D, yakın zamanda ortaya çıkarılan bir serin/treonin protein kinaz ailesidir. Üç izoformdan oluşan PKD grubu kinazlar, doku tipine bağlı dağılım göstermekte olup; bazen benzer bazen de karışık görevler üstlenebilmektedirler. Çeşitli doku tiplerinde ve hücre hatlarında PKD2'nin proliferasyonu destekleyici, apoptozu engelleyici rolleri ortaya çıkarılmış; ilaç dirençliliği ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada, PKD2 ifadesi, MCF7 meme adenokarsinomu hücre hattının üç farklı ilaç dirençli türeğinde incelenmiş; PKD2'nin sözkonusu ilaçlara dirençlilikteki etkisi ve mekanizması saptanmaya çalışılmıştır.

Çalışmada MCF7'nin ilaç dirençli türevlerinde PKD2'nin ifadesi mRNA ve protein düzeyinde incelenmiş; tüm hatların yakın düzeylerde PKD2 ifade ettiği saptanmıştır. PKD2'nin ilaç dirençliliğinde doğrudan bir etkisinin olup olmadığını anlamak için, ilaç dirençli MCF7 türevlerinde PKD2 ifadesi siRNA ile susturulmuştur. PKD2, mRNA ve protein düzeyinde etkin bir şekilde susturularak, farklı ilaç dozlarında ilaç dirençliliğine etkisi denenmiştir. PKD2'nin susturulmasının doksorubisin, etoposid ve zoledronik asit dirençli MCF7 hatlarında ilaç dirençliliğine anlamlı bir etkisi olmamıştır. Ayrıca, PKD2'nin susturulduğu MCF7/DOX hücrelerinde, daha önce ilaç dirençliliği ile ilişkilendirilen ve PKD üyeleri tarafından kontrol edilebileceği düşünülen MDR1, cFLIP, Survivin ve PUMA ifadelerinde anlamlı değişim gözlenmemiştir.

Anahtar kelimeler: Protein kinaz D2, çoklu ilaç dirençliliği, apoptoz, MCF7

ABSTRACT

Chemotherapy is the most commonly applied therapy option against various types of cancer. Various, well-stated chemical agents that target the characteristics of a cancer type such as uncontrolled cell growth are the components of for chemotherapy applications. Although these agents are potent in many aspects, since they are applied systemically to the body, they can cause serious side effects. Second problem with the chemotherapy is the resistance against the drug that exists intrinsically or develops de novo in the tumor. In general, tumor can simultaneously be resistant to drugs that differ in structure and function, a phenomenon that is known as multidrug resistance.

Multidrug resistance can arise in various ways. Overexpression of ABC type drug effluxing pumps and dysregulation of stress-sensing systems and apoptosis-initiating systems can cause multidrug resistance. Protein kinase D (PKD) is a family of serine/threonine kinase that was reported in recent years. PKD family has three members (PKD1, PKD2, PKD3) and the isoforms can show tissue-specific expression and adopt redundant or specific functions. Including breast carcinoma, PKD2 is expressed in various tissues and reported to have proliferative, anti-apoptotic and invasion-promoting roles. It was also associated with multidrug resistance. In this study, effect of PKD2 expression on the drug resistance of three drug resistant MCF7 variants was studied.

Screening results showed that drug resistant sublines and parental MCF7 cell line expressed PKD2 in similar levels. In order to see the effect of PKD2 on drug resistance, PKD2 was knocked down in doxorubicin, etoposide and zoledronic acid resistant MCF7 sublines (MCF7/DOX, MCF7/ETO, MCF7/ZOL). It was shown that knocking down PKD2 does not change the resistance in MCF7/DOX MCF7/ETO and MCF7/ZOL. Also, expression of apoptosis related genes that are thought to be regulated by PKD members as well as the expression of transporter protein MDR1 are not affected by PKD2-knockdown in MCF7/DOX cells.

Key words: Protein kinase D2, multidrug resistance, MCF7

1. Giriş ve Genel Bilgiler

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve vücudun farklı bölgelerine yayılması şeklinde tanımlanan, değişik dokularda ortaya çıkabilen bir dizi hastalığın ortak adıdır (Becker, 2006; Urfali, 2012; Kaplan & Gündüz, 2012). Kanser; tütün, kimyasallar, radyasyon nedeniyle meydana gelen mutasyonlar; hormonal bozukluklar, bağışıklık sistemi düzensizliği gibi sebeplerle ortaya çıkar. Dünya Sağlık Örgütü istatistiklerine göre 2008 yılında dünya çapında en önemli ölüm sebeplerinden birisi %13'lük oranla kanserdir[<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-031941.pdf>]. Sağlık Bakanlığı verilerine göre 2000-2006 yılları arasındaki araştırmalar Türkiye’de 396 bin kanser vakası bulunduğu ve her yıl 140 bin kanserden ölüm gerçekleşmektedir. Ülkemizde akciğer ve bronş kanseri en çok rastlanan kanser türü olup; bunu prostat, deri ve meme kanseri izlemektedir. İstatistiklere göre kadınlarda en sık rastlanan kanser türü meme kanseridir [<http://www.saglik.gov.tr/TR/dosya/1-72577/h/saglikistatistikleriyilligi2010.pdf>].

1.1. Meme Kanseri ve Tedavisi

Meme kanseri genellikle süt bezlerinde ya da kanallarında oluşur. Malignant tümörlerdeki hücreler çevredeki sağlıklı dokuya ve lenf düğümlerine girerek yayılır ve kana geçer (Kaplan & Gündüz, 2012). Meme kanserinde; cinsiyet, yaş, etnik köken, meme dokusunun yoğunluğu, BRCA1 ve BRCA2, PTEN, P53, CHEK2 mutasyonları, ailedeki meme kanseri geçmişi, menopoza takip eden hormon terapisi, çocuk sahibi olma durumu, alkol kullanımı ve şişmanlık gibi faktörler risk oluşturmaktadır [Urfali, 2012; Kaplan & Gündüz, 2012; <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>].

Meme kanseri, tümör tipi (benign ya da malignant), boyutu, yeri, tümör evresi, hormon statüsü, hasta yaşı, genel sağlık durumuna göre ameliyat, radyoterapi, hormon terapisi ve kemoterapi yöntemlerinden biri veya birkaçı ile tedavi edilir (Urfali, 2012; Kaplan & Gündüz, 2012). Temel anlamda sitotoksik ajanlar kullanarak kanserli hücreleri yok etmeyi amaçlayan kemoterapi, tedavi sürecinin farklı noktalarında farklı amaçlar için uygulanabilir.

Meme kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapi ajanlarına siklofosamid, epirubisin, mitozantron, doksorubisin, dosotaksel, etoposid, zoledronik asit ve gemitabin örnek verilebilir ve bu ajanlar genellikle kombinasyon halinde kullanılır. Bu ilaçlar arasında son yıllarda kullanılmaya başlanan zoledronik asit, genelde kemik metastazını önlemeyi amaçlar. Tümörün tipi, derecesi, kemoterapi geçmişi kemoterapi rejimini belirleyen önemli faktörlerdendir (Urfali, 2012; Kaplan & Gündüz, 2012).

Kemoterapi uygulamaları pek çok açıdan başarılı olsa da en temel sorunları normal hücrelerin etkilenmesi nedeniyle oluşan yan etkileri ve hücrelerde zamanla gelişen ya da baştan beri var olan ilaç dirençliliğidir. Yapı ve işlevleri farklı ilaçlara karşı oluşan dirençlilik çoklu ilaç dirençliliği olarak adlandırılmakta; bu durum kemoterapi uygulamaları için ciddi sorun teşkil etmektedir.

1.2. Çoklu İlaç Dirençliliği

Kanser biyolojisindeki son gelişmelere ve hastalığın moleküler mekanizmalarının anlaşılmasında katedilen mesafeye rağmen, geleneksel kemoterapi uygulamaları halen en geçerli yöntem olarak

durmaktadır. Pek çok açıdan başarılı bulunan bu uygulamaların etkinliğini kısıtlayan en önemli olgu ise bu ajanlara karşı gelişen dirençliliğidir (Basu, 2010).

İlaç dirençliliği, temel olarak, kemoterapötik ajanların beklenen anti-tümör etkinliği sağlayamamasıdır. Bu noktada, farklı türde anti-kanser ilaç kullanımıyla bu engelden kurtulunabileceği düşünülse de kanser hücreleri yapısal ve işlevsel olarak birbirinden farklı olan ilaçlara karşı -daha önce hiç maruz kalmamış olsalar dahi- dirençli olabilirler. Bu olgu çoklu ilaç dirençliliği olarak tanımlanır ve kanser hastalarının yüzde doksananın tedavisindeki başarısızlığın nedenidir (Urfali, 2012; Longley & Johnston, 2005). Doksorubisin, daunorubisin gibi antrasiklinler; vincristin ve vinblastin gibi mikrotübülleri hedefleyen vinka alkaloidleri; etoposid gibi topoizomeraz inhibitörleri ile paklitaksel gibi taksan grubu ilaçlar çoklu ilaç dirençliliğine yol açabilen anti-kanser ajanlardır (Basu, 2010).

Çoklu ilaç dirençliliği, farklı mekanizmalarla ortaya çıkabilir. Bunlardan en önemli olanı, hücreye alınan anti-kanser ajanların hücre zarında bulunan özel taşıyıcı proteinlerle dışarı atılmasıdır. Bugüne kadar keşfedilen en geniş zar proteini ailesi "ATP bağlama kaseti (kısaca "ABC") taşıyıcı proteinleri" grubuna ait olan bu özel proteinler, birer pompa görevi üstlenerek hücreye alınan ilacı hücre dışına atar ve böylece ilacın hücrede birikerek toksik etkisini göstermesini engellerler. Evrimsel olarak da korunmuş olan bu zar proteinleri, normal hücrelerde de ifade edilmekte ve hormon, yağ ve toksin taşınmasında rol üstlenmektedir (Scotto, 2003).

Otuz yıl kadar önce keşfedilen P-glikoprotein (P-gp), ABC grubu taşıyıcı proteinlerin ilk üyesidir. İnsanda MDR1 (ABCB1) geni tarafından kodlanan ve 170 kDa büyüklüğünde bir gliko-protein olan P-gp, bugüne kadar en iyi karakterize edilen ABC grubu taşıyıcı proteindir [12]. P-gp ile benzer yapıdaki MRP 1-6, MRP8, BCRP genlerinin ürünleri olan ABC grubu taşıyıcı proteinler de ilaçların hücre dışına atılmasında rol oynamaktadırlar (Doyle & Ross, 2003; Gottesman, Fojo, & Bates, 2002).

Daha önceki çalışmalarda MCF7 ve diğer hücre hatlarında doksorubisin ve paklitaksel dirençliliğinin MDR1; zoledronik asit dirençliliğinin BCRP (ABCG2); etoposid dirençliliğinin de MDR1 ve MRP1 (ABCC1) ile gerçekleşebildiği ya da desteklendiği gösterilmiştir (Scotto, 2003; Urfali, 2012). İlaç dirençliliğinin sözkonusu proteinlerin ifadesinde artışa nasıl sebep oldukları tam olarak bilinmemekle birlikte pek çok veri bu artışın hücrede önemli roller üstlenen sinyal yolları tarafından, transkripsiyon düzeyinde gerçekleştiği fikrini desteklemektedir (Davis et al., 2003; Scotto, 2003; Weinstein-Oppenheimer et al., 2001; Zhou et al., 2006). Protein kinaz D (PKD) izoformlarının da sözkonusu yollarla ilişkili olduğu düşünülmektedir. PKD ailesinin ABC transporter ifadesinde işlevsel olabileceği bazı çalışmalarda rapor edilmiştir. Çoklu ilaç dirençliliğinin diğer önemli mekanizmalarından birisi olan apoptoz yollarının engellenmesinde (Gottesman et al., 2002) de PKD ailesinin rolü olabileceği yönünde kanıtlar mevcuttur. Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda MCF7 hücre hattında en fazla ifade edilen PKD izoformu PKD2'nin ifade düzeyi ve aktivitesinin ilaç dirençliliğindeki etkisi araştırılacaktır. Bu çalışma sonucunda elde edilecek veriler, ilerideki daha detaylı çalışmalar için yol gösterici olacaktır.

1.3. Protein Kinaz D Ailesi

Serin/treonin protein kinaz grubundan olan protein kinaz D ailesi, insanda PKD1, PKD2 ve PKD3 izoformlarından oluşur. Bu aile, katalitik bölgesinin "Ca²⁺/Kalmodulin (Cam) ile regule edilen protein kinaz grubu" ile benzeşmesi nedeniyle bu grup dahilinde sınıflandırılmıştır (Storz, 2012).

1.3.1.Yapısal Özellikler

Tıpkı protein kinaz C üyeleri gibi PKD üyeleri de hücredeki önemli sekonder mesajıcılardan olan diaçilgliserole (DAG) ve tümör promotörü olarak bilinen forbol esterlere bağlanabilir ve aktivasyonları da büyük ölçüde bu yolla kontrol edilir. Yapısal anlamda birbirlerine çok benzeşen PKD üyeleri, temel olarak karboksil kısımlarında bulunan katalitik bölge ve amino kısmında bulunan düzenleyici bölgelerden meydana gelir. Her üç üyenin de amino ucunda CRD (cysteine rich domain-sistince zengin bölge) bulunur. Bu kısım proteinin hücre zarındaki DAG moleküllerine bağlanmasını sağlar; proteini hücre zarına yönlendirir. Amino ucu ve karboksil ucu arasında plekstrin homoloji (PH) bölgesi bulunur. Bu bölgenin proteinler arası etkileşimde etkin olduğu bilinmektedir. PKD üyelerinin çekirdekten çıkmasında ve diğer kinazlarla etkileşiminde de rol oynadığı belirlenmiştir. Katalitik bölge ise substrat proteinlerin fosforlanmasında ve proteinin diğer kinazlarca aktive edilmesinde rol almaktadır (Rozenfurt, Rey, & Waldron, 2005; Storz, 2012).

1.3.2.PKD Aktivasyonu

PKD aktivasyonu için iki model öne sürülmüştür: Bunların birincisinde diaçilgliserole bağlanma ve bunu izleyen fosforlanmalar gereklidir. Fosforlanan kritik amino asitler PH bölgesinde yer alan tirozin ya da katalitik bölgedeki bazı serinlerdir. Fosforile edilen amino asitler dolayısıyla fosforilasyonu gerçekleştiren kinazların türü, uyarıcı moleküle bağlıdır. Bu çeşitlilik PKD üyelerinin hücre içindeki dağılımında ve aktivitelerinde farklılık yaratır (Steinberg, 2012). PKC'ye dayalı olmayan ikinci aktivasyon modelinde ise: oksidatif stres durumunda, Src ve Abl gibi tirozin kinazların PH bölgesindeki tirozini fosforile etmesi ve mitokondride diaçilgliserol oluşturulmasıyla PKD bu organelere yönelir ve orada yine diaçilgliserol ile yönlendirilen PKC ile etkileşir. Tüm PKD'lerin karboksil ucunda yer alan serin ise oto-fosforilasyona uğrar; böylece protein tamamen aktif hale gelir (Rozenfurt et al., 2005; Steinberg, 2012; Storz, 2012).

Hücreyi etkileyen sinyalin türü ve PKD'yi kontrol eden kinaz çeşidi hem PKD'lerin aktivitesini hem de hücre içi yerleşimini belirlemektedir. PKD aktivasyonu süren sinyal yollarının başında büyüme faktörü sinyalleri, G-proteine bağlı reseptör sinyalleri, RhoGTPazlar, oksidatif stres sinyalleri gelmektedir (Storz, 2012).

1.3.3.PKD'nin Fizyolojik Roller

Protein kinaz D ailesinin pek çok farklı hücresel olayı kontrol ettiği çeşitli hücre hatlarında ve fare modellerinde gösterilmiştir. Bunlar arasında hücre çoğalması, apoptoz, hücre içi taşıma, inflamasyon, hücre iskeletinin kontrolü, angiogenez, hücre hareketi ve hücre kutuplaşması sayılmaktadır. Protein kinaz D ailesi üyelerinin fizyolojik rollerinin ortaya çıkarılmasına yönelik çalışmalar sürmekle birlikte, şimdiye kadar ağırlıklı PKD1 izoformuna verilmiştir. Üç izoformun da homolog katalitik bölgeleri bulunmasına rağmen, hücre içi dağılımında, ifade düzeyinde ve aktivite kontrollerinde farklılık göstermektedirler. Bazı

çalışmalar, PKD1 ve PKD2 izoformlarının fonksiyonel olarak birbirleri yerine geçebileceği; PKD3'ün ise daha farklı roller üstlendiğini göstermektedir (Rozengurt et al., 2005; Storz, 2012).

Protein kinaz D ailesinin özellikle PKD1 ve PKD2 üyelerinin üstlendikleri roller itibariyle kanserle yakından ilgili olabileceği düşünülmektedir.

1.3.4. PKD ve Kanserli Hücrelerindeki Çoğalma, Apoptozdan Kaçma, İlaç Dirençliliği İlişkisi

Yukarıda da belirtildiği gibi, çoğalma, stres durumlarında hayatta kalma, apoptoz gibi hücrel olaylarla ilişkili olduğu gösterilen PKD ailesi enzimlerin, kanser ile ilişkili bulunması şaşırtıcı değildir. Pek çok çalışmada PKD ailesi kinazların doğrudan ya da dolaylı olarak kanser gelişimini düzenlediği saptanmıştır (Storz, 2012). PKD sinyal yolağının etkin olduğu düşünülen kanser tiplerinin başında akciğer, sindirim sistemi ve meme kanserleri gelmektedir.

Pankreas kanseri model hücre hattı PANC-1 de yapılan çalışmada nörotensin büyüme faktörünün etkisini PKC/PKD sinyal yolağıyla sağladığı gözlenmiştir. PKD'nin fazla ifade edildiği PANC-1 hücrelerinde DNA sentezinde, hücre çoğalmasında ve yüzeye tutunmaksızın çoğalmada artış saptanmıştır. Ayrıca ilaç dirençli pankreas adenokarsinoma hücre hatlarında PKD'nin fazla ifade edildiği bulunmuştur. Ayrıca, gankreas kanseri hücre hatlarında gemcitabin dirençliliğine neden olan Hsp27 bir PKD substratıdır (Rozengurt, 2012).

PKD ailesinin meme kanseri hücrelerindeki rolleri bir miktar tartışmalıdır. Çelişkili bulunan sonuçların tümör derecesiyle ilişkili olabileceği düşünülse de kesin çıkarımlar yapılamamaktadır. Örneğin invaziv meme kanserlerinde, hücre hareketinde rol alan hücre zarı uzantılarında PKD ifadesine rastlanmıştır ve PKD'nin bu kısımlarda görev alan kortaktin ve paksilin gibi proteinler ile kompleks oluşturduğu saptanmıştır. Bu tarz komplekslere invaziv olmayan meme kanseri hücrelerinde rastlanmaması, PKD ifadesinin, kanserin agresiflik derecesiyle doğru orantılı olabileceği sonucunu vermektedir. Ancak, başka bir çalışmada PKD ifadesinin azalmasının meme kanserinin malign potansiyelini düşürdüğü saptanmış; bu da PKD'nin, malignant hücrelerce fazla ifade edilen matriks metaloproteinazların negatif regulasyonunda görev almasıyla açıklanmıştır (Rozengurt, 2012).

Her ne kadar, PKD üyelerinin-özellikle PKD1 izoformunun- meme kanserindeki rolleri çelişkili bulunsada, sürdürülen çalışmalar bu enzimlerin fonksiyonları konusunda ciddi ipuçları vermektedir. 2012 yılında yapılan bir çalışmada, PKD1'in fazla ifade edilmesiyle, bizim çalışmamızın da test platformu olan MCF7 hücre hattında, hücre çoğalmasının arttığı; bu artışın hücre döngüsünün G1-S fazı geçişinin daha çabuk olmasıyla sağlandığı bulunmuştur (Karam, Legay, Auclair, & Ricort, 2012). Ayrıca PKD1'in fazla ifade edilmesiyle, hücre çoğalması ve hayatta kalma için gerekli serum ve tutunma ihtiyacının azaldığı gözlenmiştir. Tüm bu olayların ERK1/2 MAP kinaz yolağı üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu da MCF7 de PKD sinyalinin anlam kazanmasının ERK1/2 statüsü ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada herhangi bir kemoterapötik ajan veya ilaç dirençli hücre hattı kullanılmamıştır.

Diğer bir çalışmada hakkında göreceli az bilgi bulunan PKD2 izoformu incelenmiştir. Öncelikli olarak MCF7 ve invaziv meme kanseri hücre hatlarında PKD izoformlarının ifade düzeyleri araştırılmış; en fazla

ifade edilen ve en fazla aktif olduğu saptanan izoformun PKD2 olduğu gösterilmiştir (Chen et al., 2011). Çalışmada, aktif PKD2'nin toplam PKD2 miktarına oranının en fazla olduğu gözlenen invaziv meme kanseri hattı MDA-MB-231 ve bu hattın paklitaksel uygulanmış hali incelenmiştir. Bu hücre hattında paklitakselin aktif PKD2 miktarını artırdığı; bunun da P-glikoprotein ifadesini artırdığı gözlenmiştir. PKD2 ifadesi RNAi mekanizmasıyla engellendiğinde P-gp ifadesinin düştüğü ve hücrelerin yeniden paklitakse duyarlı hale geldiği gösterilmiştir. Çalışma probleme yaklaşım açısından projemizle benzerlik taşısa da esas olarak ciddi farklılıklar söz konusudur. Öncelikle bu çalışmada ilaç dirençli hatlardan ziyade ilaç uygulanmış hücre hatları kullanılmış ve yalnızca P-gp ifadesi incelenmiştir; dolayısıyla elde edilen sonuçlar genel ilaç dirençliliği ve PKD2 ilişkisini yansıtmamaktadır. Varılan sonuçların farklı bir hücre hattından elde edilmiş olması, invaziv olmayan meme adenokarsinomu modeli olan MCF7'deki PKD2 ve ilaç dirençliliği ilişkisini cevapsız bırakmaktadır. Ayrıca, ilaç dirençliliğinden sorumlu olduğu bilinen *MRP1* ve *BCRP* gibi taşıyıcı proteinlerin ve apoptoz ile ilgili proteinlerin ifadeleri hiçbir hücre hattında incelenmemiştir.

Bazı kanser tiplerinde tümör oluşumu ile PKD2 ilişkisi doğrudan ortaya konmuştur. Örneğin bir çalışmada protein kinaz D2'nin gliyoblastoma gelişiminde etkili olduğu gösterilmiştir (Azoitei et al., 2011). Çalışmada PKD2'nin hem tutunmaya bağlı hem de tutunmadan bağımsız hücre çoğalması için gerekli olduğu; inhibisyonunun ise apoptozu yol açmadığı ancak hücre döngüsünü G1 fazında bloke ettiği saptanmıştır. Ancak, gen ifade profili ve mikroçevresi meme kanserinden farklı olan gliyoblastoma hücrelerinden elde edilen bu bulguların başka platformlarda da geçerli olup olmadığı henüz belirsizdir.

Tümör metastazı ve gelişimi için gerekli olan yeni kan damarlarının oluşumu (anjiyogenez) VGFR, FGF gibi pek çok büyüme faktörü ve bu faktörlerin başlattığı sinyal iletimiyle gerçekleşir. Yapılan bir çalışma PKD2'nin anjiyogenez için gerekli olduğunu göstermiştir (Hao, Wang, Zhao, & Tang, 2009). Ancak, normal hücre bölünme sinyalinde rol oynayan bu büyüme faktörleri ve PKD2 arasındaki ilişkinin, meme adenokarsinomu için de geçerli olup olmadığı bilinmemektedir.

PKD izoformlarının tümör hücrelerinin hayatta kalmasını, bazı apoptoz inhibitörü proteinlerin (*inhibitor of apoptosis proteins, IAPs*) ifade düzeylerini artırarak da yapabileceği düşünülmektedir (Storz, 2012). Bu proteinler doğrudan kaspazlara bağlanarak ya da dolaylı roller üstlenerek apoptozu engellerler. Apoptoz inhibitörü proteinlerden survivin, apoptoz efektörü kaspaz 3'ün; kemoterapi dirençliliğinde rol oynayan c-FLIP de dışsal apoptoz yolağının başlatıcı kaspazı olan kaspaz 8'in inhibitörüdür (Day et al., 2009). Nitekim, PKD1'in pankreas kanseri hücrelerinde survivin, c-FLIP gibi proteinlerin miktarını artırarak apoptozu engellediği böylece hücrelerin hayatta kalmasını sağladığı düşünülmektedir (Storz, 2012; Trauzold et al., 2003). AR42J pankreatitis model hücre hattında, protein kinaz D1'in XIAP ve survivin proteinlerinin ifadesini artırdığı, PKD1'in fazla ifade edilmesi ya da siRNA ile susturulmasıyla gösterilmiştir (Jingzhen Yuan et al., 2012). Bunun yanında NF- κ B aktivasyonunda rol aldığı gösterilen PKD1'nin bu yolla TRAF-1 ve cIAP2 gibi apoptozu karşı rolleri olan proteinlerin ifadesini artırdığı ortaya konmuştur (Storz, 2012). Bu gibi sağkalım proteinlerinin ifadesinin de PKD izoformları tarafından düzenleniyor olması, tümörün yaşamını sürdürmesine, bu enzimlerin farklı yollarla destek olabildiğini göstermektedir.

PKD tarafından regule edilebilen bu proteinlerin meme kanserindeki ilaç dirençliliğinde doğrudan rolleri de mevcuttur. Örneğin, doksorubisin dirençli MCF7 hücre hattındaki bir çalışma P-gp ve survivin proteinlerinin ilaç dirençliliğindeki etkinliklerini araştırmıştır. Bu çalışmada, P-gp ve survivin ifade düzeylerinin ilaca duyarlı MCF7 hattına göre oldukça fazla olduğu gözlenmiştir. Survivin'in fazla ifade edilmesiyle MCF7 hücrelerinde doksorubisine karşı dirençte artış gözlenmiş ve P-gp ile survivin birbirlerinin etkinliklerini düzenledikleri saptanmıştır. P-gp inhibitörü verapamil kullanılmasıyla survivin mRNA'sında önemli düşüş saptanmıştır. Ayrıca, RNAi yoluyla susturulan survivin'in hücre içinde ilaç birikimi sağladığı; bunu da P-gp aktivitesini düzenleyerek yaptığı ortaya çıkarılmıştır (Liu, Xie, Cai, & Jiang, 2007). Doğrudan apoptoz yollarını ve P-gp aktivitesini düzenlediği tespit edilen survivin'in, ilaç dirençli MCF7 hücre hatlarında PKD2 aktivitesine ile ilişkisi bilinmemektedir.

Benzer bir durum C-FLIP için de geçerlidir. Dışsal apoptoz yolağının bir inhibitörü olan C-FLIP, fazla ifade edildiği MCF7 hücrelerinde paklitaksele karşı direnç oluşmasına sebep olmuş; bu durum kaspaz 8 aktivitesindeki düşüşle gerçekleşmiştir (Z. Wang, Goulet, Stanton, Sadaria, & Nakshatri, 2005). MCF7 hücreleriyle oluşturulan zenograf kullanılarak yapılan çalışmada da, C-FLIP'in siRNA ile susturulması sonucu meme tümörlerinin gelişiminin gerilediği; susturmanın normal hücreleri etkilemediği gösterilmiştir (Day et al., 2009). C-FLIP'in kullanacağımız ilaç dirençli MCF7 hücre hatlarındaki ifadesi ve bu ifadenin PKD2'ye ne ölçüde bağlı olduğu bilinmemektedir.

Hücreki en önemli tümör baskılayıcı faktör olarak kabul edilen p53 proteini, etoposid ve doksorubisin gibi ajanların yol açtığı stres durumlarında hücre döngüsünü bloke ederek; hasarın onarılamaması durumunda da apoptoz yollarını başlatarak hücrenin bölünmesini engeller (Lu, 2010). PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis), p53'ün en önemli efektörlerinden birisidir. PUMA etkisini Bcl-2'ye bağlanarak mitokondriden, apoptoz aktivatörü sitokrom c salımını tetiklemek yoluyla gösterir (Nakano & Vousden, 2001). PUMA'nın bazı ajanların varlığında p53'den bağımsız olarak gen düzeyinde aktive olabildiği gösterilmiştir. Örneğin, p38 MAP kinaz engellendiğinde, apoptotik etkisi PUMA ve Bax statüsüne bağlı olan 6-hidroksidopamin bu etkisini gösterememiştir. Çalışma sonucunda PUMA'nın p38 tarafından transkripsiyon düzeyinde aktive edildiği saptanmıştır (Gomez-Lazaro et al., 2008). MCF7 hücre hattında da ifadesi tespit edilen PUMA'nın, ERK1/2'yi pozitif; p38 ve JNK gibi stres MAP kinazlarını negatif olarak module ettiği düşünülen PKD üyeleri özellikle PKD2 ifadesinden ne ölçüde etkilendiği bilinmemektedir (L. Wang et al., 2012).

Bu çalışmada PKD2 aktivitesi ile ilaç dirençliliği, apoptoz ve ilgili proteinlerin ifadeleri arasındaki bağlantı belirlenecek; doksorubisin, etoposid ve zoledronik asite karşı gelişen dirençlilik mekanizması incelenecektir. Elde edilen bulgular kanserde ilaç dirençliliğinin engellenmesi ve geri çevrilmesi ile ilgili çalışmalara ışık tutacaktır.

2. Gereç ve Yöntem

2.1. Hücre kültürü

2.1.1.Hücre hatları

Doksorubisine, etoposite ve zoledronik asite dirençli MCF7 meme adenokarsinoması hücre hatları daha önce laboratuvarımızda geliştirilmiştir (Kaplan & Gündüz, 2012; Kars et al., 2006; Kars, İşeri, Ural, & Gündüz, 2007). Tüm dirençli hatlar %10'luk fetal bovin serum, gentamisin, penisilin ve streptomisin antibiyotikleri içeren RPMI1640 besiyerinde filter kapaklı hücre kültürü flasklarında karbondioksit inkübatöründe büyütülmüştür. Hücreler, flask yüzeyini kapladıkça rutin olarak pasajlanmıştır.

2.1.2.Hücre kültürlerinin pasajlanması

Dirençli hücre hatları, kültür kabı yüzeyini kapladıkça şu şekilde pasajlanmışlardır: Besi yeri pipetlenerek atılır ve kültür kabı yüzeyi fosfat tamponlanmış salin (PBS) ile yıkanır. Yıkama tamponu uzaklaştırılır ve hücre tipine bağlı olarak 1-2ml 0.25% Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 5 dakika boyunca hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ve birbirlerinden ayrılması beklenir. Tripsini inaktive etmek için 4-5ml besiyeri eklenir ve istenen oranda pasajlama yapılarak, hücreler yeni kültür ortamına geçirilir.

2.2. Gen ifade analizi

2.2.1.RNA izolasyonu

Toplam RNA izolasyonu TriPure kimyasalı ile üretici firmanın direktifleri doğrultusunda 6-kuyulu plakalara önceden ekilmiş hücrelerden yapılmıştır (Roche Diagnostic, Almanya). Basitçe, 6-kuyulu plakadaki hücrelerin besiyeri uzaklaştırılmış ve her bir kuyu soğuk PBS ile dikkatle yıkanmıştır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra, herbir kuyuya 1ml TriPure kimyasalı eklenmiş, etkili liziz sağlamak için 5 dakika boyunca elde çalkalanmıştır. Lizatlar DEPC ile muamele edilmiş tüplere alınmış ve izolasyon gününe kadar -80°C derin dondurucuda saklanmıştır. İzole edilen RNA'nın saflığı ve miktarı NanoDrop Spektrophotometresi'nde (Thermo Scientific, ABD) ölçülmüş; RNA kalitesi 1% agaroz jelde gözlemlenmiştir.

2.2.2.DNaz I muamelesi

RNA izolatındaki olası gDNA kontaminasyonu RapidOut DNA Removal Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak giderilmiştir. Basitçe, 2µg total RNA son hacim 20µl olacak şekilde su, DNaz I tampon, DNaz I enzimi ile üretici firmanın direktifleri doğrultusunda karıştırılarak 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Kit içeriğindeki DDR süspansiyonu ile reaksiyondaki DNaz I enzimi uzaklaştırmıştır.

2.2.3.cDNA sentezi

DNAs I ile muamele edilen RNA; RevertAid Reverse Transcriptase, random hexamer primer, dNTP ve RiboLock RNaz inhibitörü (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak cDNA'ya çevrilmiştir.

Bileşen	Miktar µl
Nukleaz içermeyen su	20µl ye tamamlayacak kadar
Random hexamer	1
RT buffer	4
dNTP	2
Ribolock	0.5
RT enzimi	1
RNA	500ng içeren miktarda

Tablo 1: cDNA sentez yöntemi

Yukarıdaki bileşenler DEPC ile muamele edilmiş tüplerde karıştırılarak 25°C'de 10 dakika, 42°C'de 1 saat ve 70°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Oluşan cDNA nukleaz içermeyen su ile 1:5 oranında seyreltilerek gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonunda (qRTPCR) kullanılmıştır.

2.2.4.Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRTPCR)

Elde edilen cDNA'lar FastStart SYBR Green qPCR Master Mix ile (Roche, Almanya) Rotor Gene Q (Qiagen, Almanya) cihazında çoğaltılmış; gen ifadelerindeki değişimler $2^{\Delta\Delta C_t}$ yöntemi ile analiz edilmiştir. Aşağıda qPCR'da kullanılan primer çiftlerinin dizileri verilmektedir. Bu dizilerin alındığı kaynaklar tabloda belirtilmektedir.

Tablo 2: qPCR'de kullanılan primer çiftleri

Primer	Sekans 5' - 3'	Amplikon boyutu (bp)	Referans
<i>PKD2 forward</i>	AGTTCCTCATCACCAGATCC	146	NCBI Primer Blast
<i>PKD2 reverse</i>	GATGCGAGCAAAGCCAAAGT		
<i>ABCB1 forward</i>	GGGAGCTTAACACCCGACTTA	154	Harward PrimerBank, ID: 318037598c2
<i>ABCB1 reverse</i>	GCCAAAATCACAAGGGTTAGCTT		
<i>ABCC1 forward</i>	TGTGGGAAAACACATCTTTGA	80	Urfalı, 2012
<i>ABCC1 reverse</i>	CTGTGCGTGACCAAGATCC		
<i>ABCG2 forward</i>	AGATGGGTTTCCAAGCGTTCAT	91	Urfalı, 2012
<i>ABCG2 reverse</i>	CCAGTCCCAGTACGACTGTGACA		
<i>PUMA forward</i>	GACGACCTCAACGCACAGTA	109	NCBI Primer Depot
<i>PUMA reverse</i>	GTAAGGGCAGGAGTCCCAT		
<i>cFLIP forward</i>	GAACATCCACAGAATAGACC	262	Bangert et.al, 2012
<i>cFLIP reverse</i>	GATCTCTCTTCAGGTATGC		
<i>Survivin forward</i>	AGCCAGATGACGACCCATAGAGG	60	NCBI Primer Blast
<i>Survivin reverse</i>	AAAGGAAAGCGCAACCGGACGA		
<i>ATCB forward</i>	CCAACCGCGAGAAGATGA	97	Kaplan, 2012
<i>ATCB reverse</i>	CCAGAGGCGTACAGGGATAG		

2.3. Protein izolasyonu ve Western blot

2.3.1.Total protein izolasyonu

Total protein izolasyonu RIPA protein ekstraksiyon tamponu (SantaCruz, ABD) kullanılarak 6 kuyulu plakalara önceden ekilmiş hücrelerden yapılmıştır. Öncelikle besiyeri uzaklaştırıp, yüzeydeki hücreler soğuk PBS ile yıkanmıştır. PBS uzaklaştırılarak, proteaz ve fosfataz inhibitor kokteyli (Thermo Scientific, ABD) eklenmiş olan soğuk RIPA tamponu kuyu başına 0.2ml olacak şekilde eklenmiş; plakalar buz üzerinde 5 dakika tutulmuştur. Seri pipetleme yapılarak lizatın homojenize olması sağlandıktan sonra, lizatlar steril tüplere alınarak 14000g'de 4°C'de 15 dakika çevrilmiştir. Santrifüj işleminden sonra protein içeren supernatant kısmı yeni bir steril tüpe alınmış ve -20°C'de saklanmıştır. Supernatantın bir kısmı başka bir tüpe alınarak protein konsantrasyonu belirlenmiştir.

2.3.2.Bradford assay

Protein miktar tayini Bradford assayı ile yapılmıştır (Bradford, 1976). Esas protokolden farklı olarak, Bradford yöntemi 96 kuyulu plaka sistemine uyarlanmıştır. Önce 1mg/ml serum albumin (BSA) sulu çözeltisi kullanılarak standart protein solüsyonları hazırlanmıştır. RIPA içeriğindeki bazı deterjanların Bradford ile etkileşebildiği gösterildiğinden, tayin edilecek olan proteinler su ile 1:10 oranında seyreltilerek sözkonusu deterjanların konsantrasyonu düşük düzeye çekilmiştir. Standart protein konsantrasyonları ve örnekler aşağıdaki tabloda gösterildiği şekilde hazırlanarak herbir kuyuya 10'ar µl eklenmiştir.

Standard konsantrasyonu (mg/ml)	Stok BSA miktarı (µl)	Distile Su miktarı (µl)	RIPA (µl)
0,8	80	10	10
0,6	60	30	10
0,4	40	50	10
0,2	20	70	10
0,1	10	80	10
0,05	5	85	10
0,025	2,5	87,5	10
0 (blank)	0	90	10

Tüm standart ve örneklere 250µl 1X Bradford kimyasalı eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiş ve Multiskan Plaka Okuyucu'da (Thermo Scientific, ABD) 595nm'de ölçüm alınmıştır. Protein konsantrasyonları, kalibrasyon grafiği çizilerek belirlenmiştir.

2.3.3.Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

40µg protein gerekli miktarda 4X SDS-PAGE örnek yükleme tamponu ile karıştırılarak %4'lük istifleyici jelde ve %8'lik ayırıcı jelde, 1X Tris-Glisin-SDS running tamponunda 150V'da 90 dakika

yürütülmüştür. Protein ayrımı renkli protein standart bantları içeren PAGE Ruller (Thermo Scientific, ABD) ile izlenmiştir.

2.3.4. Proteinlerin jelden nitroselüloz zara transferi

Proteinler yeterince ayrıldıktan sonra BioRad Transblot sistemi ile nitroselüloz zara 1X Tris-Glisin ve %20'lik metanol ile 100mA'de 18 saat boyunca transfer edilmiştir.

2.3.5. Bloklama, primer ve seconder antikor muamelesi, kemilüminesans görüntüleme

Zar üzerindeki protein bağlanmamış bölgeleri bloklamak için, zar transferden sonra, %5'lik yağsız süt tozu süspansiyonunda 1 saat boyunca oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Bloklamanın ardından zar TBST de yıkanmış ve 16 saat boyunca +4°C'de GAPDH ya da PKD2 primer antikorunda (Abcam, ABD) muamele edilmiştir. Süre sonunda zar TBST'de yıkanmış ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında seconder antikor ile muamele edilmiş. Zar tekrar yıkanarak kemilüminesans substratı ile muamele edilmiş (Pierce, ABD) ve kemilüminesans görüntüleme cihazında (Kodak), filme aktarılmıştır.

2.4. siRNA transfeksiyon optimizasyonu

siRNA yardımcı gen susturması uygulamalarında, kullanılacak siRNA konsantrasyonu, transfeksiyon kimyasalının miktarı siRNA'nın hücrelere alımı adına önem arz etmektedir. Bu amaçla, fluoresan boya ile işaretlenmiş hedefi olmayan siRNA kullanılarak hangi siRNA dozunun daha etkin bir şekilde hücre içine alındığı saptanabilmektedir. Çalışmamızda, Alexa Fluor 488 işaretli siRNA (Qiagen, Almanya) 1nM, 2nM, 5nM, 10nM, 20nM'lık dozlarda sabit HiPerfect transfeksiyon kimyasalı (Qiagen, Almanya) ile HiPerfect üreticisinin direktifleri doğrultusunda 6 kuyulu plakaya ekilen 200.000 hücre üzerine verilmiştir. 16 saatlik inkübasyon sürecinden sonra besiyeri uzaklaştırıp, PBS ile yıkanmış ve tripsiniz edilerek hücreler toplanmıştır. Hücreler çöktürülerek, PBS'de çözülmüş ve akış sitometresinde (Accuri, BD) yeşil filtrede okuma yapılmıştır. Hücre zarında kalan ve hücre içine alınan siRNA sinyalini ayırt etmek için aynı hücreler trifan mavisinde 5 dakika bekletilip aynı şartlarda yeniden okutulmuştur.

2.5. siRNA transfeksiyonu

Spesifik olmayan etkileşimleri önlemek ve siRNA sarfını kısıtlamak için, deneylerde, hem hücre içinde biriken hem mRNA düzeyinde de etkili susturma sağladığı gösterilen 10nM siRNA dozu kullanılmıştır. Transfeksiyon qPCR ve protein deneyleri için 6-kuyulu plakalarda; hücre çoğalması ve kaspaz aktivite ölçümleri için ise 96 kuyulu plakalarda yapılmıştır.

2.5.1. Altı kuyulu plakada transfeksiyon

Transfeksiyon kimyasalı HiPerfect'in direktiflerine uygun olarak "fast forward" transfeksiyon yöntemi uygulanmıştır. Bu bağlamda, her bir kuyuya 2,3 ml'lik besiyeri içerisinde 250.000 hücre ekilerek kısa

bir sürebekletilmiştir. Herbir kuyu için transfeksiyon karışımı; 12µl HiPerfect, son konsantrasyonu 10nM olacak miktarda PKD2 siRNA'sı (Qiagen, Almanya) veya negatif kontrol siRNA (SantaCruz, ABD) ve karışımı 100µl'ye tamamlayacak miktarda serum içermeyen besiyeri eklenerek hazırlanmıştır. Karışım vorteks edilmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilerek transfeksiyon komplekslerinin oluşması sağlanmıştır. Herbir kuyuya 100µl'lik transfeksiyon karışımı damlalar halinde eklenmiş ve tekrar inkübatöre yerleştirilerek istenilen süre boyunca bekletilmiştir. Transfeksiyonu izleyen 24 saat, 48 saat, 72 saat sonrası ya 48 saatlik ilaç muamelesine başlanmış ya da RNA/protein izolasyonu yöntemlerine geçilmiştir.

2.5.2. Doksan altı kuyulu plakada transfeksiyon

XTT Cell Proliferation Assay (Biological Industries, İsrail) ve Caspase 3/7 Activity Assay (Promega, ABD) deneyleri 96-kuyulu plakalarda gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon kimyasalının 96 kuyulu plakalarda transfeksiyon için önerdiği "reverse transfeksiyon" yöntemi uygulanmıştır. Kısaca, kontrol siRNA ve PKD2 siRNA'sı 1µM'a su ile seyreltilmiştir. Transfeksiyon olacak kuyulara 2µl sözkonusu seyreltik siRNA eklenmiştir. Herbir kuyu için 0.75µl HiPerfect 24.25µl serum içermeyen besiyerinde seyreltilerek siRNA'nın üzerine eklenmiştir. Bu noktada toplam transfeksiyon yapılacak kuyu miktarına göre master mix hazırlanarak 25'er µl seyreltik HiPerfect dağıtılmıştır. Plaka, plaka karıştırıcısında 30 saniye bekletilmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında tutularak transfeksiyon komplekslerinin oluşması sağlanmıştır. Bu sürede hücreler tripsin ile kaldırılıp, santrifüj edilmiş ve bir miktar hücre süspansiyonu 1:9 oranında trifen mavisini (Biological Industries, İsrail) ile karıştırılarak hücre sayma lamı (Isolab, Almanya) üzerinde canlı hücre sayımı yapılmıştır. Hücre miktarı ve konsantrasyonu, herbir kuyuya 175µl'de 10.000 hücre ekilecek şekilde ayarlanmış ve bu süspansiyondan herbir kuyuya 175µl eklenmiştir. Transfeksiyon sonrası 24 saatten başlayarak etkili sustumanın sağlandığı gösterildiğinden ve daha uzun inkübasyon süresinin hücrelerin fazla çoğalarak ilaçtan bağımsız ölmelerine neden olabileceği gözlemlendiğinden 48 saatlik transfeksiyon uygulanmıştır. Transfeksiyondan 48 saat sonra kuyulardaki besiyerleri uzaklaştırılmış ve 100µl besiyeri ile yıkama yapılmış ve bu besiyeri de uzaklaştırılmıştır. Plaka planlarına göre en yüksek ilaç dozunu ekleneyeceği 2.kolon dışında tüm kuyulara 100µl besi yeri eklenmiştir. En yüksek ilaç dozunu içeren besiyerinden 100µl 2. kolona eklenmiş; bu ilaç içeren besiyerinden 200µl alınarak 3. Kolondaki besiyeri ile karıştırılmıştır. Buradan alınan 200µl besiyeri 4.kolona eklenmiş, karıştırılarak yine aynı miktar 5.kolona transfer edilmiştir. Bu şekilde 12.kolona kadar seri seyreltme yapılarak 11 farklı ilaç konsantrasyonu elde edilmiştir.

2.6. PKD2 gen ifadesinin susturulmasından sonra mRNA ve protein düzeylerinin incelenmesi

Sağlıklı, ancak kültür kabını tamamen kaplamamış hücreler, 3.6.1'de belirtildiği şekilde 6 kuyulu plakaya ekilerek transfekte edilmiş; 24, 48 ve 72 saat sonra ilgili kuyulardan hücreler RNA için TriPure ajanı ile; protein için de RIPA lizis tamponu ile toplanmış ve RNA / protein izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra qPCR ve Western blotlama yöntemleri ile RNA ve protein düzeylerindeki susturma etkinliği saptanmıştır.

2.7. XTT analizi

Hücreler madde 3.6.2 de belirtildiği gibi 96 kuyulu plakalara ekilerek transfekte edilmiştir. 48 ya da 72 saatlik transfeksiyon süresini 48 saatlik ilaç muamelesi izlemiştir. Göreceli büyüme miktarları, kuyulara eklenen XTT ajanı (Biological Industries, İsrail) ile saptanmıştır. Bir tetrazolyum tuzu olan XTT, canlı hücrelerin işlevsel mitokondrileri tarafında kırmızı renkli formazan bileşenlerine dönüştürüldüğünden, oluşan renk kuyu içindeki canlı hücre miktarıyla orantılı olmaktadır.

2.8. qPCR analizi

İlaç dirençliliğindeki azalmanın olası yollarını saptamak için PKD2 ile transfekte edilen ve/veya ilaç ile muamele edilen hücrelerden belirli zaman aralıklarında RNA izole edilerek sözkonusu genlerin ifadelerinde değışim olup olmadığı saptanmıştır.

3. Bulgular

3.1. qPCR için primer optimizasyonu

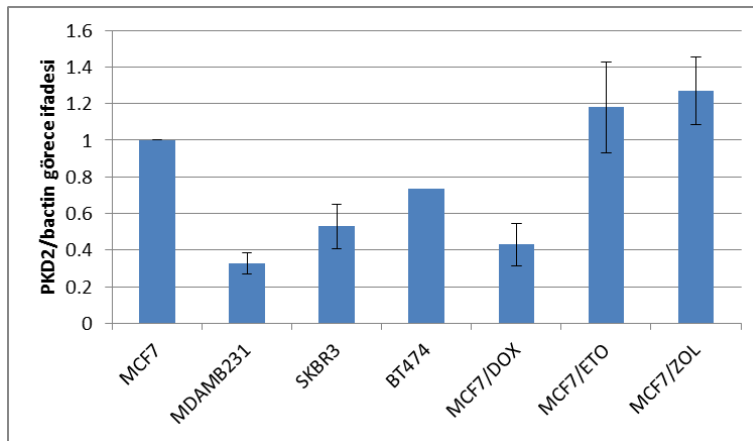
qPCR analizlerinde kullanılacak olan primerler öncelikle optimize edilmiştir. DNase I ile muamele edilmiş olan kaliteli RNA ile hegzamer primer kullanılarak cDNA elde edilmiş ve tüm primerler hegzamer ile çalışacak şekilde optimize edilmiştir.

Bileşen	PKD2	β -actin	MDR1	MRP1	BCRP	PUMA	cFLIP	Survivin
Master mix	10	10	10	10	10	10	10	10
Sens primer 10 μ M	0.4	0.24	0.2	0.24	0.5	0.25	0.5	0.2
Antisens primer 10 μ M	0.4	0.24	0.2	0.24	0.5	0.25	0.5	0.2
Su	6.2	5.52	5.6	5.52	5	4.5	7	5.6
cDNA	3	4	4	4	4	5	2	4
İlk denaturasyon	95C; 10 dk	95C; 10 dk	95C; 10 dk	95C; 10 dk	95C; 10 dk	95C; 10 dk	95C; 10 dk	95C; 10 dk
Denaturasyon	95C; 15 s	95C; 15 s	95C; 15 s	95C; 15 s	95C; 15 s	95C; 15 s	95C; 15 s	95C; 15 s
Anneal sıcaklığı	60C; 60 s	55C; 45 s	60C; 60 s	55C; 45 s	60C; 60 s	60C; 60 s	60C; 60 s	60C; 60 s
Ekstensiyon sıcaklığı		72C; 45 s		72C; 45 s				
Tekrar sayısı	35	32	37	40	40	40	40	36

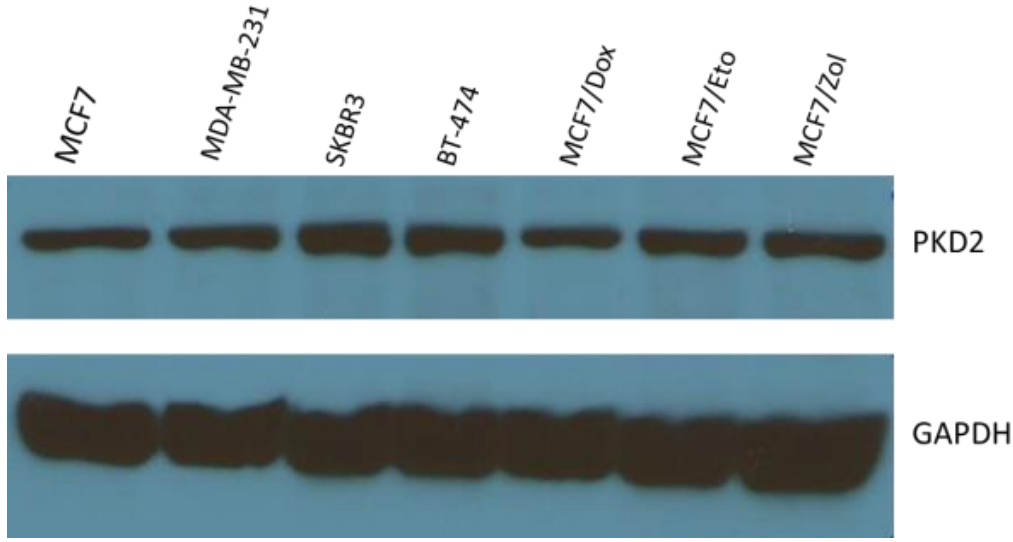
Tablo 3: qPCR reaksiyon şartları. Reaksiyon bileşenlerinin miktarları μ l cinsinden verilmiştir ve toplam reaksiyon hacmi 20 μ l'dir.

3.2. Hücre hatlarında PKD2 ifadesinin belirlenmesi

İlaç dirençliliği ve PKD2 ilişkisinin incelendiği bu çalışmada, öncelikle farklı fenotiplere sahip meme kanseri hücre hatları ile üç tip ilaç dirençli MCF7 meme kanseri hücre hattı PKD2 ifadesi için taranmıştır. qPCR analizi göstermiştir ki taranan tüm hücre hatları değişik oranlarda PKD2 ifade etmektedir (Grafik 1). Benzer şekilde Western blot ile yapılan protein düzeyi analizleri de hücre hatlarında PKD2 ifadesinin varlığını göstermiştir (Şekil 1).



Grafik 1: Sayılan hücre hatlarında PKD2 mRNA ifadesi



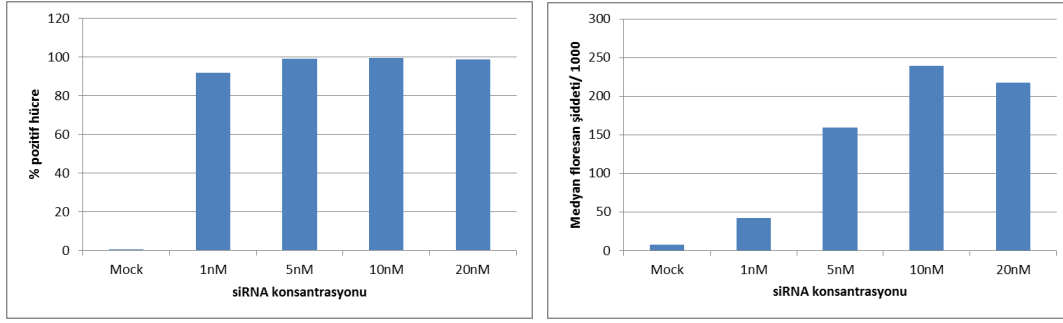
Şekil 1: Taranan hücre hatlarında PKD2 protein ifadesi

Taranan meme kanseri hücre hatları ile ilaç dirençli MCF7 hatlarında değişen miktarlarda PKD2 ifadesi saptanmıştır. Diğer PKD izoformlarında hücre tipine bağlı olarak farklı ifade düzeyi gözlemlense de, bu tarama sonucu farklı fenotiplere sahip meme kanseri hücre hatlarını birbirine yakın düzeyde PKD2 ifade ettiğini göstermektedir. Bir kinaz olan PKD2'nin ifade düzeyi kadar aktivitesi de önem arz etmektedir. Bazal düzeydeki PKD2 aktivitesindeki olası farklar PKD2'nin farklı hücre tiplerinde farklı roller üstlenebileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle aktif PKD2 formunun (Ser 876'dan fosforlanmış PKD2) karşılaştırılması da önemlidir.

3.3. Transfeksiyon etkinliği

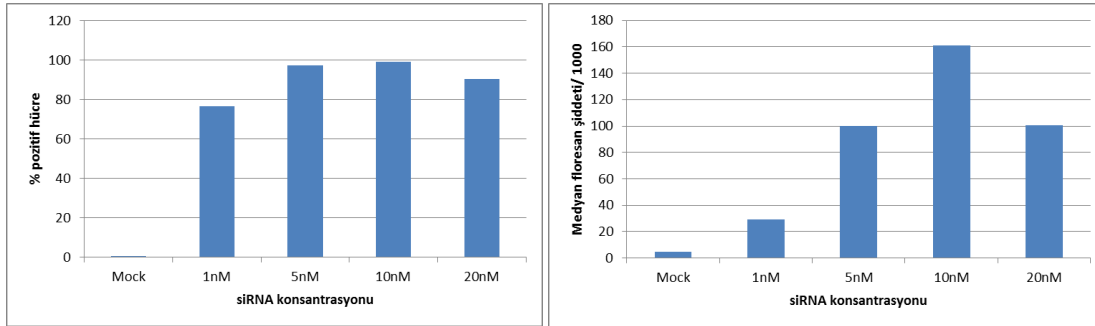
PKD2'nin doksorubisin, etoposid ve zoledronik asit dirençliliği ve apoptoz üzerine olası etkileri MCF7 hücre hatlarında bu proteinin ifadesi susturularak araştırılmıştır. siRNA kullanılarak yapılan susturma işlemi öncesinde, kullanılması gereken siRNA miktarı ve transfeksiyon şartları, floresan işaretli negatif siRNA kullanılarak akış sitometrisinde optimize edilmiştir.

MCF7/DOX hücre hattında siRNA alan hücre miktarı ile hücre içine alınan siRNA miktarını gösteren medyan floresan şiddeti aşağıda gösterilmiştir.



Grafik 2: MCF7/DOX hücre hattında transfeksiyon optimizasyonu

Transfeksiyon şartlarında 5nM siRNA konsantrasyonundan itibaren hücrelerin %99'u siRNA ile transfekte edilmektedir. 10nM'da ise içeri alınan siRNA miktarı en fazla olup, transfekte olan hücreler %99'u aşmaktadır. Hedef dışı beklenmedik etkiler genellikle 100nM üzerindeki dozlarda geçerli olduğundan hedef-dışı susturma etkinliği beklenmemekte olup, bu MCF7 türevi için sonraki çalışmalarda PKD2 ifadesi 10nM siRNA ile düşürülecektir. Benzer şekilde, MCF7/ETO türevi için de optimum transfeksiyon koşullarının 10nM siRNA ile sağlandığı gözlemlenmiştir.

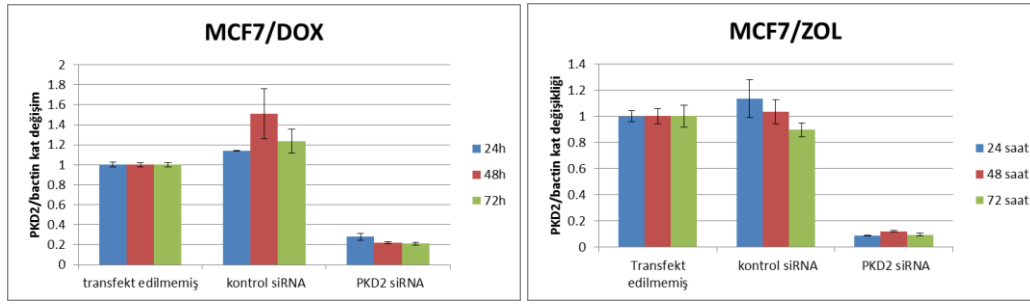


Grafik 3: MCF/ETO hücre hattında transfeksiyon optimizasyonu

3.4. PKD2 susturulmasının gösterilmesi

3.4.1.mRNA düzeyinde

MCF7/DOX ve MCF7/ZOL hücreleri 10nM PKD2 ve kontrol siRNA'sı ile 24, 48 ve 72 saat boyunca transfekte edilmiştir. Belirtilen anlarda hücreler TriPure kimyasalı ile toplanmış ve RNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Sırasıyla DNase muamelesi ve cDNA sentezinin ardından yapılan qPCR analiz sonucunda mRNA düzeyindeki aşağıdaki grafiklerde gösterilmekte olan düşüş gözlenmiştir.

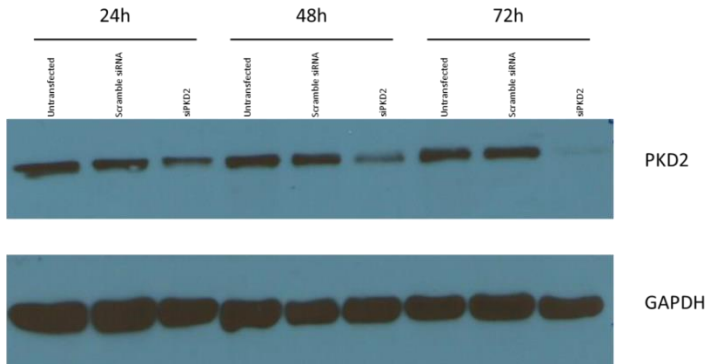


Grafik 4: PKD2 susturulmasının MCF7/DOX ve MCF7/ZOL hücrelerinde mRNA düzeyinde validasyonu

Grafiklerden anlaşılacağı üzere, etkin susturma 24 saatte başlamakta ve 72 saatte de aynı etkinliği muhafaza etmektedir. Kontrol siRNA muamelesinin hedef genin ifadesine herhangi bir etkisi olmadığı ayrıca gözlenmiştir.

3.4.2. Protein düzeyinde

Her ne kadar mRNA düzeyinde etkin bir azalma saptansa da bir enzim olarak işlev gören PKD2'nin protein düzeyindeki değişim daha büyük önem arz etmektedir. Yarı ömürleri uzun olan proteinler, mRNA düzeyindeki azalmadan geç etkilendir; dolayısıyla protein düzeyindeki düşüş ya az olur ya da beklene düşüş çok sonra gerçekleşir. Bu nedenle öncelikli olarak mRNA düzeyinin ölçüldüğü zaman noktaları alınarak susturma sonrası protein ifadesine bakılmıştır. Protein düzeyindeki azalmanın 24. saatte belirgin olduğu ve artarak 72. saatte de sürdüğü gözlenmiştir. Bu sonuçlarla 72. Saatte PKD2 proteininin çok eser miktarda ifade edildiği gösterilmiş; sonraki analizler için susturma süresi olarak da 72 saat alınmıştır.

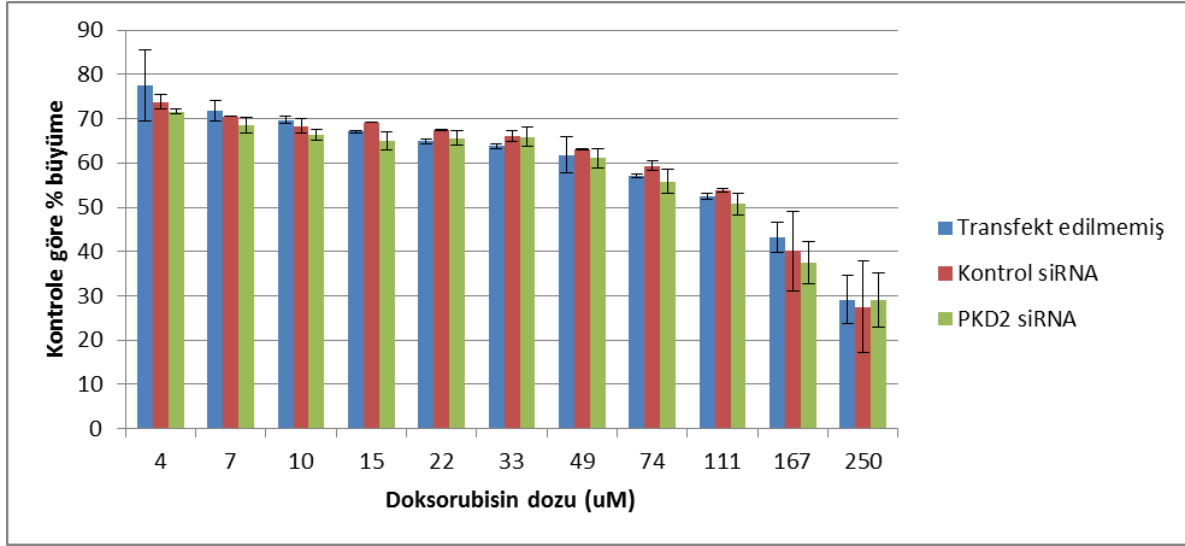


Şekil 2: MCF7/DOX hücrelerinde PKD2 susturmasının protein düzeyinde tespiti

qPCR analizine paralel olarak, 24-48 ve 72 saat transfekte edilen MCF7/DOX hücrelerinde protein düzeyi incelenmiştir. PKD2 ifadesindeki azalma tüm zaman periyotlarında belirgindir; ancak maksimum azalma 72 saatte gözlenmiştir. Kontrol siRNA transfeksiyonu protein ekspresyonuna etki etmemiştir.

3.5. PKD2 susturulmasının ilaç dirençliliğine etkisi (XTT Hücre Büyümesi Analizi)

PKD2'nin MCF7/DOX hücrelerinde etkin bir şekilde susturulduğu gösterildikten sonra PKD2'nin ilaç dirençliliğine etkisi XTT Hücre Büyümesi Analizi ile test edilmiştir.

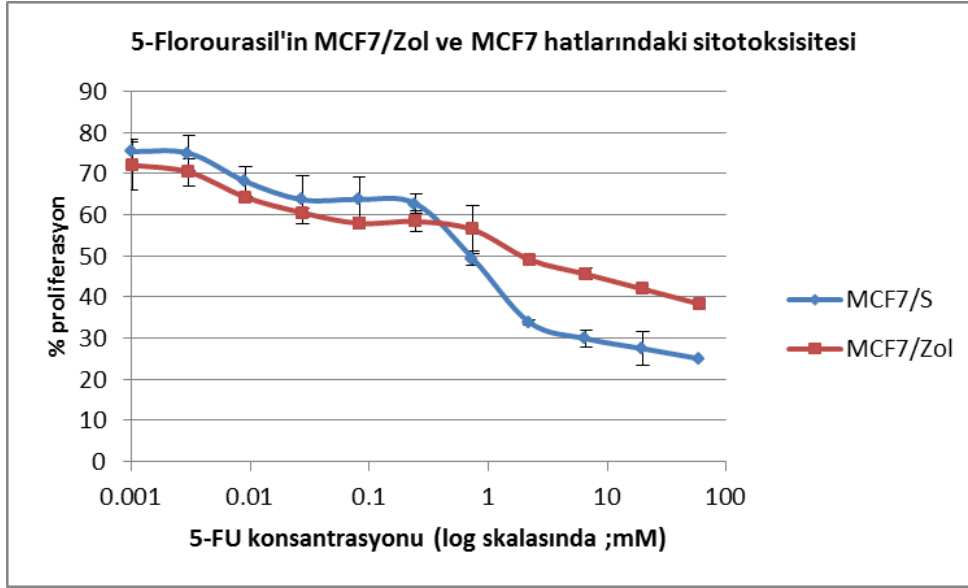


Grafik 5: MCF7/DOX hücrelerinde transfeksiyonun ilaç dirençliliğine etkisi

Grafik 5'te de görüldüğü gibi, PKD2'nin susturulmasının aynı dozdaki transfekte edilmeyen ya da kontrol siRNA ile transfekte edilen hücelere göre proliferasyona ciddi bir etkisi olmamıştır. Bu da çalışmamızda kullanılan sisteme göre MCF7/DOX hücrelerinde PKD2'nin ilaç dirençliliği açısından etkisinin olmadığını göstermektedir.

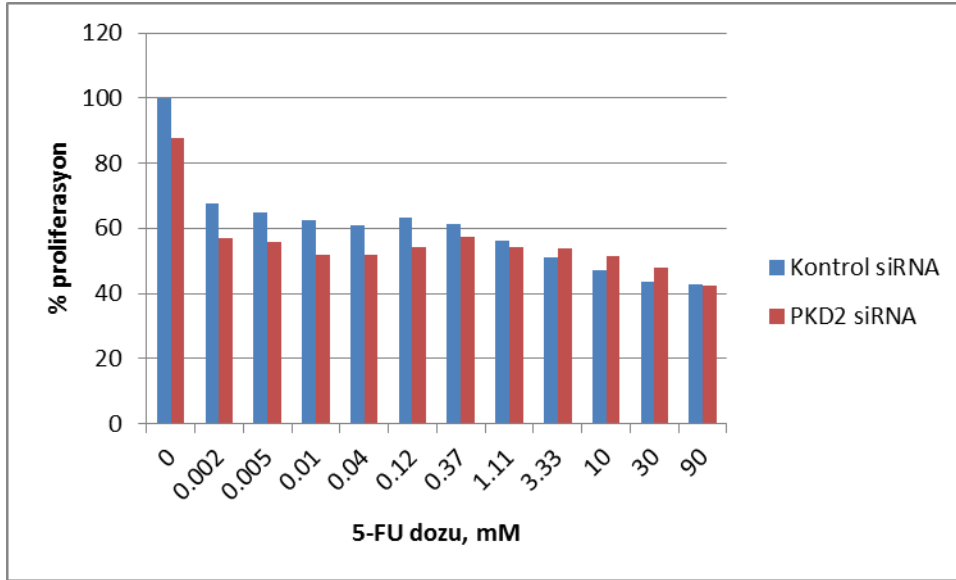
Benzer durum MCF7/ZOL ve MCF7/ETO hücrelerinde de gözlemlenmiştir. Yani, belirli bir konsantrasyon serisindeki canlı hücre miktarı bu hücre hatlarında da PKD2'nin susturulmasından etkilenmemektedir.

Etoposid ve doksorubisin hücre DNA'sını hedefleyerek hücreyi ölüme sürüklemektedir; ancak zoledronik asit diğer ilaçlar kadar potent değildir ve kullandığımız in vitro sistemde de çok yüksek dozlarda kullanılmaktadır. Bu nedenle, PKD2'nin MCF7/ZOL hücrelerinin dirençliliğinde etkin olmadığını, bu hücre hattının çapraz dirençli olduğu başka bir ilaçla teyit edilmeye çalışılmıştır. MCF7/ZOL hücreleri BCRP taşıyıcı proteinini fazla ifade etmektedir (Kars et al., 2007). Bir antimetabolit olan 5-florourasilin BCRP'nin substratı olduğu (Jianhui Yuan et al., 2009); dirençli MCF7 hücre hattında BCRP ifadesinin arttığı (Q. Wang et al., 2013) gözlemlenmiştir. Bu da MCF7/ZOL hattının 5-FU'ya çapraz dirençli olabileceğini düşündürmüştür. Ana MCF7 hücre hattı ile MCF7/ZOL hattının 5-FU'ya duyarlılığı XTT yöntemi ile saptanmış; özellikle yüksek dozlarda MCF7/ZOL hücrelerinin 5-FU'ya dirençlilik gösterdiği gözlemlenmiştir.



Grafik 6: 5-FU'nun MCF7/ZOL ve MCF7 hücrelerindeki sitotoksitesi.

Bu durumdan yola çıkılarak PKD2'nin susturulduğu MCF7/ZOL hücrelerinde, 5-FU dirençliliğinde bir değişim olup olmadığı çalışılmıştır. Sitotoksite analizleri, PKD2 susturulduğunda, MCF7/ZOL hücrelerinin 5-FU'ya karşı dirençliliğinde anlamlı bir değişim olmadığını göstermektedir. Bu da MCF7/ZOL hücrelerindeki çapraz dirençliliğin PKD2 ifadesine bağımlı olmadığını düşündürmektedir.

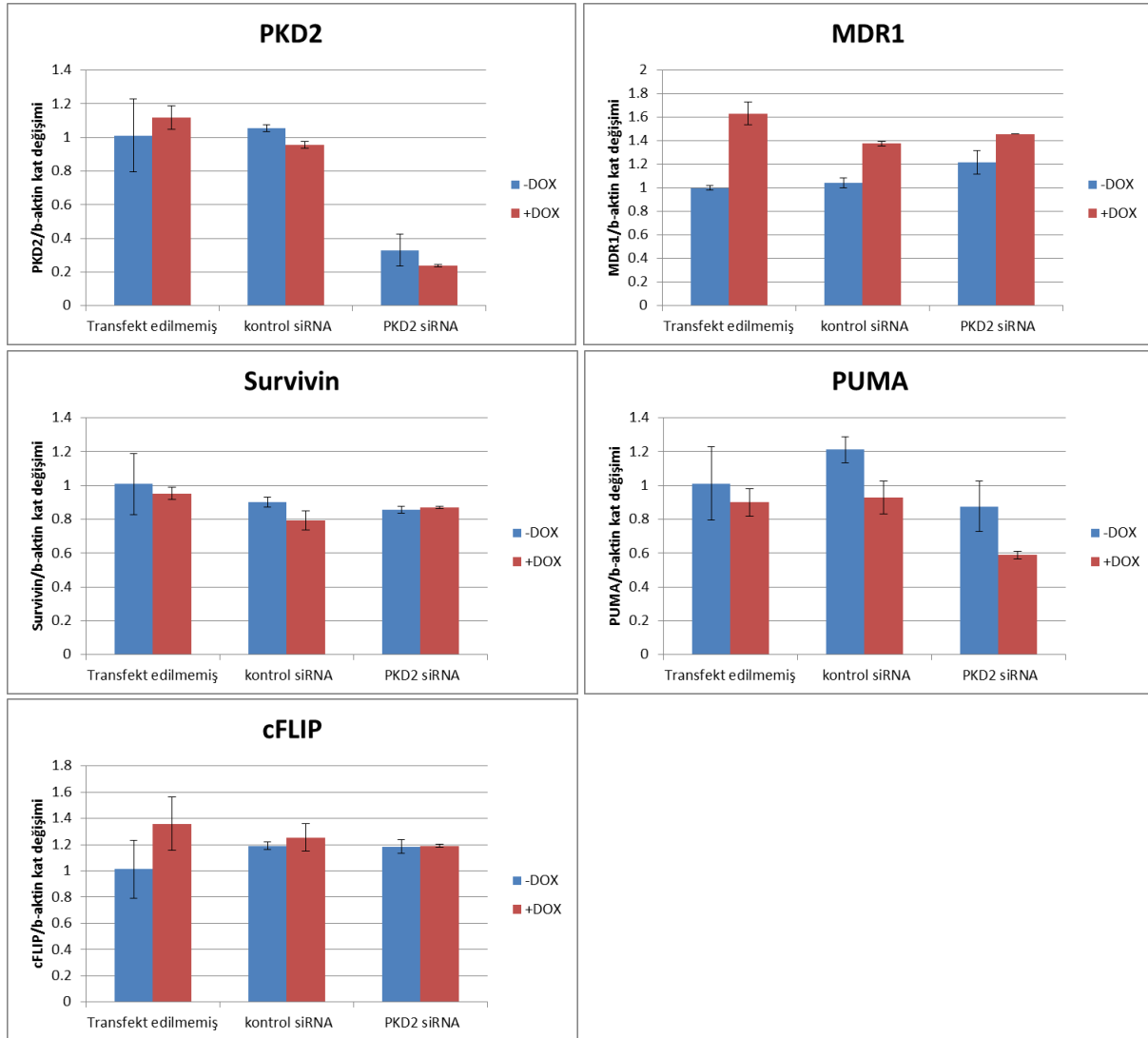


Grafik 7: 5-FU'nun PKD2'nin susturulduğu MCF7/ZOL hücrelerindeki sitotoksik etkisi.

3.6. PKD2 susturulmasının ilaç dirençliliği ve apoptoz ile ilişkili genlerin ifadelerine etkisi

PKD2'nin geçici transfeksiyon ile susturulduğu ve sitotoksik analizlerin XTT tabanlı proliferasyon analiziyle incelendiği MCF7 türevi olan ilaç dirençli hatlarda, PKD2'nin susturulmasının ilaç dirençliliğine bir etkisinin olmadığı düşünülmüştür. Ancak, PKD2'nin susturulmasının hücre üzerindeki etkileri daha uzun vadede de ortaya çıkması ihtimal dahilindedir ve bu durumun tespiti ancak PKD2'nin kalıcı susturulması ile mümkündür.

Mevcut durumda ise, PKD2'nin susturulması ile ilaç dirençliliği ve apoptoz ile ilişkili genlerin ifadelerinde değişim olup olmadığı bilinmemektedir. Bu nedenle, MCF7/DOX hücreleri 72 saat transfekte edilmiş ve ardından 24 saat boyunca öldürücü dozun altında doksorubisin (50µM) ile muamele edilmişlerdir. Sözkonsu genlerin ifadeleri Grafik 8'de gösterilmiştir.



Grafik 8: PKD2'nin MCF7/DOX hücrelerinde susturulmasının ilaç dirençliliği ve apoptoz ile ilişkili gen ifadelerine etkisi.

4. Tartışma ve Sonuç

Çoklu ilaç dirençliliği, kanser tedavisinde halen en yaygın olarak uygulanan yöntem olan kemoterapi karşısındaki en ciddi engellerden birisidir. Tümörde, ilaca maruz kalmaksızın görülen ya da ilaca maruz kaldıkça gelişen ilaç dirençliliği, yapı ve işlevce farklı diğer kemoterapi ajanlarına karşı da oluşuyorsa, bu durum çoklu ilaç dirençliliği olarak adlandırılır. Çoklu ilaç dirençliliği pekçok şekilde ortaya çıkabilir: İlacı hücre dışına pompalayan taşıyıcı proteinlerin fazla ifade edilmesi, ilacın toksik etkisini kıran sistemlerin aşırı etkinliği, ilaç kaynaklı apoptozdan kaçış, DNA onarım mekanizmalarının aşırı etkinliği bu yollardan bazılarıdır.

Hücre için yaşamsal öneme sahip olan PKC ve MAPK gibi sinyal yollarının tümör oluşumu ve ilaç dirençliliğinin gelişmesinde rolleri olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bundan hareketle yapılan diğer çalışmalar, nispeten yakın zamanda keşfedilen ve bu yollar tarafında düzenlenen protein kinaz D ailesi izoformlarının da hücre proliferasyonu, apoptoz, invazyon, anjiyojenez gibi olaylarda etkili olduğu gösterilmiştir.

Daha önce yapılan bir çalışmada, çoklu ilaç dirençliliğinin mekanizmalarından birisi olan P-glikoprotein yüksek oranda ifade edilmesi ile PKD2 proteini ilişkilendirilmiştir (Chen et al., 2011). Çalışmada, meme kanseri hattı MDA-MB-231'in P-gp'nin bir substratı olan paklitaksel duyarlılığının PKD2'nin susturulması ile arttığı; bunun da azalan P-gp ifadesi sayesinde gerçekleştiği belirtilmiştir. Çalışma, daha önce tümör oluşu ile ilişkilendirilen PKD üyelerinin ilaç dirençliliğinde de rolü olabileceğini göstermiştir.

İlaç dirençliliğinin gelişmesi, in vitro ve in vivo sistemlerde tümör hücrelerini daha saldırgan hale getirip; bu hücrelerin farklı fenotipler kazanmasına yol açabilmektedir. Örneğin hem laboratuvarımızda yapılan çalışmalar hem de literatürdeki yayınlar, çalışmamızın da temelini oluşturan metastatik olmayan epitel karakterli MCF7 meme kanseri hücre hattının doksorubisin, dosetaksel, paklitaksel, 5-florourasil gibi ilaçlara dirençli türevlerinin daha çok mezenseşimal özellikler gösterdiğini ve invazif özelliklerinin bulunduğunu göstermektedir (Işeri et al., 2011; Zhang et al., 2012). Bu da ilaç dirençliliği mekanizmalarının; kısa süreli ilaç muamelesi yerine uzun süre ilaca maruz bırakılarak geliştirilen dirençli hatlar üzerinde daha sağlıklı bir şekilde çalışılabileceğini düşündürmektedir.

Bu düşünceden hareketle çalışmamızda MCF7 hücre hatlarının ABC taşıyıcı proteinlerini fazla ifade eden doksorubisin, etoposit ve zoledronik aside dirençli türevlerinde tümör oluşumu ve ilaç dirençliliği ile ilişkilendirilen PKD2'nin rolü incelenmiştir. Çalışmamıza MCF7, MDA-MB-231, SKBR3 ve BT-474 gibi farklı fenotiplere sahip meme kanseri hücre hatları ile birlikte MCF7/Dox, MCF7/Eto, MCF7/Zol türevlerindeki PKD2 ifadeleri belirlenerek başlanmıştır.

Hücre hattı	ER	PR	HER2	Invazif
MCF7	+	+/-	-	-
MDA-MB-231	-	-	-	+
SKBR3	-	-	+	+
BT-474	+	+/-	+	-

Tablo 4: Meme kanseri hücre hatlarının sınıflandırılması. ER, östrojen reseptör; PR, progesterone reseptör; HER2, epidermal büyüme faktörü reseptör 2.

mRNA ve protein düzeyinde yapılan taramada tüm hücrelerin PKD2 ifade ettiği gözlemlenmektedir. Literatürdeki diğer sonuçlar da meme kanseri hatlarında –değişen oranlarda da olsa- PKD2 ifadesini rapor etmektedir (Eiseler, Döppler, Yan, Goodison, & Storz, 2009; Hao, McKenzie, Gan, & Tang, 2013). Bu durum, PKD ailesinin en fazla çalışılan üyesi PKD1 de ise farklılık göstermektedir. Örneğin invazif meme kanseri hücre hatları MDA-MB-231, T47D, SKBR3’de Western blot ile saptanabilir düzeyde PKD1 ifade edilmemektedir (Eiseler et al., 2009). Bu da farklı PKD izoformlarının sisteme ve hücre fenotipine göre değişkenlik gösterebildiğine işaret etmektedir. PKD2 ifadesi kadar aktivitesi de önem arz etmektedir. Bazal düzeyde normal büyüme şartlarında aktif PKD2 oranı ilaç dirençli hatlar ve diğer meme kanseri hatlarında henüz saptanamamıştır. Bu bilgi PKD2’nin hücre tipine bağlı olarak üstlendiği roller hakkında fikir verebilecektir.

Tarama çalışmasından sonra, PKD2’nin edinilmiş ilaç dirençliliğine etkisinin saptanması için bu gen ilaç dirençli MCF7 türevlerinde siRNA kullanılarak susturulmuştur. Susturma şartlarını optimize etmek için floresan işaretli negatif siRNA molekülleri ile yapılan transfeksiyonlar, 10nM’lık siRNA konsantrasyonunun ortamdaki hücrelerin tamamına yakınına etkin bir şekilde transfekte edildiğini gösterilmiştir. Sonraki çalışmalarda da tüm transfeksiyonlar üç hücre hattı için de 10nM kontrol siRNA ve PKD2 siRNA kullanılarak yapılmıştır.

siRNA susturmasının dinamiklerinin saptanması için 24, 48 ve 72 saatlik transfeksiyon sürelerinin ardından PKD2 ifadesi mRNA ve protein düzeyinde taranmıştır. MCF7/DOX ve MCF7/ZOL hücrelerinde 24.saatten itibaren PKD2 mRNA miktarı %80 azalmış ve bu azalma 72.saatin sonuna dek korunmuştur. mRNA düzeyindeki azalma, protein düzeyine yansımış; 24.saatten itibaren PKD2 ifadesi azalmaya başlamış ve 72. saatte ilk durumun %10’una kadar gerilemiştir. Geçici transfeksiyon ile elde edilen %90 susturmanın ardından, işlevsel analizlere geçilmiştir.

PKD2 susturmasının ilaç dirençliliğine yansıyor yansımadığını görmek için XTT temelli hücre proliferasyonu analizi yapılmıştır. Taranan ilaç dirençli hatlarda PKD2’nin susturulmasının sözkonusu ilaçlara dirençlilikte etkili olmadığı gözlenmiştir. Bu durum, çeşitli ihtimallerin varlığına işaret etmektedir. Öncelikle, etkin bir şekilde PKD2 susturulmuş olsa dahi, transfeksiyonun geçici olması nedeniyle, ortaya çıkması uzun zaman alabilecek etkiler gözlenememiş olabilir. Diğer yandan, PKD2, ABC taşıyıcı protein ifadesi ya da apoptoz ile ilişkili proteinlerin ifadesini düzenliyor olsa dahi bunu diğer proteinlerle etkileşerek sağlamakta; kendi başına gen ifadelerini etkilememektedir. PKD2 ile başlatılan sinyal

yolağının alt kısımlarında yer alan proteinler, PKD2'den bağımsız olarak alternatif yollarla da kontrol ediliyor olabilir. Dolayısıyla PKD2'nin yokluğu toplam etkiyi değiştirmeyecektir. Benzer bir şekilde, PKD2'nin de yer aldığı sinyal yolları da regülasyona tabiidir; bu nedenle yeniden yapılandırılan sinyal yolları PKD2'nin ifadesinden ya da aktivitesinden etkilenmiyor olabilir.

Yukarıda bahsedildiği şekilde, ilaca uzunca bir süre maruz bırakılarak geliştirilen dirençlilik, hücre fenotipinde ciddi değişikliklere neden olabilmekte; ilaca karşı tepkide ana hücre hattından oldukça farklı davranışlar sergilenmesine neden olmaktadır. Örneğin henüz basılmamış olan bir çalışmamızda IC₅₀ dozunda doksorubisin verilen MCF7/DOX hücreleri –aynı miktarda hücre ölümü gözlenmesine rağmen– IC₅₀ dozunda doksorubisin verilen MCF7 hücrelerinin ifadesini artırıp azalttığı pro- ya da anti-apoptotik hiçbir genin ifadesini değiştirmemektedir. Dolayısıyla, herhangi bir değişimin gözlemlenmemesi, o sistem için sözkonusu proteinin ilaç dirençliliğinde gerçekten bir rolü olmadığını gösterebilir. Elde edilen bu sonuçlar, edinilmiş ilaç dirençliliğinde PKD2'nin rolünü tam olarak ortaya koyamamıştır.

PKD2'nin susturulmasının toplamda, ilaç dirençliliğine bir etkisi gözlenmemiştir. Ancak, PKD2'nin susturulmasının taşıyıcı proteinlerin ve apoptoz ile ilgili genlerin ifadelerinde bir değişikliği neden olup olmadığı test edilmiştir. MCF7/DOX hücre hattında taranan MDR1, cFLIP, Survivin, PUMA genlerinin ifadeleri doksoubisin varlığında PKD2'nin susturulmasından etkilenmemiştir. Bu da MCF7/DOX hücrelerinde sözkonusu genlerin PKD2 tarafında regüle edilmediğini göstermektedir.

Sonuç olarak; deney kurgumuz çerçevesinde ana MCF7 hücre hattı ile karşılaştırılabilir düzeyde PKD2 ifade eden MCF7/DOX, MCF7/ETO ve MCF7/ZOL hücre hatlarında ilaç dirençliliği PKD2 ifadesinden bağımsız olarak düzenlenmektedir. İlaç stresinin olmadığı durumlarda sadece PKD2'nin susturulmasının hücre büyümesi ya da apoptozu üzerine bir etkisi gözlenmemiştir. Çalışmanın daha net sonuçlara varması için şu öneriler getirilebilir: shRNA vektörler ile bahsi geçen hücre hatlarında PKD2 ifadesi kalıcı olarak susturulabilir ve bu susturmanın uzun vadede etkileri incelenebilir. siRNA ya da shRNA uygulamalarına paralel olarak mevcut PKD2'ye özel küçük molekül inhibitörler kullanılabilir. Sitotoksikite analizleri için doğrudan apoptozu ölçen Annexin V boyama gibi daha hassas analiz yöntemleri seçilebilir.

5. Kaynakça

- Azoitei, N. et al. Glioblastoma growth and tumor formation. *Neuro. Oncol.* 13, 710–724 (2011).
- Bangert A, Cristofanon S, Eckhardt I, Abhari B A, Kolodziej S, Häcker S, Vellanki S H K, Lausen J, Debatin K M and Fulda S. Histone deacetylase inhibitors sensitize glioblastoma cells to TRAIL-induced apoptosis by c-myc-mediated downregulation of cFLIP. *Oncogene* 31, 4677-4688. (2012)
- Basu, A., PKC and resistance to chemotherapeutic agents, Protein kinase C in cancer signaling and therapy, ed: Kazanietz, M.G., Springer Science + Business Media, New York, 2010, pg.409-411
- Becker W. M., Kleinsmith L. J., Hardin J. The world of the cell, Pearson Education, San Francisco, (2006), pg. 762-775
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–54 (1976).
- Chen, J. et al. PKD2 mediates multi-drug resistance in breast cancer cells through modulation of P-glycoprotein expression. *Cancer Lett.* 300, 48–56 (2011).
- Davis, J. M. et al. Raf-1 and Bcl-2 Induce Distinct and Common Pathways That Contribute to Breast Cancer Drug Resistance Raf-1 and Bcl-2 Induce Distinct and Common Pathways That Contribute to Breast Cancer Drug Resistance 1. 1161–1170 (2003).
- Day, T. W. et al. c-FLIP gene silencing eliminates tumor cells in breast cancer xenografts without affecting stromal cells. *Anticancer Res.* 29, 3883–6 (2009).
- Doyle, L. A. & Ross, D. D. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 22, 7340–58 (2003).
- Eiseler, T., Döppler, H., Yan, I. K., Goodison, S. & Storz, P. Protein kinase D1 regulates matrix metalloproteinase expression and inhibits breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Res.* 11, R13 (2009).
- Gill, P. K., Gescher, a & Gant, T. W. Regulation of MDR1 promoter activity in human breast carcinoma cells by protein kinase C isozymes alpha and theta. *Eur. J. Biochem.* 268, 4151–7 (2001).
- Gomez-Lazaro, M. et al. 6-Hydroxydopamine activates the mitochondrial apoptosis pathway through p38 MAPK-mediated, p53-independent activation of Bax and PUMA. *J. Neurochem.* 104, 1599–612 (2008).
- Gottesman, M. M., Fojo, T. & Bates, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* 2, 48–58 (2002).
- Hao, Q., McKenzie, R., Gan, H. & Tang, H. Protein kinases D2 and D3 are novel growth regulators in HCC1806 triple-negative breast cancer cells. *Anticancer Res.* 33, 393–9 (2013).

- Hao, Q., Wang, L., Zhao, Z. J. & Tang, H. Identification of protein kinase D2 as a pivotal regulator of endothelial cell proliferation, migration, and angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 284, 799–806 (2009).
- Işeri, O. D. *et al.* Drug resistant MCF-7 cells exhibit epithelial-mesenchymal transition gene expression pattern. *Biomed. Pharmacother.* 65, 40–5 (2011).
- Kaplan, E. & Gündüz, U. Expression analysis of TOP2A, MSH2 and MLH1 genes in MCF7 cells at different levels of etoposide resistance. *Biomed. Pharmacother.* 66, 29–35 (2012).
- Karam, M., Legay, C., Auclair, C. & Ricort, J.-M. Protein kinase D1 stimulates proliferation and enhances tumorigenesis of MCF7 human breast cancer cells through a MEK/ERK-dependent signaling pathway. *Exp. Cell Res.* 318, 558–69 (2012).
- Kars, M. D. *et al.* Development of rational in vitro models for drug resistance in breast cancer and modulation of MDR by selected compounds. *Anticancer Res.* 26, 4559–68 (2006).
- Kars, M. D., Işeri, O. D., Ural, A. U. & Gündüz, U. In vitro evaluation of zoledronic acid resistance developed in MCF7 cells. *Anticancer Res.* 27, 4031–7 (2007).
- Liu, F., Xie, Z.-H., Cai, G.-P. & Jiang, Y.-Y. The effect of survivin on multidrug resistance mediated by P-glycoprotein in MCF7 and its adriamycin resistant cells. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 2279–83 (2007).
- Longley, D. B. & Johnston, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol.* 205, 275–92 (2005).
- Lu, X., Tied up in loops: positive and negative autoregulation of p53, *The p53 family*, ed: Levine, A. J., Lane, D.P., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2010, pg. 117
- Nakano, K. & Vousden, K. H. PUMA , a Novel Proapoptotic Gene , Is Induced by p53 National Cancer Institute at Frederick. 7, 683–694 (2001).
- Rozengurt, E. Protein kinase D signaling: multiple biological functions in health and disease. *Physiology (Bethesda)*. 26, 23–33 (2011).
- Rozengurt, E., Rey, O. & Waldron, R. T. Protein kinase D signaling. *J. Biol. Chem.* 280, 13205–8 (2005).
- Rozengurt, E., Regulation and function of protein kinase D signaling, *Protein kinase C in cancer signaling and therapy*, ed: Kazanietz, M.G., Springer Science + Business Media, New York, 2010, pg.138-139
- Scotto, K. W. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* 22, 7496–511 (2003).
- Steinberg, S. F. Regulation of protein kinase D1 activity. *Mol. Pharmacol.* 81, 284–91 (2012).
- Storz, P., Protein kinase D signaling in cancer, *Cell Signaling & Molecular Targets in Cancer*, ed: Chatterjee, M., Kashfi, K., NY: Springer New York, New York, 245-271, (2012)

- Trauzold, A. et al. PKCmu prevents CD95-mediated apoptosis and enhances proliferation in pancreatic tumour cells. *Oncogene* 22, 8939–47 (2003).
- Urfali, Ç., Reversal of breast cancer resistance protein mediated multidrug resistance in MCF7 breast adenocarcinoma cell line (M.Sc. thesis), Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2012)
- Wang, L. et al. iASPPsv antagonizes apoptosis induced by chemotherapeutic agents in MCF7 cells and mouse thymocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2012). doi:10.1016/j.bbrc.2012.06.124
- Wang, Q. et al. Survivin up-regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP) through attenuating the suppression of p53 on NF-κB expression in MCF7/5-FU cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 2036–44 (2013).
- Wang, Z., Goulet, R., Stanton, K. J., Sadaria, M. & Nakshatri, H. Differential effect of anti-apoptotic genes Bcl-xL and c-FLIP on sensitivity of MCF7 breast cancer cells to paclitaxel and docetaxel. *Anticancer Res.* 25, 2367–79 (2005).
- Weinstein-oppenheimer, C. R. et al. Role of the Raf Signal Transduction Cascade in the in Vitro Resistance to the Anticancer Drug Doxorubicin Role of the Raf Signal Transduction Cascade in the in Vitro Resistance to the Anticancer Drug Doxorubicin 1. 2898–2907 (2001).
- Yuan, J. et al. Protein kinase d regulates cell death pathways in experimental pancreatitis. *Front. Physiol.* 3, 60 (2012).
- Yuan, J. et al. Role of BCRP as a biomarker for predicting resistance to 5-fluorouracil in breast cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 63, 1103–10 (2009).
- Zhang, W. *et al.* Chemoresistance to 5-fluorouracil induces epithelial-mesenchymal transition via up-regulation of Snail in MCF7 human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 679–85 (2012).
- Zhou, J. et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in cancer cells by the c-Jun NH2-terminal kinase. *Cancer Res.* 66, 445–52 (2006).

6. Ekler

6.1. cDNA Sentezinde Kullanılan RNA'ların Miktarları ve Safılıkları

cDNA sentezinden önce elde edilen RNA'ların derişimleri ve safılıkları spektroskopik olarak belirlenmiştir. Bu ölçümlerden bir tanesi temsili olarak Tablo 5'te belirtilmiştir.

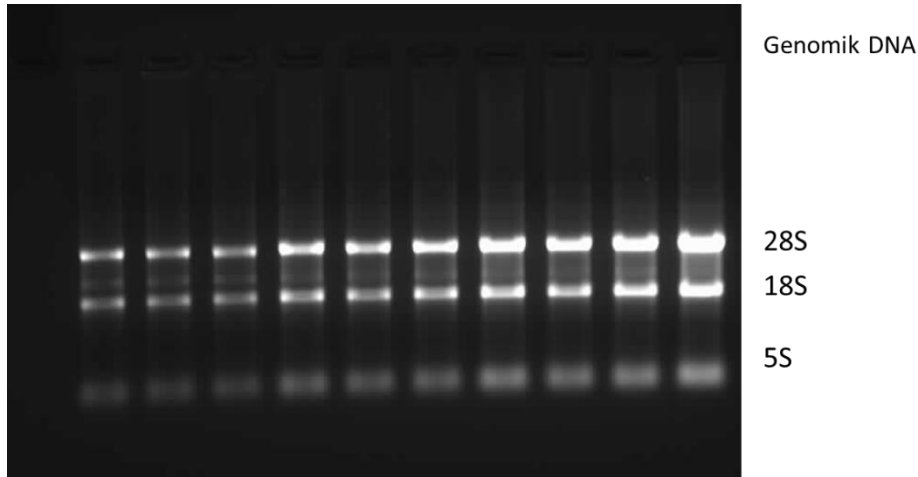
Örnek	RNA miktarı ng/ul	260/280
24 saat tranfekt edilmemiş	267.6	1.95
24 saat kontrol siRNA	248.8	1.92
24 saat PKD2 siRNA	273.1	1.95
48 saat tranfekt edilmemiş	414.2	1.95
48 saat kontrol siRNA	381.9	1.97
48h PKD2 siRNA	446.9	1.95
72 saat tranfekte edilmemiş	670.5	1.94
72 saat kontrol siRNA	578.1	1.94
72 saat PKD2 siRNA	669.1	1.96

Tablo 5: Elde edilen RNA'ların derişimleri ve safılıkları

cDNA sentezinde kullanılan RNA'ların derişimleri cDNA sentezlemeye yeterli olup; RNA'larda protein kontaminasyonu bulunmamaktadır.

6.2. Elde Edilen RNA'ların Sağlamlığı

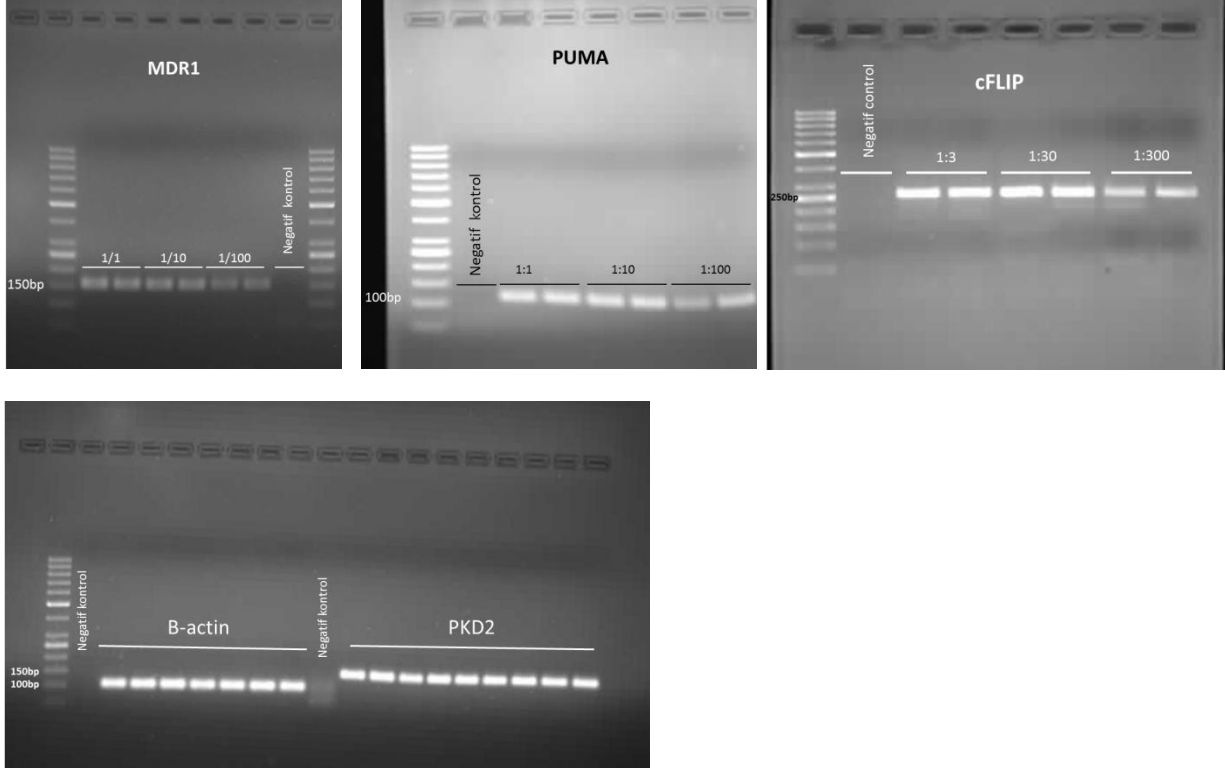
cDNA sentezinden önce elde edilen RNA'ların kalitesi 1%'lik agaroz jelde yürütülerek gözlemlenmiştir. Şekil 3'te gösterildiği gibi rRNA bantları sağlam, genomic DNA kontaminasyonu bulunmayan RNA'lar cDNA sentezinde kullanılmıştır.



Şekil 3: Elde edilen RNA'ların sağlamlığını gösteren temsili jel fotoğrafı

6.3. qPCR reaksiyon detayları

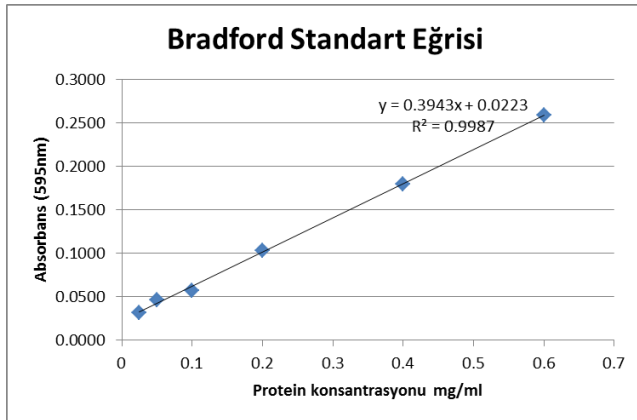
qPCR’da kullanılan primerler, spesifik çoğalma sağlamaktadır. Amplikon boyutları beklenildiği gibidir.



Şekil 4: İncelenen genlere ait spesifik çoğalma fotoğrafları

6.4. Bradford assay

Protein konsantrasyonu belirlemek için Bradford assay kullanılmıştır. Her assay için hazırlanan standart eğri Grafik 9’daki gibidir.



Grafik 9: Bradford standart eğrisi

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 112T714
Proje Başlığı: İlaç Dirençli Meme Kanseri Hücre Hatlarında Protein Kinaz D2 İfadesinin Dirençliliğe Etki Mekanizmalarının İncelenmesi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof. Dr. Ufuk GÜNDÜZ (Yürütücü) Dr. Serap YALÇIN
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Bölümü Dumlupınar Bulvarı No:1 06800 Çankaya/Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu Tunus Cad. No:80 06800 Kavaklıdere Ankara
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.02.2013-01.02.2014
Öz Kanserde ilaç dirençliliği, kanser tedavisinde en yaygın olarak yöntem olan kemoterapinin önünde ciddi bir engeldir. İlaç dirençliliği, bilinen mekanizmalar dışında hücre yaşamı için önemli olan diğer faktörle de gelişebilmektedir. Pek çok normal ve malign dokuda saptanan ve proliferasyon, invazyon gibi olaylarda etkili olduğu gösterilen protein kinaz D üyelerinin de ilaç dirençliliğinde rolleri olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda ilaç dirençli MCF7 hücre hatlarında protein kinaz D2'nin ilaç dirençliliğine ve apoptoza etkisi saptanmaya çalışılmıştır.
Anahtar Kelimeler: Protein kinaz D2, çoklu ilaç dirençliliği, apoptoz, MCF7

[Fikri Ürün Bildirim Formu](#) Sunuldu mu? Evet Gerekli Deęil

Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.

Projeden Yapılan Yayınlar: Proje kapsamında yayın hazırlanmaktadır.

Ekte Bulunan "ARDEB Başarı Öyküsü Formu", "Kazanımlar" Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Nitelięi Taşıdığını Düşünüyorsanız "ARDEB Başarı Öyküsü Formu"nu doldurunuz.