

TÜBİTAK

2006_350

TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu
Health Sciences Research Group

90359

**KANSER HÜCRELERİNDEKİ ÇOKLU
İLAÇ DİRENÇLİLİĞİNE KARŞI
DÜZENLEYİCİ YAPILAR**

(Resistance Modifiers against Multidrug Resistant Cancer Cells)

PROJE NO: SBAG-MACAR-2 (103S042)

**PROF. DR. EROL ÖMER ATALAY
DOÇ.DR. GÜLÇİN ABBAN
YARD. DOÇ.DR. AYFER ATALAY
DOÇ.DR GÜNFER TURGUT
YARD. DOÇ.DR. SEBAHAT TURGUT
ARAŞ. GÖR. SANEM YILDIZ**

**NİSAN 2006
DENİZLİ**

ÖNSÖZ

TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Grubu tarafından, Türk-Macar İkili İşbirliği Projesi kapsamında Desteklenen bu projede (SBAG-MACAR-2 / 103S042); kanser hücrelerinde gelişen çoklu ilaç dirençliliğini düzenleyen moleküllerin, güncel bir yöntem olan peptit kütüphaneleri kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
ŞEKİLLER	i
TABLolar	ii
ÖZ	iii
ABSTRACT	iv
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
P-glikoprotein ve Çoklu İlaç Dirençliliği	3
Peptit Kütüphaneleri	7
SPR (<i>Surface Plasmon Resonance</i>) Analizi	9
GEREÇLER VE YÖNTEMLER	13
Hücreler	13
Peptit Kütüphanesi	13
Peptit Kütüphanesinin çoğaltılması ve taranması sürecinde kullanılan çözeltiler	14
Peptit Kütüphanesinin Taranması	15
Faj Klonların FACS Analizi	17
DNA Dizi Analizi	17
Peptit Sentezi	17
İmmünohistokimyasal İnceleme	17
SPR (<i>Surface Plasmon Resonance</i>) Analizi	17
BULGULAR	18
Peptit Kütüphanesinden taranarak elde edilen klonların FACS analizi	18
ASGA01 Peptidi ile yapılan çalışmalar	19
DNA Dizi Analizleri	23
Bitki Özütleri	24
TARTIŞMA VE SONUÇ	25
KAYNAKLAR	28

ŞEKİLLER

	Sayfa No.
Şekil 1) P-glikoprotein hücre membranı üzerindeki yerleşimi ve işlevi	3
Şekil 2) P-glikoprotein (MDR1) membran üzerindeki yapılanması	4
Şekil 3) P-Glikoprotein işlevinde yer alan membran geçişli alt kümeler	4
Şekil 4) Filamentöz faj genomuna klonlanarak sunulan peptitler	7
Şekil 5) Faj içerisine klonlanmak üzere hazırlanan 16-mer'lik peptit kütüphanesi	8
Şekil 6) Peptit kütüphanesinden seçim işlemi (<i>panning</i>)	8
Şekil 7) Snell kanununa göre farklı ışığın farklı ortamlar arasındaki davranışı	10
Şekil 8) IASys SPR sisteminin çalışma şeması	10
Şekil 9) Işık ile metal kaplama (altın) yüzeyde oluşan yüzey plasmon polaritonu	11
Şekil 10) SPR sisteminde elde edilen verilerin cihaz tarafından sunulması	11
Şekil 11) Peptit kütüphanesinin vektör yapısı (M13KE) ve kütüphanenin vektördeki yerleşimi	14
Şekil 12) Tarama işleminde izlenen yaklaşım	16
Şekil 13) Fajların hücre membranı ile olası etkileşim türleri	16
Şekil 14) ASGA01 peptidi ile yapılan immünohistokimyasal çalışma	20
Şekil 15) ASGA01 peptidinin CMD küvete bağlanması	21
Şekil 16) ASGA01 peptidinin PAR hücreleri ile etkileşimi	21
Şekil 17) ASGA01 peptidinin MDR hücreleri ile etkileşimi	22
Şekil 18) ASGA01 peptidinin TFP ile etkileşimi	22
Şekil 19) PC4 faj klonunun DNA dizi analizi	23
Şekil 20) Farklı dizilere sahip olan seçilmiş klonlar	23

TABLULAR

	Sayfa No.
Tablo 1) Bazı P-glikoprotein substratları	6
Tablo 2) Bazı P-glikoprotein antagonistleri	6
Tablo 3) PC4 Faj klonuna ilişkin FACS verileri	18
Tablo 4) Faj MDR hücre etkileşimleri ve reversal etkisi	19
Tablo 5) Peptit-TFP etkileşimi	19
Tablo 6) Peptit-Verapamil etkileşimi	20

Yukarıdaki tablolarda yer alan substrat ve antagonistler, bu çalışmada kullanılan hücre kültürü sistemlerinde, plazma membranında lokalize edilmiş ve hücre dışına pompalanmışlardır. Tablo 1'de yer alan substratlar, P-glikoprotein tarafından hücre dışına pompalanmışlardır. Tablo 2'de yer alan antagonistler, P-glikoprotein tarafından hücre dışına pompalanmışlardır. Tablo 3'te yer alan FACS verileri, PC4 Faj klonuna ilişkin olarak elde edilmiştir. Tablo 4'te yer alan etkileşimler, MDR hücreleri ile Faj hücreleri arasında gerçekleşmiştir. Tablo 5'te yer alan etkileşim, Peptit-TFP arasında gerçekleşmiştir. Tablo 6'da yer alan etkileşim, Peptit-Verapamil arasında gerçekleşmiştir.

Yazar kelimeler: P-glikoprotein, hücre kültürü, plazma membranı

ÖZ

Kimyasal tedavi edici ajanlara (*kemoterapötikler*) karşı, bakteri, mantar, protozoa ve kanser hücrelerinde gelişen dirençliliğin oluşumundan birçok mekanizma sorumludur. Çoklu ilaç direnci (*multidrug resistance*), memeli hücrelerinde, özellikle tümör hücrelerinde, anti-tümör ilaçlara karşı gelişen ve ilacın hücre içerisine olan Emilimini engelleyen hücresel yanıtı tanımlayan bir kavramdır. Çoklu ilaç rezistansı gelişen bir hücrede; sitotoksik ilaçların azalan Emilimi, p-glikoprotein, glutatyon-S-transferaz π , protein kinaz gibi bazı hücresel proteinlerin aktiviteleri ile işlevlerinde ve plazma membranı, sitozolik pH gibi odakları etkileyen hücre biyofiziğindeki üç temel değişikliğin gözlenmesi söz konusudur. Kanser hücrelerindeki çoklu ilaç rezistansından sorumlu protein olarak P-glikoprotein hedeflenmesi en iyi bilinen modellerden bir tanesidir. Bu projede; p-glikoprotein eksprese eden model hücrelerde (L2178/MDR1a), çoklu ilaç difencini düzenleyen peptit moleküllerinin, faj gösterim (*phage display*) yöntemi ile elde edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen verilere göre; MDR eksprese eden hücreleri özgün olarak tanıyan ve TFP (*trifluoperazin*), verapamil gibi reversal moleküllerin etkilerini değiştiren peptit molekülü geliştirilmiştir. Projede elde edilen bir diğer sonuç ise; peptit kütüphanesinde seçilen bazı klonların mdr reversal molekül olarak davranabildiği saptanmıştır. Sonuç olarak; çoklu ilaç dirençliliği modelinde, yapay faj peptit kütüphanelerinin, membran biyofiziğine yönelik olarak yapılacak çalışmalarda yararlı bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: P-glikoprotein, mdr, peptit kütüphanesi, hücre hedefleme, mdr reversal

Kanser problemi, tüm ilaçlara dirençli kanserli hastaların tedavisi için önemli bir sorundur. Bu sorunu çözmek için birçok araştırma yapılmıştır. Çoklu ilaç direnci (MDR) için geliştirilen ilaçlar genellikle aynı mekanizma ile çalışır. Çünkü ilaç direnci genellikle multidrug direnci (MDR) olarak da bilinir. Bu nedenle, MDR'ye karşı etkili ilaçlar geliştirmek için yeni mekanizmalar araştırılmaktadır. Bu çalışmada, MDR'ye karşı etkili ilaçlar geliştirmek için yeni mekanizmalar araştırılmaktadır.

ABSTRACT

There are many mechanisms which are responsible for the development of multidrug resistance in bacteria, yeast, protozoa and cancer cells. Multidrug resistance is known as the resistance observed in the cells (especially in cancer cells) developed against drugs. In multidrug resistant cells; the decreased cytotoxic drug absorption, changes in some protein activities (like p-glycoprotein, glutathion-S-transferase π , protein kinase) and pH changes are observed as main biophysical behaviour. One of the best known model is p-glycoprotein responsible for multidrug resistancy in cancer cells. In our study; we aimed to develop recombinant peptides against human p-glycoprotein expressing model cells (L2178/MDR1a) from artificial peptide libraries. One peptide developed as targeting molecule for the recognition of MDR resistant cells. This recombinant peptide changes the mdr reversal effects of TFP (trifluoperazine) and verapamil. There are also other phage clones which might behave as mdr reversal molecules. Our results show that artificial peptide library approach will be powerful research tool in the field of membrane biophysics of the multidrug resistance.

Keywords: P-glycoprotein, mdr, peptide library, cell targeting, mdr reversal

GİRİŞ

Kanser problemi, tüm ileri tedavi uygulamalarına karşın Avrupa ülkelerinde ölüme neden olan hastalıklar arasında ikinci sırayı almaktadır. Hasta grupları içerisinde, kimyasal tedaviye (*kemoterapi*) karşı gelişen direnç ve yanıtızlık ortaya koyan olgular her geçen gün artmaktadır. Çoklu ilaç dirençliliği (*multidrug resistance*) olarak da tanımlanan bu hücrenel davranış, kanserin etkili kimyasal tedavisinde bir engel olarak ortaya çıkmaktadır. Çoklu ilaç dirençliliğine neden olan mekanizmalar içerisinde en iyi bilinen p-glikoprotein aracılığı ile gerçekleşen hücre davranışdır. P-glikoprotein; kanser hücrelerinde normalden fazla eksprese olarak, ilacın hücre içerisine alınmasını engellemekte ve kimyasal tedavinin başarısını olumsuz yönde etkilemektedir. Kanser tanı ve tedavisinde; hassas ve seçici algılama, direnç mekanizmalarının anlaşılaraq bozulması ve hücre hedefleme olmak üzere üç temel konuda araştırma ve geliştirme çalışmalarına gereksinim duyulmaktadır. Birçok araştırmacı p-glikoprotein işlevini bozan moleküller elde etmek amacına yönelik çalışma yapmaktadır. Çoklu ilaç dirençliliğini tersine çeviren (*multidrug resistance reversal*) çok sayıda molekül elde edilmiştir. Bu noktada ortaya çıkan bir başka sorun ise, direnci tersine çevirebilme yeteneği olan molekülün özgün biçimde hedef hücreye yönlendirilmesidir. Hücre hedeflemesinin (*cell targeting*) gerçekleştirilebilmesi için, ilgili kanser hücrelerini özgün biçimde algılayan molekül yapıların elde edilebilmesi önemlidir. Hücre membran biyofiziği alanında yapılmakta olan ve yapılacak çalışmalar bu kavramların aydınlatılmasına değerli katkılarda bulunabilecektir.

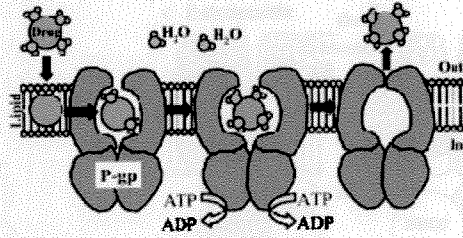
Gelişen gen teknolojisi ve bu teknolojinin birçok alandaki yansımaları, doğal olarak tanı ve tedaviye dönük kavramları da etkilemektedir. Rekombinant DNA yöntemleri bu yansımaları tetikleyerek, özellikle molekül düzeydeki algılama yöntemlerinde gelişmelere neden olmuştur. Yapay peptit kütüphanelerinin kullanımı, bu tür gelişmiş ve güncel teknolojilere bir örnek olarak verilebilecektir. Hücre membranı üzerindeki farklılıklar geliştirilebilecek peptit molekülleri ile algılanabilecek ve p-glikoprotein gibi işlevsel hücre membran proteinleri ile etkileşerek bu işlevlerde değişikliklere yol açabilecektir.

Türk-Macar İkili İşbirliği projesi; her iki tarafta da bulunan yetenek, bilgi ve deneyimin paylaşımını öngörmektedir. Bu öngörü doğrultusunda yapılan proje çalışmaları, seçilen model olan kanser hücrelerindeki çoklu ilaç dirençliliğini düzenleyici moleküllerin güncel yöntemler ile geliştirilmesi konusunda bir dizi ortak çalışmanın ilk adımını oluşturmaktadır. Macar araştırma grubu, kanser hücrelerindeki çoklu ilaç dirençliliğini tersine çevirebilen kimyasal yapılar konusunda uluslararası düzeyde önemli deneyime sahiptir. Türk tarafındaki çalışma grubu ise rekombinant algılayıcı moleküllerin geliştirilmesinde bilgi birikimi taşımaktadır. Proje çalışmalarımızda; insan p-glikoproteinini yüksek düzeyde eksprese eden fare lenfoma hücreleri modellenmiştir. Çalışmanın temel amacı, seçilen model hücrelerde algılama ve p-glikoprotein işlevi üzerinde etkin peptitlerin elde edilmesi ve bu yaklaşımın her iki grup içerisinde geliştirilerek sürdürülmesine olanak sağlayacak koşulların oluşturulmasıdır.

GENEL BİLGİLER

P-Glikoprotein ve Çoklu İlaç Dirençliliği

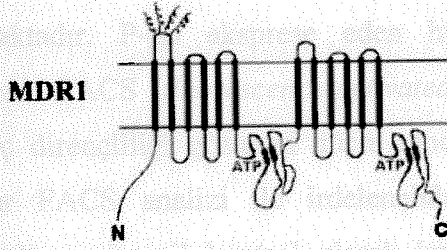
P-glikoprotein, ATP ile insan ABCB1 geni tarafından kodlanan ATP (adenozin trifosfat) bağlayan aileye ait bir membran proteinidir. ABCB1, ATP bağlayan aileden B alt grubuna ait olup aynı zamanda da, çoklu ilaç dirençliliği (*multidrug resistance, MDR*) geni olarak da bilinmektedir. İnsanda MDR genleri iki tane olup MDR1 ve MDR3 olarak tanımlanmaktadır. MDR1 geni tarafından kodlanan p-glikoprotein (P-gp) ilaç dışı atılım transporter (*drug efflux transporter*) molekülü olarak işlev görmektedir. Kanser hücrelerinde aşırı düzeyde eksprese olan bu molekül, ilacın hücre içerisine alımını engellemektedir. Bu davranış, aşırı oranda sentezlenen P-gp'nin, uygulanan kimyasal tedavinin başarısını, etkilemesine yol açmaktadır. P-gp bu işlevi, ilgili kimyasal maddeyi hücre membranı lipid tabakası içerisinde tutuklayıp dışarı atarak gerçekleştirmektedir (Şekil 1) (1, 2).



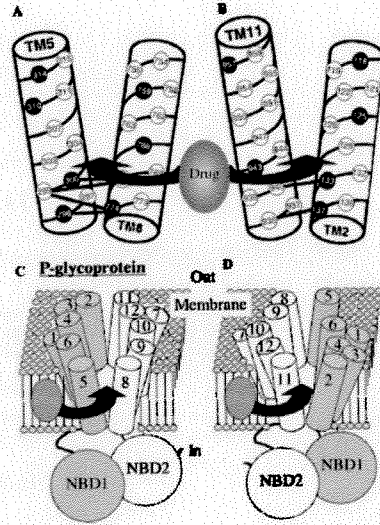
Şekil 1) P-glikoproteininin hücre membranı üzerindeki yerleşimi ve işlevi (2)

P-glikoprotein; 1280 amino asit içeriğine sahip, hücre membranı üzerinde hücre dışı ve içine uzanacak biçimde yerleşmiş bir membran geçişli (*transmembrane, TM*) proteindir. Moleküler ağırlığı 170 kDa olan bu protein, hücre membranı üzerindeki yapılanmasında altı membran geçişli parçadan (*segment*) oluşmaktadır. Genel olarak bakıldığında, her biri ATP bağlayan küme ile sonlanan ve bir ara bağlayıcı (*linker*) ile ilişkilenen iki homolog parçadan oluşan bu yapı içerisinde toplam 12 adet alt küme (TM1/TM12) yer almaktadır (Şekil 2) (3-4).

P-gp substratları, P-gp substratları, parasetamol, vinkristin gibi çok sayıda ilaçtır. Diğer taraftan, kalayum kanalı blokörleri, kardiyak ilaçlar, antiemetik ilaçlar gibi birçok molekül aynı zamanda P-gp substratları olarak kabul edilmektedir. Bazı P-gp inhibitörleri ve antagonistleri Tablo 1'de gösterilmiştir. P-glikoprotein ve çoklu ilaç dirençliliği ile ilgili model hücre



Şekil 2) P-glikoprotein (MDR1) membran üzerindeki yapılanması (5)



Şekil 3) P-Glikoprotein işlevinde yer alan membran geçişli alt kümeler (3)
TM: membran geçişli kümeler, NBD-nükleotit bağlayan kümeler

Loo ve Clarke'a göre, P-glikoprotein membran geçişli kümelerden (TM) ikili biçimde TM5/TM8 ile TM2/TM11 çiftinin, hücre membranı lipid tabakaya girişte, işlev gördüğü öngörülmektedir (Şekil 3) (4). Bu ilişkiler, protein yapısındaki konformasyonel değişimler ile tetiklenmekte ve algılanmaktadır. P-gp antrasiklinler, antrasenler, vinka alkaloidleri gibi çok sayıda substratı kullanmaktadır. Diğer taraftan, kalsiyum kanal blokörleri, kalmodulin antagonistleri, hidrofobik peptitler, antihistaminik ilaçlar gibi birçok molekül aynı zamanda da P-gp antagonisti olarak işlev görmektedir. Bazı P-gp substratları ve antagonistleri Tablo 1 ve Tablo 2'de verilmektedir. P-glikoprotein ve çoklu ilaç dirençliliği ile ilgili model hücre

sistemlerinde listede bazıları gösterilen substrat ve antagonist moleküller kontrol olarak kullanılmaktadır. P-gp eksprese eden hücre sistemlerinde, p-glikoprotein etkinliğinin izlenmesinde FACS (*fluorescence-activated cell sorter*) analizi önemli bir yer tutmaktadır. Çoklu ilaç dirençliliği gösteren hücre modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda geliştirilen moleküller FACS analizi ile irdelenebilmektedir. Proje çalışmalarında yapılan FACS analizlerinde verapamil kontrol olarak kullanılmış ve izleme rodamin alımı (*rhodamine uptake*) ile yapılmıştır.

P-glikoprotein tüm özellikleri özellikle hücre membran biyofiziği açısından yararlı bir model sistemdir. Gerek çoklu ilaç dirençliliği ve gerekse de hücre hedefleme çalışmalarında bu protein ile etkileşen moleküllerin etkileşim doğalarının aydınlatılması, önemli bir deneysel yaklaşımdır.

Tablo 1) Bazı P-glikoprotein substratları ^(a)

P-GLİKOPROTEİN SUBSTRATLARI	KİMYASAL MADDE
Antrasiklinler	Daunorubisin
	Doksorubisin
	Epirubisin
Antrasenler	Bisantren
	Mitoksantron
Vinka Alkaloidleri	Vinblastin
	Vinkristin
	Vinorelbin
	Vindesin
Tubulin polimerleştirici ilaçlar	Kolşisin
	Paklitaksel
	Dosetaksel
HIV-1 proteaz inhibitörleri	Ritonavir
	Sakinavir
	Indinavir
Fluorofor	Kalsein-AM
	Rodamin 123

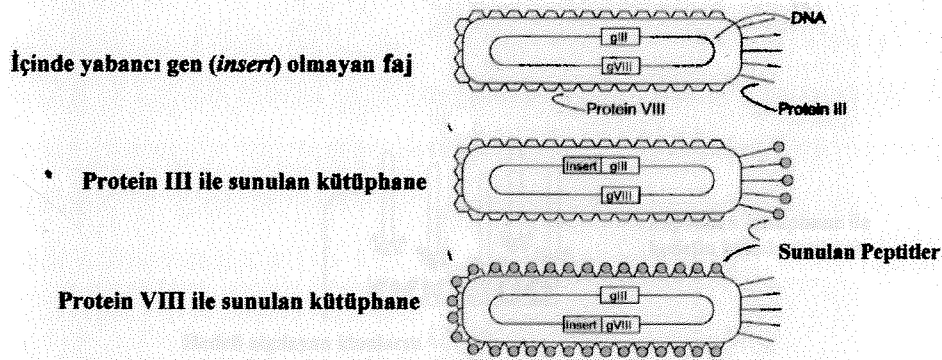
Tablo 2) Bazı P-glikoprotein antagonistleri ^(a)

P-GLİKOPROTEİN ANTAGONİSTLERİ	KİMYASAL MADDE
Kalsiyum kanal blokörleri	Verapamil
	Diltiazem
Kalmodulin antagonistleri	Trifluoperazin
	Klorpromazin
	Triflopromazin
	Flufenazin
Antiaritmikler	Kinidin
	Amiodaron
	Propafenon
Antihipertansifler	Rezerpin
	Propranolol
Antihistaminikler	Prometazin
	Terfenadin
Hormonlar	Progesteron
	Spirolakton
	Tamoksifen

(a) Litman et al, CMLS 58: 931-959, 2001

Peptit Kütüphaneleri

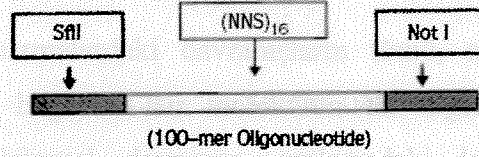
Faj gösterim (*phage display*) tekniği temel olarak, filamentöz fajlar üzerinde protein ve peptit kütüphanelerinin sunulabilmesi ve sunulan bu kütüphanelerin özgün hedefler için taranmasını olanaklı kılan bir yöntemdir (6). Yapay peptit kütüphaneleri faj gösterim tekniği içerisinde yer almaktadır. Bu kütüphaneler, filamentöz faj üzerinde yer alan kılıf proteinleri ile birlikte dış ortama sunulacak şekilde ilgili faj genomuna klonlanırlar. Bu amaçla kullanılacak kılıf proteinleri protein VIII ve protein III olarak bilinmektedir. Protein VIII çok daha fazla kopya sayısına sahip olmakla birlikte, bu teknolojinin uygulanmasında daha çok beş kopya olarak faj üzerinde yer alan protein III kullanılmaktadır (Şekil 4). Yapay peptit kütüphaneleri, geniş biçimde, saflaştırılmış model proteinler, hücreler veya organlar hedef kullanılarak bu hedefleri algılayabilen peptitlerin elde edilmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca çift iplikli DNA (dsDNA) dizilerini özgün olarak algılayabilen peptitler de geliştirilebilmektedir (6–9).



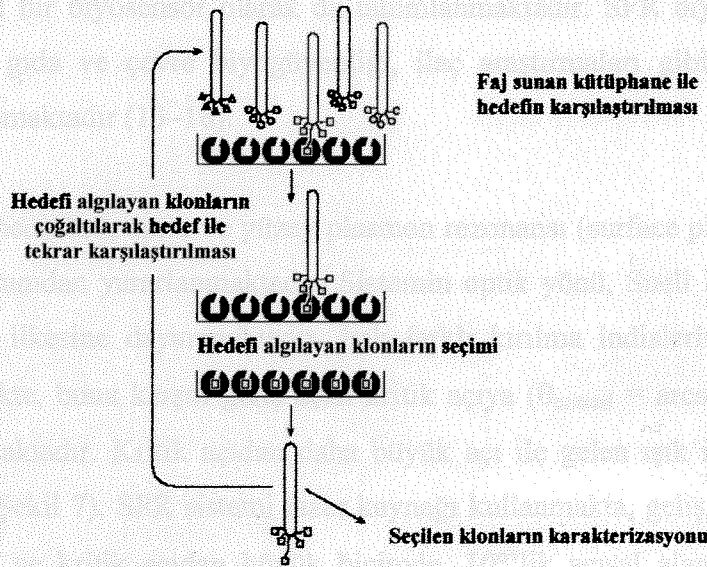
Şekil 4) Filamentöz faj genomuna klonlanarak sunulan peptitler

Yapay peptit kütüphaneleri oluşturulurken, kütüphanenin boyutuna göre yapay olarak sentezlenen (örneğin oligonükleotit sentezleyicide) peptiti kodlayan DNA parçası ilgili fajın içerisine protein III ile birlikte üretilecek biçimde, restriksiyon enzimleri kullanılarak klonlanır. Şekil 5'de bu şekilde hazırlanmış 16-mer'lik peptit kütüphanesi örneği verilmektedir. Bu ve benzeri yöntemler ile hazırlanmış bir kütüphanede 10^7 – 10^9 farklı peptit dizisi faj üzerinde sunulabilmektedir. Hedefi algılayan peptitleri sunan fajlar alınarak içeriklerindeki peptit dizisi saptanabilmektedir. Hedef ile karşılaştırılan peptit kütüphanesi

sunan fajlardan hedefe bağlananlar alınmakta ve bir sonraki karşılaştırma işlemi için tekrar çoğaltılmaktadır (Şekil 6). Hedefi algılayan peptitlerin zenginleştirilerek elde edilmesi tekrarlayan karşılaştırmaları gerektirmektedir. Genellikle 3-4 kez bu karşılaştırma işlemi tekrarlanmaktadır. Bazı özel durumlarda, bu tekrarlama işlemi daha çok sayıda da olabilmektedir.



Şekil 5) Faj içerisinde klonlanmak üzere hazırlanan 16-mer'lik peptit kütüphanesi
 N: A,C,G,T
 S: G,C
 Sfi I ve Not I: Klonlama işleminde kullanılacak restriksiyon enzimleri



Şekil 6) Peptit kütüphanesinden seçim işlemi (*panning*)

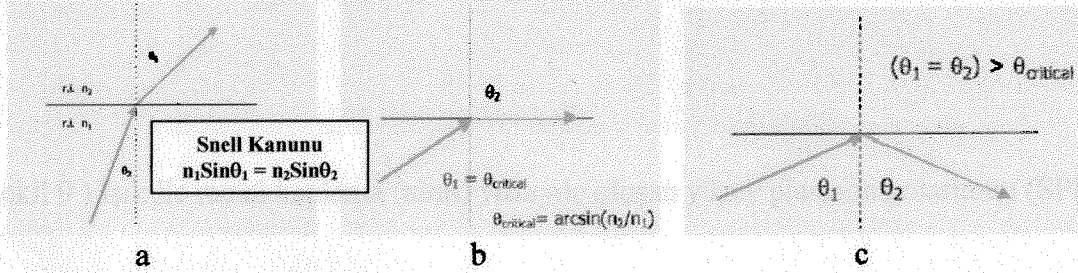
Peptit kütüphanelerinden elde edilen klonlar, fajın içerisindeki DNA dizileri okunarak tanımlanmaktadır. Ayrıca peptitin hedefi ile olan ilişkileri Faj-ELİZA, SPR (*surface plasmon resonance*) gibi yöntemlerle belirlenmekte ve etkileşimin doğasına ilişkin bilgiler elde edilmektedir. Bu şekilde tanımlanan peptitler; tümörlerin hedeflenmesi (*tumour targeting*) ve bu hedeflere doksorubisin gibi kimyasalların taşınmasında kullanılabilme potansiyeline sahip aday yeni nesil moleküllerdir (8–12).

SPR (*Surface Plasmon Resonance*) Analizi:

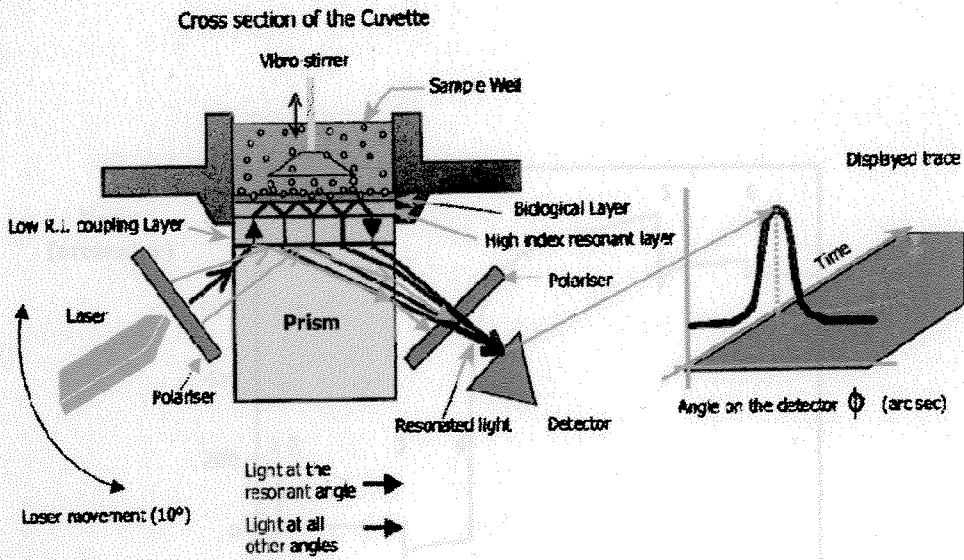
Biyolojik mekanizmalardaki davranışların tümü, moleküllerin birbirleri ile olan etkileşim yeteneklerine bağlıdır. Bir molekülün bir diğer moleküle etkileşerek sistem içerisindeki yeri ve işlevsel davranışı, aralarındaki konformasyonel uyumluluk ile belirlenmektedir. Antijen-antikor, hormon-reseptör ilişkileri, hücre içi ve hücreler arası sinyal iletisi gibi birçok biyolojik davranış, protein-protein ve nükleik asit (DNA, RNA)-protein etkileşimleri ile gerçekleşmektedir. Bu etkileşimlerin doğasının belirlenmesinde moleküllerin birbirlerine olan ilgisi (*affinity*), kinetik özellikleri, mekaniksel ve termodinamik özellikleri önemli yer tutmaktadır. SPR, işaretleme gereksinimi olmaksızın (*label free*) bu özelliklerin izlenmesi ve kayıtlanmasını sağlayan güncel biyofiziksel bir yaklaşımdır. SPR yaklaşımı aynı zamanda güncel bir biyosensör olarak da tanımlanmaktadır. SPR biyosensörleri; tıbbi tanı, biyoteknoloji, gıda ve çevre biyogüvenliği, ilaç araştırmaları gibi birçok alanda yoğun biçimde kullanılmaktadır (13–16).

SPR biyosensörü, optik ve yüzey plasmon rezonansı (*surface plasmon resonance*) gibi iki fiziksel kavramdan yararlanmaktadır. Sistemin optik yönü, Snell Kanunu ile tanımlanan ışığın kırılması ilkesine dayanmaktadır. Işık farklı kırılma indislerine sahip iki ortamdan kırılarak geçmekte, buna karşın geliş açısı kritik açıya ($\theta_{critical} = \arcsin[n_2/n_1]$) eşit ise geliş yüzeyinde kalmaktadır. Kritik açıdan daha büyük açı ile gelen ışık ise geldiği ortama geri yansımaktadır (Şekil 7). SPR sistemi lazer kaynağı kullanmakta, geliş açısı ile yansıma açısı birbirlerine eşit ve kritik açıdan büyük biçimde, 10°'lik açısal alanda hareket etmektedir (Şekil 8). Sistemin diğer fiziksel özelliği ise; ışığın çarptığı yüzeyin, plasmon rezonansı olarak da tanımlanan özel bir elektromanyetik alan oluşturabilme yeteneği taşıyan, ince metal tabaka ile kaplanmış olmasıdır. Kimyasal kararlılığından ötürü, SPR biyosensörlerinde bu metal kaplama için, altın kullanılmaktadır. Işık altın kaplı ince tabakaya çarptığı anda, metal kaplama elektromanyetik alan karakterine sahip yüzey, yüzey plasmon dalgası da denilen,

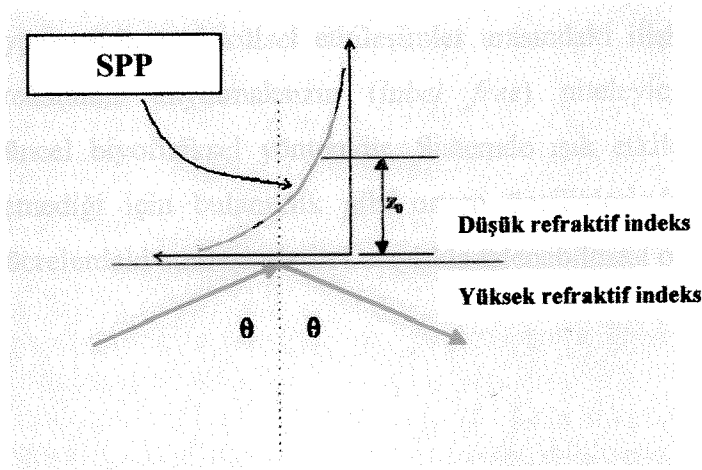
yüzey plasmon polaritonu (SPP) (*surface plasmon polariton*) oluşturmaktadır (15) (Şekil 9). Metal kaplama üzerinde biyolojik etkileşim yüzeyi bulunmaktadır. Biyolojik etkileşim yüzeyi üzerine etkileşim yapan çiftlerden bir tanesi, örneğin antikor sabitlenmektedir. Bu sabitlenmiş molekül ile etkileşebilen antikor bu yüzey ile temas ettiğinde aralarında gelişen etkileşim ortamın refraktif indeksini değiştirmekte ve bu değişim yansıyan ışık ile, sistem tarafından kaydedilmektedir. Sistem tarafından elde edilen kayıtlar bağlanma eğrisi olarak verilmektedir.



Şekil 7) Snell kanununa göre farklı ışığın farklı ortamlar arasındaki davranışı

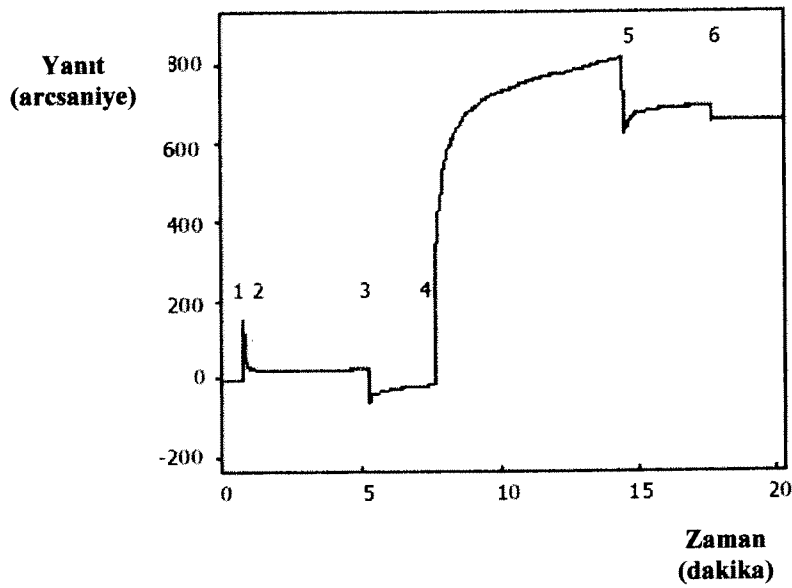


Şekil 8) IASys SPR sisteminin çalışma şeması



Şekil 9) Işık ile metal kaplama (altın) yüzeyde oluşan yüzey plasmon polaritonu (SPP)

Elde edilen veriler, etkileşimden kaynaklanan bağlanma (*association*), ayrılma (*dissociation*), yüzey üzerindeki kimyasal tepkime gibi değişiklikleri yanıt (*response*, *arcseconds*) olarak belirtilmektedir. Bağlanma eğrisi, iki molekül arasındaki etkileşimden kaynaklanan refraktif indekse bağlı değişikliklerin zamana karşı biçiminde çizimidir (Şekil 10).



Şekil 10) SPR sisteminde elde edilen verilerin cihaz tarafından sunulması

SPR biyosensörü; molekölsele etkileşimler arasındaki ilişkilerin, gerçek zamanlı ve işaretleme gereksinimi duyulmaksızın (*label free*) niteleyici ve niceleyici biçimde izlenebildiği güncel biyofiziksel yöntemdir. Sistemde ışık etkileşimin gerçekleştiği küvet içerisinden geçmediği için bulanıklık gibi ortam özelliklerinden etkilenmemektedir. Bu nedenle canlı hücrelerdeki etkileşimlerin kolaylıkla izlenebilmesi olanaklı hale gelmektedir.

GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Hücreler:

Proje çalışmasında; L2178 fare lenfoma hücreleri (PAR, *parental*) ve insan p-likoproteini eksprese eden L1278 fare lenfoma hücreleri (MDR, L2178-MDR1/A) olmak üzere iki hücre türü kullanıldı. Bu hücreler proje çalışmalarını süresince kullanılmak üzere Macar ortak tarafından verildi. Hücreler Mc Coy 5A ortamı içerisinde, 37°C'ta ve % 5,0 karbondioksit ortamında kültüre alındı. MDR hücreleri için kültür ortamına kolşisin eklendi.

Peptit Kütüphanesi:

Proje çalışmalarında hücrelere karşı özgün biçimde geliştirilecek peptitlerin seçimi için, PhD-12™ Faj peptit kütüphanesi kiti (PhD-12™ Phage Display Peptide Library Kit, Katalog No. E8110S, New England Biolabs, Cambridge MA02139) kullanıldı.

Kit içeriğinde yer alan malzemeler:

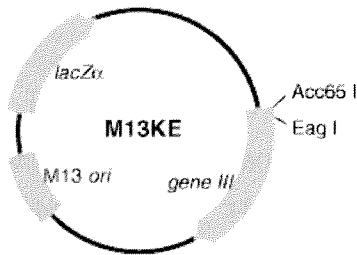
- Faj peptit kütüphanesi: Bu kütüphane 12-mer'lik rasgele biçimde yapay olarak klonlanan peptitleri içermektedir (Şekil 11). Kütüphane, % 50 gliserol içeren TBS içerisinde saklanmaktadır. $1,5 \times 10^{13}$ pfu (*plaque forming unit*) / ml derişimde faj içermektedir. Peptit kütüphanesi $2,7 \times 10^9$ farklı peptit bulundurmaktadır. Her tarama işlemi için 10 µl kütüphane kullanıldı.
- Dizi analizi için primer dizileri: Bu diziler el ile yapılan radyoaktif dizi analizi ve radyoaktif olmayan floresan dizi analiz sistemleri için olmak iki farklı dizidir.
 - 28 gIII primeri: 5'-GTATGGGATTTTGCTAAACAAC-3'
 - 96 gIII primeri: 5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3'Laboratuvarımızda BECKMAN CEQ8000 Genetik Analiz Sistemi bulunduğu için -96 gIII primeri kullanıldı (Şekil 11).
- E.Coli ER2738 konakçı bakterisi: faj peptit kütüphanesinin çoğaltılması için kullanıldı.

Peptit Kütüphanesinin çoğaltılması ve taranması sürecinde kullanılan çözeltiler:

LB Ortamı: 10 g Bacto-Tryptone, 5 g maya ekstresi (yeast extract), 5 g NaCl tartılarak bir litrede çözüldü. Otoklav yapıldıktan sonra oda sıcaklığında saklandı.

LB/IPTG/Xgal Petri Kapları: LB ortamına 15 g/L derişimde agar eklendi ve otoklavlandı. Otoklav sonrasında 60-65°C sıcaklığa kadar soğutulurak 1 ml IPTG/Xgal çözeltisi eklendi. Karıştırılarak plastik tek kullanımlık steril petri kaplarına döküldü. Bu şekilde hazırlanan petri kapları 4°C'ta saklandı.

IPTG/Xgal Çözeltisi: Dimetilformamid içerisinde 1,25 g IPTG (izopropil β-D-tiyogalaktozid) ve 1,00 g Xgal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozid) çözüldü ve 25 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti -20°C'ta karanlıkta saklandı.



```

                    pIII leader sequence                Kpn I
5' ...TTA TTC GCA ATT CCT TTA GTG GTA CCT TTC TAT TGT CAC TCT
3' ...AAAT AAG CGT TAA GGA AAT CAC CAT GGA AAG ATA AGA GTG AGA
...Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser His Ser

Start of mature 12-mer peptide-gIII fusion
↓
NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK GGT GGA GGT
NNH NNH NNH NNH NNH NNH NNH NNH NNH NNH NNH CCA CCT CCA
Xxx Xxx Xxx Xxx Xxx Xxx Xxx Xxx Xxx Xxx Xxx Gly Gly Gly

                    Eag I
TEG GCC GAA ACT GTT GAA AGT TGT TTA GCA AAA TCC CAT ACA GAA
AGC CGG CTT TGA CAA CTT TCA ACA AAT CGT TTT AGG GTA TGT CTT
Ser Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Ser His Thr Glu
← -28 sequencing primer

AAT TCA TTT ACT AAC GTC TGG AAA GAC GAC AAA ACT TTA GAT
TTA AGT AAA TGA TTG CAG ACC TTT CTG CTG TTT TGA AAT CTA
Asn Ser Phe Thr Asn Val Trp Lys Asp Asp Lys Thr Leu Asp

CGT TAC GCT AAC TAT GAG GGC... 3'
GCA ATG CGA TTG ATA CTC CCG... 5'
Arg Tyr Ala Asn Tyr Glu Gly...
← -96 sequencing primer

```

K = G or T; M = A or C

Şekil 11) Peptit kütüphanesinin vektör yapısı (M13KE) kütüphanenin vektördeki yerleşimi

Üst agaroz: IPTG/Xgal petriyer üzerine dökülerek fajların büyütüldüğü ve izlendiği üst tabakayı oluşturmak amacıyla kullanıldı. 10 g Bacto-Tryptone, 5 g maya ekstresi (yeast extract), 5 g NaCl, 1 g MgCl₂.6H₂O ve 7 g agaroz tartılarak bir litrede çözüldü. Otoklav yapıldıktan sonra 50 mL'lik bölümlere ayrılarak oda sıcaklığında saklandı. Gerekğinde mikrodalga fırında eritilerek kullanıldı.

LB-Tet Petri Kapları: LB ortamı içerisinde 15 g/L derişimde Agar hazırlandı. Otoklav edildikten sonra 60-65°C sıcaklığa kadar soğutularak üzerine 1 mL tetrasiklin eklendi. Karıştırılarak plastik tek kullanımlık steril petri kaplarına döküldü. Bu şekilde hazırlanan petri kapları 4°C'ta saklandı.

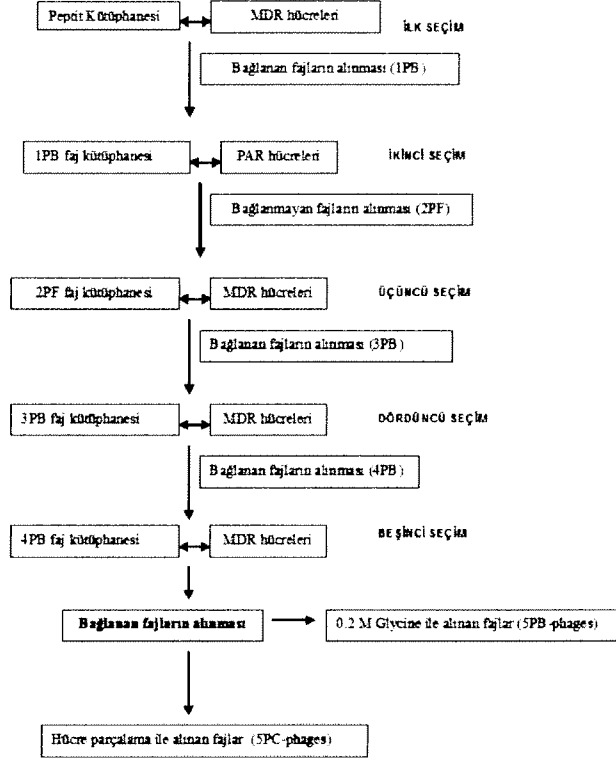
TBS Çözeltisi: İçeriğinde 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) ve 150 mM NaCl olacak şekilde hazırlandı. Otoklav edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

PEG/NaCl Çözeltisi: Fajların toplanarak çöktürülmesi işlemi için kullanıldı. İçeriğinde % 20 (w/v) polietilenglikol 8000 ve 2,5 M NaCl olacak şekilde hazırlandı. Otoklav edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

Peptit Kütüphanesinin Taranması:

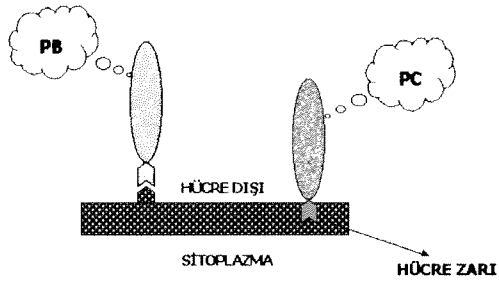
Peptit kütüphanesinin taranması (*panning*) işlemi; hedef hücreler ile karşılaştırma, elde edilen fajların toplanması, çoğaltılması, faj titrasyonunun belirlenmesi ve faj plaklarının toplanması yöntemleri PhD-12™ Faj peptit kütüphanesi kiti içerisinde yer alan yöntem ve önerilere göre uygulandı.

Tarama işleminde kullanılan hedefler PAR ve MDR hücreleri olarak kullanıldı. MDR hücrelerine özgü klonların elde edilebilmesi amacıyla karşılaştırmalı tarama yaklaşımı kullanıldı (Şekil 12). Her aşamada elde edilen fajlar çoğaltılarak 10¹¹ pfu/mL derişimde kullanıldı. Tüm tarama işlemi sonucunda elde edilen fajlar Şekil 13'te belirtilen olası faj davranışına göre, PB ve PC türü klonlar olarak tanımlandı. Faj titrasyonu sonrasında rasgele biçimde 50-100 arasındaki sayıda faj plakları toplandı.



(*) MDR hücreleri: L2178 MDR1a
 (**) PAR hücreleri: L2178

Şekil 12) Tarama işleminde izlenen yaklaşım



Şekil 13) Fajların hücre membranı ile olası etkileşim türleri

Faj Klonların FACS Analizi:

Faj klonların FACS analizi Macar grubun laboratuvarlarında, Beckton Dickinson FACScan cihazı ile yapıldı. Verapamil, Rodamin 123 uptake analizinde pozitif kontrol olarak kullanıldı. FAR (*fluorescent activity ratio*) değerinin hesaplanmasında aşağıdaki eşitlik kullanıldı.

$$FAR = \frac{MDR_{uygulanan} / mdr_{kontrol}}{PAR_{uygulanan} / PAR_{kontrol}}$$

DNA Dizi Analizi:

Hedefleri ile etkileşim kuran işlevsel klonların peptid dizisini bulabilmek amacı ile yapılan faj DNA dizi analizi BECKMAN CEQ8000 Genetik Analiz Sisteminde yapıldı. Radyoaktif olmayan yöntemle yapılan uygulamalar, kullanıcı kitabı ve dizi analiz kiti içerisinde önerilen biçimde gerçekleştirildi.

Peptid sentezi:

Peptid sentezi Macar ortak tarafından yapıldı.

İmmunhistokimyasal İnceleme:

Hücreler; lam üzerinde PBS (*phosphate buffered saline*) içerisinde hazırlanan % 2'lik formaldehid ile sabitlendi. PBS içerisinde hazırlanan % 1'lik BSA (*bovine serum albumin*) ile bloklandı. PBS içerisinde % 1 BSA içeren çözeltide hazırlanan ve 1×10^{11} pfu/mL faj içeren ortamda, oda sıcaklığında 60 dakika bekletildi. Lam, HRP-antifaj antikoruna ile % 1 BSA içeren PBS içerisinde 60 dakika bekletilerek HRP (*horseradish peroxidase*) substratı ile boyandı.

SPR (*Surface Plasmon Resonance*) Analizi:

Peptidin küvete kaplanması, PAR / MDR hücreleri ve TFP ile olan etkileşimi IASys Plus SPR sisteminde önerildiği biçimde yapıldı.

BULGULAR

Model sistem; fare T-hücre lenfoma (PAR, L2178) ve insan p-glikoproteini sentezleyen MDR (L2178-MDR1/A) hücreleridir. Bu hücreler karşılaştırmalı biçimde peptit kütüphanesinden taranmış ve FACS analizleri sonrasında önemli bulunan faj klonlar değerlendirmeye alınmıştır. Yapılan FACS analizlerine ilişkin veriler gelişme raporlarında ayrıntılı biçimde sunulmuş olduğundan, bu bölümde işlevleri açısından önemli bulunan klonlara ilişkin veriler derlenmiştir.

Peptit Kütüphanesinden taranarak elde edilen klonların FACS analizi:

PC4 faj klonunun TFP etkisini bozduğu ve yapılan immunohistokimyasal çalışmada MDR hücrelerini PAR hücrelerinden ayırt edebildiği gözlenmiştir (Tablo 3, Şekil 14). Bu gözlem sonucunda bu klonun içeriğinde bulunan peptit dizisinin sentezletilerek denenmesi sonucuna varılmıştır. PC4 klonu içeriğindeki dizi analizi (Şekil 19) sonucundan yola çıkılarak elde edilen peptit dizisi ASGA01 olarak yeniden adlandırılmıştır. Peptit sentezi Macar ortak tarafından yapılmıştır.

Tablo 3) PC4 Faj Klonuna İlişkin FACS Verileri

Örnek Tanımı	Kullanılan Miktar	FAR(*)
Verapamil	10 µg/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	2.85
TFP	0.5 µg/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	3.10
TFP	2.0 µg/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	12.91
TFP	5.0 µg/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	36.42
TFP	10.0 µg/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	48.76
TFP + PC4	0.5 µg/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	2.55
TFP + PC4	2.0 µg/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	13.98
TFP + PC4	5.0 µg/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	27.31
TFP + PC4	10.0 µg/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	34.62

(*)Fluorescence Activity Ratio

(TFP) : Trifluoperazin: 10-[3-(4-Metil-1-piperazinil)propil]-2-trifluorometilfenotiazin

Proje çalışmaları süresince taranan klonlardan 6B6, 6C5, 6C8, 6C9 ve 6C10 no'lu klonların mdm reversal etki gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4). Bu fajların içeriklerindeki peptit dizilerinin sentezletilerek denenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Tablo 4) Faj MDR Hücre etkileşimleri ve Reversal Etkisi

Örnek Tanımı	Kullanılan Miktar	FAR(*)
Verapamil	10 µg/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	3.90
6B6	10 ¹¹ phage/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	4.34
6C5	10 ¹¹ phage/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	6.82
6C8	10 ¹¹ phage/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	7.17
6C9	10 ¹¹ phage/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	4.27
6C10	10 ¹¹ phage/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	5.07

(*)*Fluorescence Activity Ratio*

ASGA01 Peptidi ile yapılan çalışmalar:

FACS Analizleri

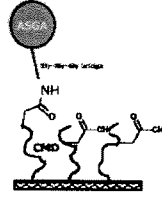
ASGA01 olarak tanımlanan peptidin verapamil ve TFP'nin direnci tersine çevirme etkilerini değiştirdiği gözlenmiştir. ASGA01 peptidi, TFP ve verapamil ile denenmiştir. Tablo 5 ve Tablo 6'da bu sonuçlar aktarılmaktadır.

Tablo 5) Peptit-TFP Etkileşimi

Örnek Tanımı	Kullanılan Miktar	FAR(*)
Verapamil	10 µg/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	3.75
TFP	0.05 µg/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	0.83
TFP	0.5 µg/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	7.46
TFP	2.0 µg/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	30.04
TFP + ASGA01 (20 µg/mL)	0.05 µg/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	0.85
TFP + ASGA01 (20 µg/mL)	0.5 µg/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	4.08
TFP + ASGA01 (20 µg/mL)	2.0 µg/mL + 1x 10 ⁶ MDR cell	27.31

(*)*Fluorescence Activity Ratio*

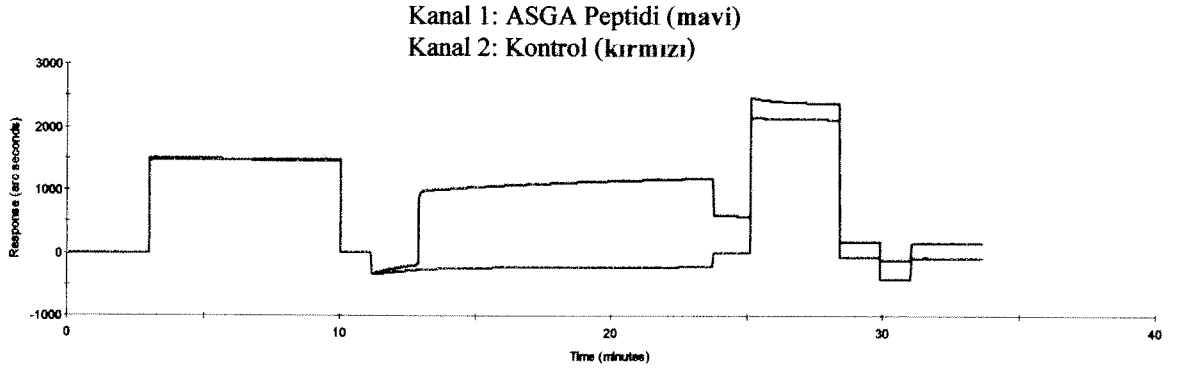
(TFP) :*Trifluoperazin: 10-[3-(4-Metil-1-piperazinil)propil]-2-trifluorometilfenotiazin*



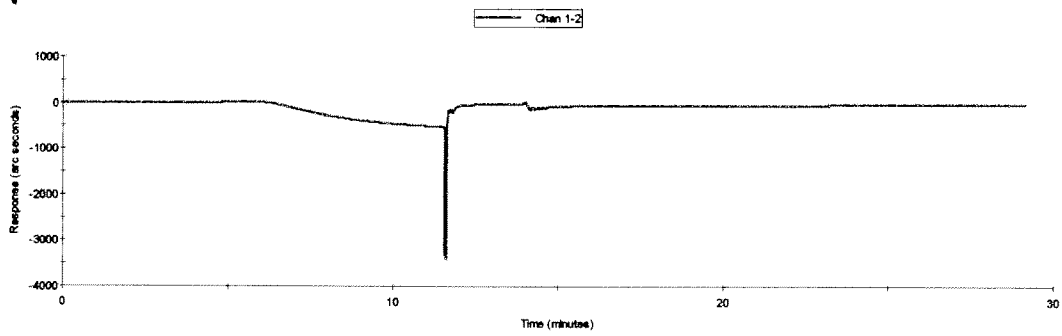
ASGA01 (PC4)

5'- ACC TCC ACC ATG CCC ATA ATG CGA ATC CAT CAG AAT AAG ATT ATG -3'
 3'-TGG AGG TGG TAC GGG TAT TAC GCT TAG GTA GTC TTA TTC TAA TAC -3' (C- end)

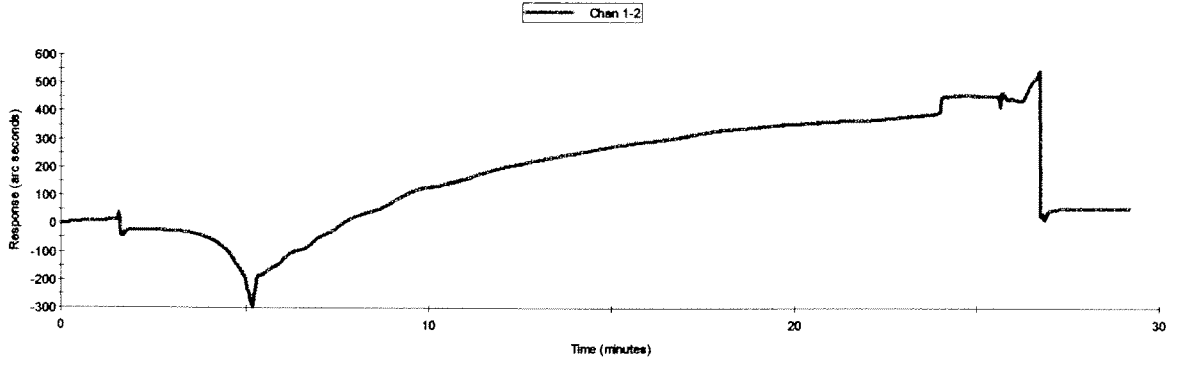
(N-end) Gly-Gly-Gly-HIS-GLY-TYR-HIS-SER-ASP-MET-LEU-ILE-LEU-ASN-HIS (C-end)
 (N-end) G-G-G-H-G-Y-H-S-D-M-L-L-L-N-H (C-end)



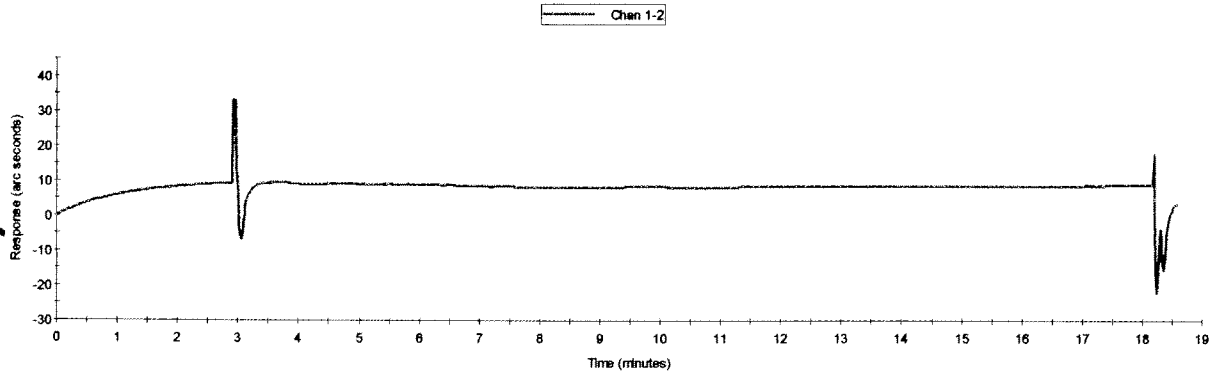
Şekil 15) ASGA01 peptidinin CMD küvete bağlanması



Şekil 16) ASGA01 peptidinin PAR hücreleri ile etkileşimi



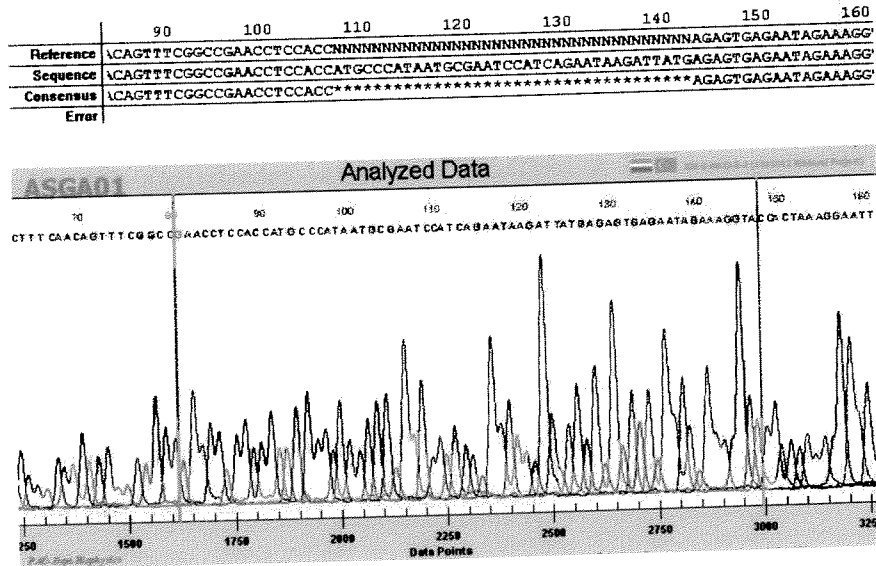
Şekil 17) ASGA01 peptidinin MDR hücreleri ile etkileşimi



Şekil 18) ASGA01 peptidinin TFP ile etkileşimi

DNA Dizi Analizleri:

Yapılan DNA dizi analizlerinde birçok klonun benzer dizilere sahip olduğu gözlenmiştir. Farklı içerikte olan diziler saptanmış ve Şekil 20’de bu dizilere ilişkin bilgiler verilmiştir.



Şekil 19) PC4 faj klonunun DNA dizi analizi

ASGA02 (C14)

5'. ACC TCC ACC ATG ATG ATG AAT ATG ATC CTG CCG ACT AAG AGA CTT -3'
 3'. TGG AGG TGG TAC TAC TTA TAC TAG GAC GGC TGA TTC TCT GAA -5' (C-end)
 (N-end) Gly-Gly-Gly-HIS-HIS-HIS-ILE-HIS-ASP-GLN-ARG-SER-LEU-SER-LYS (C-end)
 (N-end) G-G-G-H-H-H-I-H-D-Q-R-S-L-S-K (C-end)

ASGA03 (B2)

5'. ACC TCC ACC CCG CCG AAA AGT ACG CCG AGG ATT CTT CAT CAA AGT -3'
 3'. TGG AGG TGG GCC GCA TTT TCA TGC GCC TCC TAA GAA GTA GTT TCA -3' (C-end)
 (N-end) Gly-Gly-Gly-PRO-THR-PHE-THR-ARG-PRO-PRO-ASN-LYS-MET-LEU-THR (C-end)
 (N-end) G-G-G-P-T-F-T-R-P-P-N-K-M-L-T (C-end)

ASGA04 (C43)

5'. ACC TCC ACC AAA ACG AGA CTG CGT ATT CTT CAT ATT ATA ATG CTG -3'
 3'. TGG AGG TGG TTT TGC TCT GAC GCA TAA GAA GTA TAA TAT TAC GAC -5' (C-end)
 (N-end) Gly-Gly-Gly-PHE-ARG-SER-GLN-THR-ASN-LYS-MET-ASN-TYR-HIS-GLN (C-end)
 (N-end) G-G-G-F-R-S-Q-T-N-K-M-N-Y-H-Q (C-end)

ASGA05 (C45)

5'. ACC TCC ACC ATA ACC CTA ATG CGA ATC CTC AGA ATA ACC ATT ATG -3'
 3'. TGG AGG TGG TAT TGG GAT TAC GCT TAG GAG TCT TAT TGG TAA TAC -5' (C-end)
 (N-end) Gly-Gly-Gly-TYR-GLY-GLN-HIS-SER-ASP-GLU-SER-TYR-GLY-ASN-HIS (C-end)
 (N-end) G-G-G-Y-G-Q-H-S-D-E-S-Y-G-N-H (C-end)

Şekil 20) Farklı dizilere sahip olan seçilmiş klonlar

Bitki Özüleri:

Pamukkale Üniversitesi Fen fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Yard.Doç.Dr. Nazime MERCAN tarafından, yöremize özgü türlerden hazırlanan bitki özülerinin Szeged'teki (Macaristan) laboratuvarlarda FACS analizleri yapılmıştır. Bu bitki türlerinin bir bölümüne Ege bölgesinde rastlanmaktadır ve "Baytop Çiğdemi" olarak bilinmekte olup bu ismi Türk eczacı Prof.Dr. Turhan BAYTOP'tan almaktadır. *Sideritis montana* ise "Dağ Çayı" olarak bilinmektedir.Yapılan analizlerde; MDR L2178-MDR1/A hücreleri (1×10^6 mL⁻¹) üzerinde mdr-reversal etkisi gözlenmemiştir. Bitki özülerine ilişkin bilgiler aşağıda verilmiştir.

- Crocus baytopiorum, metanol ekstresi (CBMex-001)
- Crocus baytopiorum, etil asetat ekstresi (CBEAex-002)
- Crocus baytopiorum, heksan ekstresi (CBHex-003)
- Sideritis montana, metanol ekstresi (SMMex-004)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser problemi, tüm ileri tedavi uygulamalarına karşın Avrupa ülkelerinde ölüme neden olan hastalıklar arasında ikinci sırayı almaktadır. Hasta grupları içerisinde, kimyasal tedaviye karşı gelişen direnç ve yanıtızlık ortaya koyan olgular her geçen gün artmaktadır. Çoklu ilaç dirençliliği olarak da tanımlanan bu hücrenel davranış, kanserin etkili kimyasal tedavisinde bir engel olarak ortaya çıkmaktadır. Hücrelerin bu dirençlilik yanıtı, birçok hücrenel mekanizmadan kaynaklanıyor olsa da, en çok çalışılan odak p-glikoproteindir. Birçok araştırmacı p-glikoprotein işlevini bozan doğal ve yapay kimyasallar konusunda çalışma yapmaktadır (17–19).

Kanser konusunun bir diğeri önemli noktası, ilgili hücrenin özgün, doğru ve seçici biçimde tanımlanmasıdır. Bu amaç doğrultusunda geliştirilecek moleküller molekölsele tanıda önemli katkı yapabilecektir. Gerek ve gerekse hücre membranının dış bölümünde yer alan protein motiflerinin özgün biçimde tanımlanması aynı zamanda da bazı etkin moleküllerin sorumlu hücreye doğrudan gönderilebilmelerini sağlayabilecektir. Hücre hedefleme (*cell targeting*) olarak da tanımlanabilecek bu yaklaşım için hücre membranları üzerinde yer alan reseptörlerin taranması ve özgün olanların seçilmesi gerekmektedir. Bu tür ilaç geliştirme çalışmaları içerisinde peptitler, tanımlanan amaç için göreceli olarak doğal moleküller olmalarından ötürü, aday moleküllerdir (20–22).

Çalışmamızda, yapay peptit kütüphaneleri kullanarak, insan p-glikoproteini eksprese eden hücrelerde gerek algılayıcı ve gerekse de p-glikoprotein işlevini bozucu peptit dizilerinin bulunmasını araştırmayı amaçladık. Proje çalışmamız Türk – Macar İkili İşbirliği Projesi kapsamında, ortak grupların laboratuvarlarında yürütüldü. Uygulanan yöntemler; FACS analizleri ve peptit sentezi dışında tümü ile Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Her ne kadar Macar grup, çoklu ilaç dirençliliği konusunda deneyimli olsa da peptit kütüphaneleri ve faj gösterim teknolojileri konusunda yetersiz birikime sahipti. Bu nedenle proje süresince Macar araştırmacılara faj

gösterim tekniği konusunda da Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı bünyesinde kuramsal ve uygulamalı eğitim verildi.

Proje çalışmalarında elde edilen birinci sonuç, MDR hücrelerini PAR hücrelerinden molekül düzeyde ayırt edebilen peptit dizisinin elde edilmesidir. Bu peptit dizisi PC4 olarak tanımlanan faj klonunun dizi analizi sonrasında elde edilen DNA dizisine dayalı biçimde üretilmiştir. Peptit olarak Macar grup tarafından sentezletilen bu klon, ASGA01 peptidi olarak tanımlanmıştır. ASGA01 peptidi; elde edilen immünohistokimyasal ve SPR verilerine göre, MDR hücrelerini seçici biçimde tanımaktadır. Bu konuda Niv ve ark (23), scFv (*single chain variable fragment*) formunda faj gösterim (phage display) tekniği ile insan p-glikoproteinine yönelen rekombinant molekülü elde etmişlerdir. Diğer taraftan Binyamin ve ark ise benzer yöntemi kullanarak insan çoklu ilaç dirençlik proteininin (MRP1) ekstrasellüler epitoplarna yönelen bir diğer scFv molekülü elde etmişlerdir (24). Bu iki çalışmada da, insan p-glikoproteininin ekstrasellüler dizisi sentezlenmiş ve fareler bu dizi ile bağışıklanarak scFv molekülleri üretilmiştir. Bizim çalışmamızda ise ASGA01 peptidi, 12-mer'lik yapay peptit kütüphanesi taranarak elde edilmiştir.

ASGA01 peptidi, TFP (Trifluoperazin) ve verapamilin reversal etkilerini bozmaktadır. SPR analizleri bu etkiyi TFP ve verapamil ile etkileşerek yapmadığını göstermektedir. Hücre biyofiziği açısından kullanılabilir bir model peptit dizi olarak değerlendirilmiştir.

Proje çalışmaları süresince taranan klonlardan 6B6, 6C5, 6C8, 6C9 ve 6C10 no'lu klonların, kontrol olarak kullanılan verapamilden daha fazla mdr reversal etki gösterdiği belirlenmiştir. Haus-Cohen ve ark p-glikoprotein işlevini bozma yeteneği olan scFv formundaki rekombinant molekülü elde edebilmişlerdir (25). Bu araştırma grubunun izlediği yöntem, diğer çalışmalardaki (23, 24) gibidir. Bu nedenle çalışmamızda elde edilen klonlar ile farklılık göstermektedir. Elde etmiş olduğumuz peptitler, scFv moleküllerine oranla çok küçüktür. Elde edilen peptitlerin küçük olması olası in vivo kullanımlarda kolaylık sağlayabilecektir. Bu fajların içeriklerindeki peptit dizilerinin sentezletilerek denenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu faj klonlarının DNA dizileri bilinmektedir. Proje çalışmaları sırasında sadece ASGA01 Macar grup tarafından sentezletilebilmiştir. Peptit

sentezinin maliyeti bu konuda kısıtlayıcı etken olarak ortaya çıkmıştır. Bu peptitlerin yeni bir projelendirme ile geliştirilerek denenmesinin yararlı olacağı öngörülmektedir.

Pamukkale Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Yard.Doç.Dr Nazime MERCAN tarafından yöremize endemik bitki türlerinden hazırlanan özütleri, Macar proje ortağının laboratuvarlarına FACS analizi için gönderilmiştir. Bu özütlerin mdr reversal etkisi göstermediği saptanmıştır. Bu çalışmaların sürdürülmesinin yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

Türk Macar İkili İşbirliği projesi çerçevesinde yürütülen çalışmalar Pamukkale Üniversitesi alt yapısında yeni bir açılım yaratmıştır. Buna bir örnek olarak Pamukkale üniversitesi Araştırma Fonuna verilen proje değerlendirilerek kabul edilmiştir. Proje harcamalarının Haziran 2006 tarihinde başlayabileceği öngörülmektedir.

Elde edilen peptit dizilerinin patentlenme olasılığı düşünüldüğünde karşılaşılabilecek en önemli sorunun, kullanılan kütüphanenin ticari olmasından ötürü ortaya çıkacağı öngörülmektedir. Proje çalışmalarının sonucu olarak, bu tür güncel ve yeni verilerin elde edilebilirliği ortaya konulmuştur. Buna karşın bu tür çalışmaların korunması adına, ticari olmayan farklı kütüphanelerin özgün biçimde üretilerek kullanılması için gerekli projelendirme çalışmalarının ivedilikle önerilmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther*, 75: 13–33,2004
2. Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. The drug-binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein is accessible to the aqueous medium. *Biochemistry*, 43: 12081–12089, 2004
3. Loo TW, Clarke DM. Do drug substrates enter the common drug-binding pocket of P-glycoprotein through Gates? *Biochem Biophys Res Commun*, 329: 419–422, 2005
4. Litman T, Skovsgaard T, Stein WD. Pumping of Drugs by P-glycoprotein: A Two step Process? *J Pharmacol Exp Ther*, 307: 846–853,2003
5. Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance, *Cell Mol Life Sci*, 58: 931–959, 2001
6. Atalay EÖ, Erdağ B, Çırakoğlu B. The use of polypeptide probes selected from artificial libraries for the recognition and differentiation of DNA sequences, *Tr J Med Sciences*, 29: 349–354, 1999
7. Azzazy HME, Highsmith WE. Phage display technology: clinical applications and recent innovations, *Clin Biochem*, 35: 425–445, 2002
8. Zhang J, Spring H, Schwab M. Neuroblastoma tumor cell-binding peptides identified through random peptide phage display, *Cancer Letters*, 171: 153–164, 2001
9. Nilsson F, Tarli L, Viti F, Neri D. The use of phage display for the development of tumour targeting agents, *Adv Drug Del Rev*, 43: 165-196, 2000
10. Nissim A, Gofur Y, Vessillier S, Adams G, Chernajovsky Y. Methods for targeting biologicals to specific disease sites, *Trends Mol Med*, 10(6): 269–274, 2004
11. Schatzlein AG, Rutherford C, Corrhons F, Moore BD. Phage derived peptides for targeting of doxorubicin conjugates to solid tumours, *J Control Release*, 74: 357–362,2001
12. Landon LA, Deutscher SL. Combinatorial discovery of Tumour Targeting peptides Using Phage Display, *J Cell Biochem*, 90: 509–517, 2003
13. McDonnell JM. Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition, *Curr Opin Chem Biol*, 5: 572–577, 2001

14. Huber W. A new strategy for improved secondary screening and lead optimization using high resolution SPR characterization of compound –target interactions, *J Molec Recog*, 18: 273–281, 2005
15. Homola J, Vaisocherova H, Dostalac J, Piliarik M. Multi-analyte surface plasmon resonance biosensing, *Methods*, 37: 26–36, 2005
16. Karlsson R. SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas, *J Molec Recog*, 17: 151–161, 2004
17. Motohashi N, Shirataki Y, Kawase M, Tani S, Sakagami H, Satoh K, Kurihara T, Nakashima H, Mucsi I, Varga A, Molnar J. Cancer prevention and therapy with kiwifruit in Chinese folklore medicine: a study of kiwifruit extracts, *J Ethnopharmacol*, 81: 357–364, 2002
18. Kawase M, Shah A, gaveriya H, Motohashi N, Sakagami H, Varga A, Molnar J. 3,5-Dibenzoyl-1,4-dihydropyridines: Synthesis and MDR reversal in Tumour Cells, *Bioorgan Med Chem*, 10: 1051-1055, 2002
19. Hendrich AB, Weselowska O, Motohashi N, Molnar J, Michalak K. New phenothiazine-type multidrug resistance modifiers: anti-MDR activity versus membrane perturbing potency, *Biochem Bioph Res Co*, 304: 260–265, 2003
20. Cooper MA. Advances in membrane receptor screening and analysis, *J Molec Recog*, 17: 286–315, 2004
21. Shadidi M, Sioud M. Selective targeting of cancer cells using synthetic peptides, *Drug Res*, 6: 363–371, 2003
22. Blume AJ, Beasley J, Goldstein NI. The use of peptides in diogenesis: A novel approach to drug discovery and phenomics, *Biopolymers*, 55: 347–356, 2000
23. Niv R, Assaraf YG, Segal D, Pirak E, Reiter Y. Targeting multidrug resistant tumour cells with a recombinant single chain FV fragment directed to p-glycoprotein. *Int J Cancer*, 94: 864-872, 2001
24. Binyamin L, Assaraf YG, Haus-Cohen M, Stark M, Reiter Y. Targeting an extracellular epitope of the human multidrug resistance protein 1 (MRP1) in malignant cells with a novel recombinant single chain FV antibody, *Int J Cancer*, 110: 882-890, 2004
25. Haus-Cohen M, Assaraf YG, Binyamin L, Benhar I, Reiter Y. Disruption of P-glycoprotein anticancer drug efflux activity by a small recombinant single chain Fv antibody fragment targeted to an extracellular epitope, *Int J Cancer*, 109: 750-758, 2004

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Kodu: SBAG-MACAR-2 (103S042)

Proje Başlığı:

KANSER HÜCRELERİNDEKİ ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİLİĞİNE KARŞI DÜZENLEYİCİ YAPILAR
(Resistance Modifiers against Multidrug Resistant Cancer Cells)

Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar:

Prof.Dr. Erol Ömer ATALAY (Proje Yürütücüsü)
Doç.Dr. Gülçin ABBAN
Yard. Doç. Dr. Ayfer ATALAY
Doç. Dr. Günfer TURGUT
Yard. Doç. Dr. Sebahat TURGUT
Araş. Gör. Sanem YILDIZ

Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı
Kınıklı - Denizli

Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:

Pamukkale Üniversitesi, Kınıklı Denizli

Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 31 Aralık 2003 – 31 Aralık 2005

Öz (en çok 70 kelime):

Proje, çoklu ilaç dirençliliği düzenleyen peptitlerin, güncel bir yaklaşım olan yapay peptit kütüphanelerinden seçilerek elde edilmesini amaçlamıştır. Projede insan p-glikoproteinini eksprese eden fare hücreleri (L2178/MDR1a) model hedef olarak kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre; insan p-glikoproteinini eksprese eden L2178/MDR1a hücrelerini ayırt edebilen ve p-glikoprotein işlevini değiştirebilen peptitler elde edilmiştir. Sonuç olarak, yapay peptit kütüphanelerinin kullanımının, özellikle çoklu ilaç dirençliliği modelinde, membran biyofiziğine yönelik önemli katkılarda bulunabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler:

P-glikoprotein, mdr, peptide library, cell targeting, mdr reversal

Projeden Kaynaklanan Yayınlar:

Yayınlanmak üzere hazırlanmaktadır

Bilim Dalı:

Doçentlik Bilim Dalı Kodu: 1008