

**KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSER HÜCRE DİZİLERİNDE PTEN
TÜMÖR BASKILAYICI GENİNİN İNVAZYONU BASKILAYICI ETKİSİNİN OLASI
MEKANİZMALARI İLE ARAŞTIRILMASI**

Proje no: 108S187

Doç.Dr.Hakan AKÇA
Prof.Dr.Mutay ASLAN
Doç.Dr. İbrahim AÇIKBAŞ

EYLÜL 2011
DENİZLİ

Önsöz

Akciğer kanserinin bir tipi olan küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) oldukça agresif bir kanser türü olup çok kısa zamanda ölüme neden olmaktadır. Kanser nedenli ölümlerin ana nedeni kanserin başladığı organdan metastaz yolu ile diğer organlara yayılması ve organ işlev bozukluklarına neden olması şeklinde açıklanabilir. Metastazın ilk basmağı kanser hücrelerinin bazal laminaya invazyonudur. Dolayısı ile metastaz yapabilmek için hücrenin ilk olarak invaziv özellik kazanması gereklidir. NSCLC hücreleri oldukça invaziv hücrelerdir. Biz bu çalışmamızda NSCLC hücrelerinin tümör baskılayıcı gen PTEN ifade etmediklerini göstererek, bu hücrelerde kalıcı gen transfeksiyonu yöntemi ile yeniden yaratılan PTEN ifadesinin NSCLC hücrelerinin invazyonunu PI3K/AKT/NfκB yolağını baskılayarak inhibe ettiğini göstermiş olduk. Çalışmamızda, gen klonlaması “site directed mutagenesis” yöntemi ile PTEN inaktif mutantlarının yaratılması, kalıcı ve geçici gen transfeksiyon yöntemi, gen reporter yöntemi gibi birçok moleküler biyolojik yöntem kullanılmıştır. Çalışmamız TUBITAK-SBAG grubu tarafından 108S187 nosu ile desteklenmiştir. Çalışmamıza verdiği destek için TUBITAK'a teşekkürü bir borç biliriz.

İçindekiler

Önsöz	2
İçindekiler	3
Şekiller Dizini	4
Özet	6
1. Giriş	8
2.Genel Bilgiler	9
2.Gereç ve Yöntem.....	14
2.1 PTENG129E ve PTENG129R mutanlarının yönlendirilmiş mutasyon yöntemiyle yaratılması	14
2.2. PTEN, Akt, NFkB ile SOD ve GPx ifade ve aktivitelerinin belirlenmesi	14
2.3 SDS-PAGE ve Western Blot	15
2.4 NFkB aktivitesinin belirlenmesi	16
2.5. Antioksidan Enzimlerin Aktivite Tayini.....	16
2.5.1 Katalaz enzim aktivite tayini	17
2.5.2 Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivite Tayini	17
2.5.3 Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini	18
2.5.4 Okside ve Redükte Glutasyon Miktarının ölçümü	19
2.5.5 Hidrojen Peroksit Ölçümü	19
2.6 Antioksidant enzim ifadelerinin belirlenmesi Semi-Kantitatif RT-PCR yöntemi ile yapılacaktır.....	19
2.7 Kalıcı Transfeksiyon Yoluyla PTEN Vektörlerinin Hücelere Aktarımı	21
2.7.1 PTEN cDNAların pcDNA4TETON vektörüne klonlanması	21
2.7.2 Transformasyon	22
2.8 Hücre İnvazyonunun Belirlenmesi.....	22
2.9 Soft agar'da koloni oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi	23
3.Bulgular	24
3.1 Yönlendirilmiş mutasyon yöntemi ile wt-PTEN cDNA'da PTENG129R ve PTENG129E mutasyonların oluşturulması.....	24
3.2 TETON sistemine PTENcDNA'ların klonlanması	27
3.3 Kalıcı transfeksiyon Yoluyla PTENwt, PTEN G129R ve PTEN G129E genlerinin PC14 hücrelerine transfeksiyonu ve transfekte hücrelerin seçilimi	36
3.4 PTEN ifadesinin SOD, GPx ve Katalaz aktivitesi üzerine etkisi	41
3.5 SOD, GPx ve Katalaz enzim ifadelerinin western blot yöntemi ile belirlenmesi	45
3.6 Yeniden yaratılan PTEN ifadesinin AKT/Nfkb yolağı üzerindeki etkisi	46
3.7 Yeniden Yaratılan PTEN ifadesinin PC14 hücrelerinin anchorage bağımlı ve anchorage bağımsız çoğalmasına etkisi	50
4. Tartışma	53
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU	64

Şekiller Dizini

Şekil 1. 1 Antioksidan Enzim Sistemleri	11
Şekil 1. 2 Süperoksit Dismutaz Enziminin Yapısı ve Fonksiyonu	11
Şekil 2. 1 Katalazın enzimatik aktivitesi.....	17
Şekil 2. 2 Katalaz enzim aktivitesinin tayin yöntemi.....	17
Şekil 2. 3 Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinin tayin yöntemi	18
Şekil 2. 4 SOD enzim aktivitesinin tayin yöntemi	18
Şekil 2. 5 Hücre içi hidrojen peroksit ölçüm yöntemi.....	19
Şekil 3. 1 Yönlendirilmiş mutasyonun yaratıldığı PCR reaksiyonu sonucu oluşan ürünler.....	25
Şekil 3. 2 DH5alfa-T1 E.Coli suşundan izole edilen plazmitler.	26
Şekil 3. 3 Yönlendirilmiş mutasyon reaksiyonu ile istenilen mutasyonların yaratıldığını gösteren DNA sekans analiz sonucu	27
Şekil 3. 4 TETON sistem vektörleri iki vektörden oluşmaktadır.	28
Şekil 3.5 pcDNA 3.1-PTENwt, pcDNA3.1-PTENR, pcDNA3.1-PTENE'lerden PTENcDNA'larının çıkartılarak TETON sistem vektörü pcDNA4/TO vektörüne klonlanmaları.....	29
Şekil 3. 6 PTEN cDNA'ların pcDNA vektörden çıkarılması.....	30
Şekil 3. 7 PTENwt, R ve E cDNA'ların jelden kesilerek izolasyonu	30
Şekil 3. 8 EcoRI enzim kesiminin ardından seçilen beş koloninde PTENwt ihtiva ettiği görülmektedir	32
Şekil 3. 9 EcoRI enzim kesim sonuçları.	32
Şekil 3. 10 PTENcDNA ve pcDNA4/TO vektörü üzerinde Scal kesim Bölgeleri.....	33
Şekil 3. 11 pcDNA4/TO-PTENwt Scal kesimi agaroz jel görüntüsü.....	35
Şekil 3. 12 pcDNA4/TO-PTENE vepcDNA4/TO-PTENR Scal kesimi agaroz jel görüntüsü	35
Şekil 3. 13 Transfeksiyonun 24 saat ardından PC14 Hücrelerindeki GFP ifadesi.	36
Şekil 3. 14 TETON vektör sisteminin çalışma mekanizması	37
Şekil 3. 15 Transfeksiyonun ardından hücrelerin seçilimi.....	38
Şekil 3. 16 TETON sisteminin 2 mikrogram/ml tetrasiklin ilavesinin ardından çalışarak PTENwt ifadesinin gerçekleşmesi A) Tetrasiklin ilavesinden sonra PTEN ifadesinin western blot yöntemiyle saptanması B) Western blot bantlama densitometrik analiz sonuçları.....	39
Şekil 3. 17 Mock (pcDNA4+pcDNA6), PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E transfekte edilen hücrelerde PTEN ifadelerinin tetrasiklin ile gerçekleştirilmesi.....	40
Şekil 3. 18 PTENwt ve mutantlarının ifadelerinin SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi	41
Şekil 3. 19 GSH üzerine boşvektör, PTEN wt, PTENG129E ve PTENG129R ifadelerinin etkisi.....	42
Şekil 3. 20 GPX enzim aktivitesi üzerine boşvektör, PTEN wt, PTENG129E ve PTENG129R ifadelerinin etkisi.....	42
Şekil 3. 21 PTENwt ve mutant ifadelerinin Katalaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	43
Şekil 3. 22 PTENwt ve Mutantlarının GPx mRNA ifadesi üzerindeki etkileri	44
Şekil 3.23 PTENwt ve Mutantlarının Zn-CuSOD mRNA ifadesi üzerindeki etkileri....	44

Şekil 3. 24 PTENwt ve Mutantlarının MnSOD mRNA ifadesi üzerindeki etkileri	45
Şekil 3. 25 SOD, GPx ifadesi üzerine PTEN ifadelerinin etkisi	46
Şekil 3.26 Boş vektör, PTENwt, PTENG129E ve PTENG129R ifadeleriin PI3K/AKT/NFkB yolağı üzerindeki etkisi	47
Şekil 3. 27 NFkB aktivitesine PTEN ifadelerinin etkisinin EMSA yöntemi ile belirlenmesi.....	49
Şekil 3. 28 Boş vektör (mock), PTENwt, PTENG129E ve PTENG129E ifadelerinin PC14 hücrelerini çoğalmasına etkisi.....	50
Şekil 3. 29 Boş vektör (mock), PTENwt, PTENG129E ve PTENG129E ifadelerinin PC14 hücrelerinin anchorage independent çoğalmasına etkisi.	51
Şekil 3.30 Boş vektör (mock), PTENwt, PTENG129E ve PTENG129E ifadelerinin PC14 hücre invazyonuna etkileri	52

Özet

PTEN tümör baskılayıcı genin birçok akciğer kanser hücresinde inaktif olması sebebi ile biz bu çalışmada, PTEN inaktivasyonunun akciğer kanser hücrelerinin invazyonu ile ilişkisini araştırdık. Bu amaçla, ilk olarak PTEN-WT, katalitik olarak inaktif PTEN (G129R) ve lipid fosfataz özelliği inaktif PTEN (G129E) mutantları yönlendirilmiş mutasyon yöntemi ile yaratılarak bir tetrasiklinle indüklenebilen vektor sistemi olan TETON' a klonlandı. Ardından PTENwt, PTEN-G129R ve PTEN-G129E ifadesi PTEN ifade etmediği tarafımızca gösterilen PC14 hücrelerinde kalıcı transfeksiyon yöntemi ile tekrar yaratıldı. Yeniden yaratılan PTEN wt ifadesi PC14 hücrelerinde AKT aktivasyonunun azalmasına ve NFkB transkripsiyonel aktivitesinin düşmesine neden olurken, katalitik olarak inaktif PTEN (G129R) ve lipid fosfataz inaktif PTEN (G129E) ifadelerinin aynı etkiyi göstermemesi PTEN inaktivasyonunun PC14 hücrelerinde AKT/NFkB yolağının aktivitesine sebep olduğunu göstermektedir. Dahası, PTEN-wt aynı hücrelerde soft agarda anchorage bağımsız büyümeyi ve invazyonu baskılarken, PTENG129R ve PTENG129E' nin bu etkileri gösteremediği de saptandı. Sonuçlarımız PTEN invazyonu ile aktiveleşen PI3K/AKT/NFkB yolağının akciğer kanser hücre invazyonunun arttırdığını ve PTEN'in lipid fosfataz aktivitesinin bu süreçte anahtar rol oynadığını kuvvetli bir şekilde göstermektedir. Çalışmamızda ayrıca PTEN ifadesinin anti oksidant enzim aktivitesi üzerine etkileri de araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: PTEN, NSCLC, PI3K, AKT, NFkB, Antioksidant enzimler

Abstract

PTEN is inactivated in a subset of lung cancer; therefore, we investigated the involvement of PTEN inactivation in invasiveness of lung cancer cells. AKT at Ser473 was phosphorylated in several lung cancer cell lines with loss of PTEN expression. Therefore, we created a tetracycline inducible expression system of wild-type PTEN (PTEN-WT) as well as catalytically (PTEN-G129R) and lipid phosphatase (PTEN G129E) inactive PTEN mutants using the PC14 lung adenocarcinoma cell lines, in which endogenous PTEN expression was not detected by Western blot analysis. Induction of PTEN-WT reduced phosphorylation of AKT and inhibited the transcriptional activity of NFκB, whereas PTEN mutants did not, suggesting that PTEN inactivation results in the activation of the AKT/NFκB pathway in PC14 cells. Furthermore, overexpression of PTEN-WT suppressed anchorage independent growth in soft agar and reduced invasiveness in a trans-well chamber assay of PC14 cells. Neither PTEN-G129R nor PTEN-G129E had suppressive effects on anchorage independent growth and invasiveness. Therefore, it was strongly indicated that activation of the PI3K/AKT/NFκB pathway by PTEN inactivation results in augmented invasiveness in lung cancer cells and lipid phosphatase activity of PTEN plays a key role in this process. In our study, the effects of PTEN on antioxidant enzyme activity also examined.

Key Words: PTEN, NSCLC, PI3K, AKT, NFκB, Antioxidant enzymes

1. Giriş

Akciğer kanseri, kanser sebepli ölümlerin başında gelmektedir (BUNN, 2001). Squamous hücre karsinomu, adeno karsinoma ve büyük hücre karsinomlarının tümünü kapsayan Küçük hücre dışı akciğer kanserleri (NSCLC) akciğer kanserlerinin %80'ini oluşturmaktadır. Son 20 yılda cerrahi, kemoterapi ve radyo terapi alanlarındaki ilerlemelere rağmen Akciğer kanserinde 5- yıllık sağ kalım oranı sadece %15 dir (OKAMOTO ve ark., 2003). Akciğer kanserinin sebep olduğu ölüm, diğer solid malignansilerde olduğu gibi neredeyse tümüyle neoplastik hücrelerin bazal laminaya invazyonları ve primer tümörlerden uzak organ bölgelerine metastazlarının sonuçlarıdır. Bu sebeple akciğer kanser invazyon ve metastazıyla ilişkili genlerin/gen ürünlerinin anlaşılması oldukça önem taşır. İnvazyon ve Metastaz çeşitli gen ürünlerinin karıştığı kompleks olaylar dizisidir. Bu önemli olayların içerisinde; neoplastik hücrelerin primer tümörden ayrılması ve invazyonu, kan ve lenf sistemine girmesi, endotel hücrelere adezyon vasıtasıyla uzak bölgelere tutulması, angiogenezin indüksiyonu, hostun anti-tümör cevabından kaçma ve metastatik bölgelerde büyüme (TOH ve ark., 1994 NICOLSON, 1988) yer almaktadır. Çeşitli genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinin de bu süreçte önemli olduğu düşünülmüştür (NICOLSON, 1991, MUSCHEL ve LIOTTA, 1988, CHAMBERS ve TUCK, 1993). Bununla beraber, bugüne kadar hiçbir kanser türünde kanser hücrelerinin metastatik olmayan fenotipten metastatik fenotipe dönüşürken hücre içerisinde meydana gelen değişikliklerden hangi genlerin hangi mutasyonlarının sorumlu olduğu ayrıntısıyla tespit edilememiştir. 1990 yılında Fearon ve Vogelstein ilk kez kolorektal kanser gelişimi için bir model önermişlerdir (FEARON ve VOLGELSTAIN, 1990). Bu araştırmacıların modelinde non-metastatik kanser hücrelerinin metastatik kanser hücrelerine dönüşürken meydana gelen fenotipik değişiklikler için önemli olan genetik değişiklikler belirlenememiştir. Bu modelden günümüze 16 yıl geçmesine rağmen sorumlu sinyal iletim yolları (yolaklar) hakkındaki bilgimiz oldukça azdır (SAHA ve ark., 2001).

2.Genel Bilgiler

Hücre içersinde aktivite kazanan Fosfo İnozito 3 Fosfat Kinaz (PI3K) aktivite kazandıktan hemen sonra Akt kinazı aktif hale getirir. Aktifleşen Akt kinazın muhtemel iki hedefi vardır bunlardan birincisi mTOR aktivasyonuna sebep olup hücre çoğalmasını indüklemek (OZES ve ark., 2001) diğeri ise Akt kinazın belkide en önemli görevi olan NFkB aktivasyonuna neden olmasıdır (OZES ve ark., 1999). NFkB hücre içersinde yaşamsal yolları gerçekleştiren hedef genlerinin aktivitesini indükleyerek; hücrelerin apoptosisten korunmasını, yada çeşitli mekanizmalar hayatta kalmalarına olanak tanınması (bir muhtemel mekanizma antioksidant enzim sisteminin aktifleştirilmesi) yada invazyon ve metastazının indüklenmesi olaylarına aracılık etmesi muhtemel görülmektedir.

İnsan genomunda kromozom 10q23.3 bölgesinde lokalize olan PTEN/MMAC1/TEP-1 bir ikili/çift etkili spesifik fosfataz olarak tanımlanır (LIAW ve ark., 1997). PTEN geninin gliomalarda, prostat, endometriyal, meme ve akciğer kanserlerinin büyük bir bölümünde %40-50 oranında mutasyona uğradığı saptanmıştır (LI ve ark., 1997, STECK ve ark., 1997, MAIER ve ark., 1999). PTEN geni knockout edilmiş fare fenotiplerinde PTEN'in normal gelişimde gerekli olduğu gösterilmiş ve tümör baskılayıcı rolü doğrulanmıştır (SUZUKI ve ark., 1998, DI CRISTOFANO ve ark., 1998, PODSYPANINA ve ark., 1999). Bir fosfataz olan PTEN inositol lipidleri defosforile eder. Bu özelliği PTEN'in PI3-kinaz ve fofoinositol 3 fosfat yolağının tersine çalıştığını gösterir (STAMBOLIC ve ark., 1998, MYERS ve ark., 1998, MAEHAMA & DIXON, 1998).

Bir çok kanser türünde ve özellikle akciğer kanserlerinde PTEN tümör baskılayıcı geninin ya mutasyonlar sonucu yada promotor metillasyonu sonucunda ifadesini kaybettiğini biliyoruz. Dolayısı ile literatürde rapor edilmekte olan antioksidan enzim aktivitesinin akciğer kanserlerinde değişmesinin sebebi PTEN aktivite kaybı olabilir.

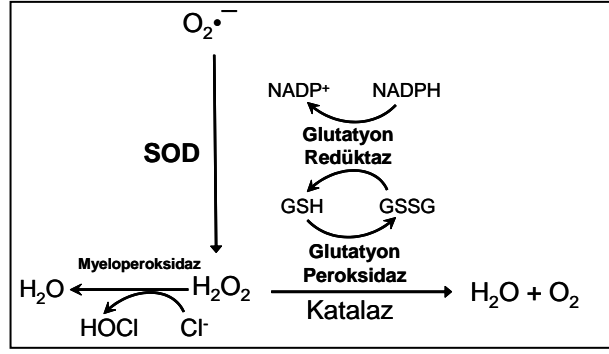
Nükleer Faktör Kappa B (NFkB), inaktif halde iken stoplazmada Inhibitor of Kappa B (Ikb)'ler ile kompleks yapmış olarak bulunur Ikb, NFkB'nin nükleusa giriş dizisini örterek hücre çekirdeğine girmesini ve aktivitesini göstermesini engeller. NFkB'nin aktivite kazanması için Akt kinazların Ikb'leri fosforlaması gerekir.

Fosforlanan I κ B'ler NF κ B den ayrılırlar böylece nükleus giriş sinyali dizisi sayesinde nükleusa giren NF κ B hücre çoğalması, anti-apoptotik metastatik ve antioksidan genlerin de içinde bulunduğu birçok hedef genin transkripsiyonunu indükleyebilir. Dolayısıyla ile NF κ B hücre sağkalımı ve yaşamının devam ettirebilmesi için vazgeçilmez bir transkripsiyonel aktivatördür.

Yukarıda bahsedildiği üzere NF κ B hedeflerinden birisinin de antioksidan enzim genlerinin olması muhtemeldir. Anti oksidant enzimler hücre içerisinde oluşan ve hücrenin yaşamını olumsuz yönde etkileyen reaktif oksijen metabolitlerini tanıyıp onları hücreye zarar vermeden etkisiz hale getiren enzimlerdir.

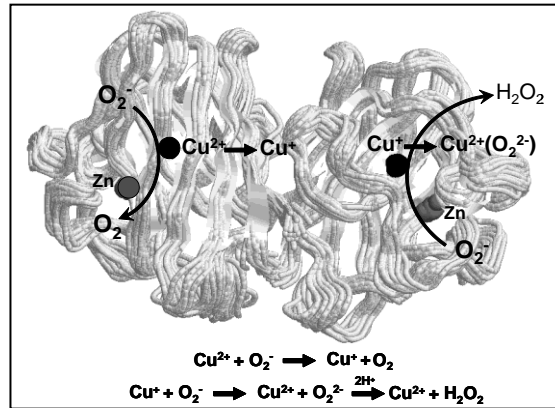
Reaktif oksijen metabolitleri (ROM) *in vivo* oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları sonucunda meydana gelen, kısa ömürlü bileşiklerdir. Süperoksit anyonu (O₂⁻) hücrede oluşan temel ROM'dir ve moleküler oksijenin indirgenmesi sonucunda meydana gelir. Süperoksit anyonunun spontan veya enzimle katalizlenen dismutasyonu sonucunda hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşur.

Hücrede oluşan ROM'nin sitotoksik etkisinin ortadan kaldırılabilmesi veya azaltılabilmesi antioksidan enzim sistemleri ile mümkün olabilmektedir (ASLAN ve ark., 2000). Bu enzimler, sitoplazmik, mitokondriyal ve ekstraselüler süperoksit dismutazlar (SOD), glutatyon peroksidaz, katalaz ve fagositik hücrelerde mevcut olan myeloperoksidaz enzim sistemleridir (Şekil 1.1). Hücrede oluşan H₂O₂, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından metabolize edilir. Fagositik hücrelerde bu enzimlere ilave olarak myeloperoksidaz enzimi de H₂O₂ metabolizmasına katılır. Katalaz yapısında katalitik hem grubu içerir ve H₂O₂'i su ve oksijen oluşturarak parçalar. Glutatyon peroksidaz (GPx) ise H₂O₂'i redükte glutatyon (GSH) aracılığı ile parçalar



Şekil 1.1 Antioksidan Enzim Sistemleri

SOD enzimi homodimerik yapıda olan 32 kDa'luk bir proteindir. Her subünitede bir adet bakır ve çinko molekülü içerir. Süperoksit dismutaz iki tane süperoksit anyonunu alarak hidrojen peroksit ve oksijen oluşturur (Şekil 1.2). Fizyolojik pH'da bu enzim tarafından katalizlenen reaksiyonun hızı yaklaşık $2 \times 10^9 M^{-1} sec^{-1}$. Bu hız, süperoksit anyonunun spontan dismutasyonundan 10^4 kere daha hızlıdır (ASLAN ve ark., 2002)



Şekil 1.2 Süperoksit Dismutaz Enziminin Yapısı ve Fonksiyonu

Kanser gelişimi ile antioksidant enzimlerin aktivite değişiklikleri arasında bir ilişki olabileceği şüphesizdir. Bu hipotezimizi son günlerde yayınlanan makaleler destekler niteliktedir. Örneğin CHEN ve ark. (2007), COX-2 ifadesinin artışı ile NFκB aktivasyonu arasında ilişki olabileceğini rapor etmiştir. SHARMA ve ark. (2006), akciğer kanser hücrelerine alfaclass GST izoenzimi hGSTAT-1 ile kalıcı transfekte ettiklerinde, bu hücrelerde lipid peroksidasyonunu önemli ölçüde baskılandığını ve

hücrelerin doksorubicin toksisitesine karşı direnç kazandıklarını rapor etmişlerdir. Literatürde rapor edilen bu çalışmalar bizi, akciğer kanser gelişimi üzerinde radikal süpürücü enzimlerin aktivitelerinin de rolü olabileceğini düşünmeye sevk etmiştir.

Literatürde antioksidant enzimlerin Akt kinazın aktivitesinde rol oynadıkları ve apoptosisi düzenledikleri de sık sık rapor edilmiştir (KIM ve ark., 2007, LI ve ark., 2006, GIELS 2006). Böyle bir ilişki olması kuvvetle muhtemeldir. Çünkü Akt aktivasyonunun NFkB aktivasyonuna ve apoptosisin baskılanmasına neden olduğu biz (OZES ve ark., 2001, GUSTIN ve ark., 2001, 2004) ve diğer araştırmacılar (NAIR ve ark., 2006; AHN, 2006) tarafından rapor edilmiştir. Ayrıca antioksidan enzim aktivite değişikliği ile invazyon ve metastaz arasında ilişki olabileceği de çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (LIU ve ark., 1999, NISHIKAWA ve ark., 2002, HALLIWELL, 2007).

Kanser hücrelerinde antioksidan enzim aktivitelerinin yükseldiği sıklıkla rapor edilmiştir. İlginç olarak antioksidan enzim aktivitelerinin malign tümör fenotipi ile invazyon ve metastazın ilişkili olabileceği de öne sürülmüştür (NONAKA ve ark., 1993, YOSHIZAKI ve ark., 1994, MONTE ve ark., 1997,). Akt aktivasyonu (KIM ve ark., 2001, GRILLE ve ark., 2003, YAGCI ve ark., 2004) ile antioksidan enzim aktivitesinin (SUH ve ark., 1999, YANG ve ark., 2001, ARNOLD ve ark., 2001, ARBISER ve ark., 2002) invaziv ve metastatik tümörlerde değiştiğinin rapor edilmesi bizi Akt kinaz, antioksidan enzimler ile invazyon arasında bir ilişkinin olabileceğini düşünmeye itmiştir. Çünkü, Akt aktivasyonunun anchorage bağımsız çoğalma ile doğrudan ilişkili olabileceği düşünülmektedir (NAKANISHI ve ark., 2002). Fosforillenmiş Akt'nin bir transkripsiyon faktörü olan NFkB'nin transkripsiyonel aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (OZES ve ark., 1999). NFkB hücrelerin yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli bir faktördür ve çeşitli hedef genlerin ekspresyonunu indükleyerek invazyon ve metastazı ilerletmesi mümkün olabilir. Örneğin, NFkB'nin Kemokin reseptörünün ifadesini indükleyerek kanser hücrelerinin migrasyonunu, invazyonu ve metastazını ilerlettiği rapor edilmiştir (MBURU ve ark., 2006). NFkB hücre yaşamı için gerekli bir transkripsiyonel faktördür. Kanser hücreleri metastaz yapmak için çeşitli genlerin ifadesine ihtiyaç duyarlar. Bu sebeple ihtiyaç duyulan genlerin transkripsiyonlarını aktifleştirecek bir transkripsiyon faktörüne ihtiyaç olması muhtemeldir. Antioksidan enzimler hücreyi apoptosisten koruyorlar ve/veya

invazyonda da rol alıyorlar ise ifadelerinin NFkB tarafından düzenleniyor olması kuvvetle muhtemeldir. Ayrıca antioksidan enzim aktivitelerinin PI3K ile ilişkili olabileceği de farklı hücre tiplerinde gösterilmiştir(PAUL ve ark., 1997, SALH ve ark., 1998, BHAT ve ark., 1998, CRUZ ve ark., 1999).

2.Gereç ve Yöntem

2.1 PTENG129E ve PTENG129R Mutanlarının Yönlendirilmiş Mutasyon Yöntemiyle Yaratılması

PTEN G129R ve PTEN G129E mutantlarının yaratılması için stratagen'in "yönlendirilmiş mutasyon" kiti kullanılacaktır. Bu kit kullanılarak hazırlanacak olan 2 çift primer ile PTEN geninin iki mutantı yaratılmış olacaktır. Bu iş için kalıp olarak hızlı destek projemiz sayesinde klonlamayı başardığımız PTEN wt cDNA kullanılacaktır. Normal wt PTEN proteininde 129. amino asit olan glisini kodlayan kodon GGA dır. Glisini kodlayan bu kodon PTEN G129R mutasyonunda AGA dizisi ile değiştirilerek Arjinin amino asitine, PTEN G129E de ise GAA dizisi ile Glutamik asite tek baz değişikliği ile dönüştürülecektir. Yönlendirilmiş mutasyon yöntemiyle mutant PTEN genlerinin yaratılıp yaratılmadığı sekans analizi yardımıyla test edilmiştir. Sekans analizi ile doğrulanan PTEN wt ve mutant genleri daha sonra pcDNA 4 TETON vektörüne klonlanmıştır.

GGA -->AGA değişikliği yaptıracak primer seti;

upper primer

5' TGT AAA GCT GGA AAG A'GA CGA ACT GGT GTA-3'

Lower Primer

5'- TAC ACC AGT TCG TCT CTT TCC AGC TTT ACT-3'

GGA-->GAA değişikliği yapacak primer seti

upper primer

5' TGT AAA GCT GGA AAG GAA CGA ACT GGT GTA-3'

Lower Primer

5'- TAC ACC AGT TCG TTC CTT TCC AGC TTT ACA-3'

2.2 PTEN, Akt, NFkB ile SOD ve GPx İfade ve Aktivitelerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda Akt aktivitesi Akt'nin serin 473 den fosforlanmış formunu tanıyan antibody kullanılarak belirlenmiştir. Bu antibody sadece fosforile olmuş dolayısı ile aktif Akt miktarını bize göstermiştir. PTEN, SOD ve GPx ifadeleri ise yine

spesifik antibodyler kullanılarak western blot tekniği ile gösterilmiştir. SOD, Katalaz, GPx aktiviteleri spektrofotometrik kinetik analizler ile saptanmıştır. NFkB aktivitesi için EMSA ve lüsiferaz gen reporter sistem kullanılacak, SOD ve GPx ifade düzeyleri ayrıca RT-PCR ile de belirlenmiştir.

2.3 SDS-PAGE ve Western Blot

Hücre protein ztleri TRX-100 tamponu içerisinde toplanan, örnekler 12000 x g de 4 °C'de 1 dakika santirfj edilerek istenmeyen hücre artıklarının ortamdaki uzaklaştırılması sağlandı. Toplanan örneklerden 1'er mikrolitre farklı ependorf tüplere alınarak ve Biorad protein miktarı tayin kiti (Biorad inc.) kullanılarak bu örneklerin protein miktarları saptandı. Daha sonra örneklerden, mikrolitrede 100 mikrogram protein olacak şekilde alındı ve bunların üzerlerine protein yükleme boyasından da (1/1 oranda) eklenerek 3.5 dakika su banyosunda kaynatıldı. Kaynatma işleminin hemen ardından ependorf tüp içindeki örnekler 10 mikrolitrelik otomatik pipet kullanılarak %10'luk SDS jeli uygulandı ve elektroforeze tabii tutuldu. Elektroforez işleminin ardından proteinler transfer tamponu içinde 4 °C de 75 mA akım şiddetinde bir gece boyunca immnobilin membran üzerine transfer edildiler. Bu işlemden sonra membran, %5'lik kuru süt içeren PBST zeltisi içinde oda sıcaklığında 2 saat bloklandı. Ardından aynı membran %5 kuru süt içinde 1:5000 (Akt, p-Akt, PTEN, SOD, GPx ve katalaz için) ve 1:50.000 (GAPDH için) oranlarında bulunan primer antikörlerle oda sıcaklığında 1 saat işaretlendi. Membran zerindeki spesifik proteinlerin primer antikörlerle işaretlemesinin ardından, membran 1 saat PBST ile oda sıcaklığında yıkandı. Yıkama işleminin bitmesiyle membran primer antikörlerin immnoglobulinlerine karşı spesifik olarak geliştirilmiş, 1:10000 oranında HRP (Horseradish Peroksidaz) bağlı sekonder antikör bulunduran %5 kuru sütlü PBST zeltisi içerisinde tekrar işaretlendi. Işaretleme oda sıcaklığında 1 saat yapıldıktan sonra, ECL zeltisi kullanılarak kemilmines reaksiyonu başlatıldı ve spesifik protein bantları kemilminesansa duyarlı film kullanılarak belirlendi.

2.4 NFkB Aktivitesinin Belirlenmesi

NFkB aktivitesi EMSA ve gen reporter sistem kullanılarak araştırılmıştır. Buna göre EMSA metodu için; Hücreler NFkB aktivite tayini için, 40 mM HEPES, pH 7.0, 100 mM KCL, %1 Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethysulfonyl fluoride, 1 mikrogram aprotinin, 1 mikrogram pepstatin A ve 1 mikrogram leupeptin çözeltisi içerisinde lizis edildiler ve bu lizattan 6 mikrogram protein izole edilerek Elektrophoretic mobility shift assays (EMSA) uygulandı. Hücresel protein non radyoaktif olarak işaretlenmiş double strand kB probu 5'-GTTGAGGGACTTTCCCAGG-3' ile 1 X Tris-EDTA, 1 mM KCl, %10 gliserol, 1 mM dithiothreitol ve 1 mg/ml polydeoxycytosine-deoxyinosine içeren çözelti içerisinde 30 dakika oda sıcaklığında reaksiyona bırakıldı. Ardından örnek %5 polyacrylamid jele yüklenerek elektroforez yapıldı. Elektroforez işleminin bitiminde jel PVDF membrana blotlandı ve oluşan DNA-protein kompleksi non-radyoaktif detektion kit (PIERCE) kullanılarak tespit edildi.

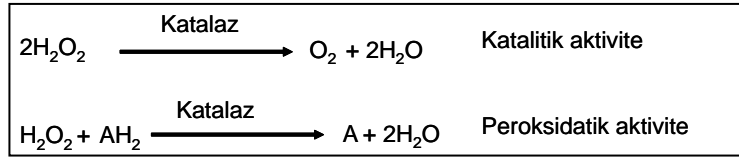
NFkB aktivitesinin tayinine yönelik yapılacak bir diğer metod ise lusiferaz aracılı gen reporter sistem kullanılarak yapılmıştır, bu yöntem için NFkB reporter vektörü Prof.Dr. David Donner'dan alınmıştır (University of California, USA). Dolayısı ile NFkB reporter vektörü PTEN wt ve mutantlarını ifade eden PC14 hücrelerine Fugen HD transfeksiyon reagentı kullanılarak aktarıldı ve daha sonra bu hücrelerdeki NFkB aktivitesi promega lüsiferaz detection kit kullanılarak luminometre yardımı ile belirlenmiştir.

2.5. Antioksidan Enzimlerin Aktivite Tayini

Deney gruplarından elde edilen hücreler proteaz inhibitör kokteyli içeren tampon içinde sonikasyonla lizise uğratıldıktan sonra santrifüj edilerek sitozolik fraksiyon eldesi sağlandı. Elde edilen süpernatantlarda katalaz, glutatyon peroksidaz ve speroksit dismutaz enzim aktivite tayini yapılmıştır.

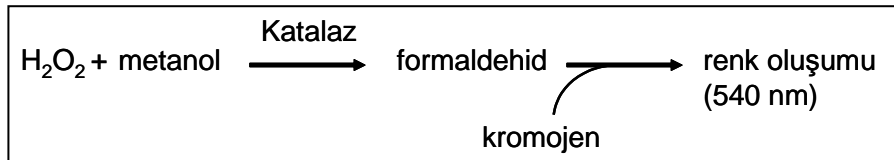
2.5.1 Katalaz Enzim Aktivite Tayini

Katalaz enziminin hem katalitik, hem de peroksidatik aktivitesi mevcuttur. Katalitik aktivite H_2O_2 'i moleküler oksijene ve suya çevirir. Peroksidatik aktivite ise düşük moleküler ağırlıklı alkolleri okside ederek su oluşturur (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1 Katalazın enzimatik aktivitesi

Hidrojen peroksiti parçalayan enzim yalnızca katalaz değildir, ancak alifatik alkolleri substrat olarak kullanan tek enzim katalazdır. Bu sebeple, katalaz enzim düzeyleri tayin edilirken enzimin peroksidatik aktivitesine bakıldı. Ortama alkol olarak metanol konuldu ve oluşan formaldehid Purpald denilen bir kromojen ile reaksiyona sokularak renk oluşumu tayin edilmiştir (Şekil 2.2).



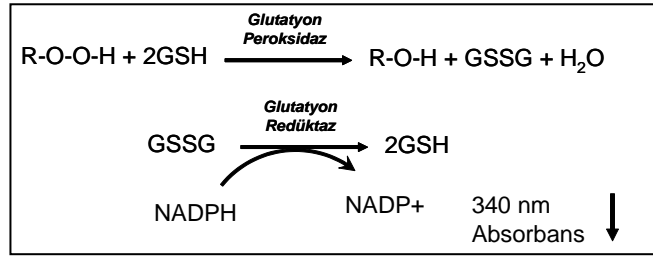
Şekil 2. 2 Katalaz enzim aktivitesinin tayin yöntemi

Katalaz enzim aktivitesinin hesaplanması oluşturulacak formaldehid standard eğrisiyle yapılır. Bir ünite katalaz aktivitesi, 1 dakikada oluşan μmol formaldehid olarak hesap edilir.

2.5.2 Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivite Tayini

Glutasyon peroksidaz enzimi, H_2O_2 dahil tüm hidroperoksitlerin redüksiyonunu sağlar. Bu işlevi sırasında da redükte glutasyonu kullanır. Oluşan okside glutasyon, glutasyon redüktaz enzimi ile tekrar indirgenir. Bu indirgenme sırasında NADPH kullanılır ve $NADP^+$ oluşur. NADPH'nın reaksiyon ortamından kaybı 340 nm'de

absorbans azalmasına neden olur ve bu azalmanın miktarından GPx enzim aktivitesi tayin edilir (Şekil 2.3).

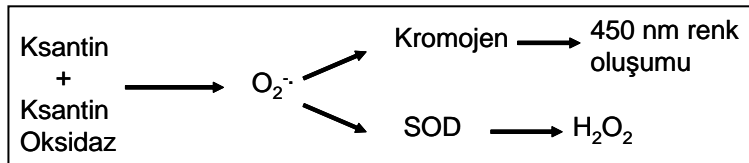


Şekil 2. 3 Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinin tayin yöntemi

Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinin hesaplanması, NADPH'nın 340 nm'deki extinction coefficienti ($0.00622 \mu\text{M}^{-1}$) değerinden yapılır. Bir ünite GPx aktivitesi, 1 dakikada kullanılan μmol NADPH olarak hesap edilir.

2.5.3 Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini

Süperoksit Dismutaz enzim aktivite tayini kompetatif inhibisyon yöntemine dayanmaktadır. Bu yöntemde, reaksiyon ortamında sürekli olarak süperoksit anyonu oluşturan ksantin oksidaz-hipoksantin sistemi mevcuttur. Bu sistemin açığa çıkardığı süperoksit anyonları reaksiyon ortamına ilave edilen kromojeni indirger ve 450 nm'de ölçülebilen renk oluşumuna neden olur (Şekil 2.4). Örneklerde ne kadar SOD enzimi varsa, renk oluşumu o kadar az olacaktır.



Şekil 2. 4 SOD enzim aktivitesinin tayin yöntemi

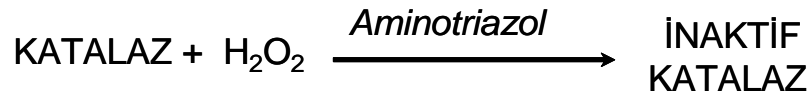
Örneklerdeki SOD enzim aktivitesinin hesaplanması, oluşturulacak SOD standard eğrisiyle yapılır. Bir ünite SOD aktivitesi, maksimum renk oluşumunu %50 inhibe eden SOD miktarı olarak kabul edilir.

2.5.4 Okside ve Redükte Glutasyon Miktarının ölçümü

Hücre örneklerinde bulunan redükte glutasyon (GSH) 2 vinylpyridine ile konjuge edildi. Daha sonra ortama glutasyon redüktaz enzimi ilave edilip okside glutasyon (GSSG) GSH'ya dönüştürüldü. GSH'da bulunan sülfidril grubu 5',5'-dithiobis-2-nitrobenzoic asid ile (DTNB-Ellman reaktifi) reaksiyona sokularak sarı renkli 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) oluşturuldu ve bu reaksiyonun tümünde TNB'nin oluşum miktarından GSSG'nun total miktarı tayin edildi.

2.5.5 Hidrojen Peroksit Ölçümü

Hücre içi hidrojen peroksit düzeyleri katalaz enziminin aminotriazol ile inhibisyon kinetigine bakılarak tayin edildi (Şekil 2.5). Katalaz enziminin inhibisyon hızı, ortamdaki hidrojen peroksit konsantrasyonu ile orantılı olacaktır.



Şekil 2. 5 Hücre içi hidrojen peroksit ölçüm yöntemi

Hücre içi hidrojen peroksit (H_2O_2) düzeylerinin ölçülmesi bu proje için önemli çünkü H_2O_2 , NFkB yolağına direkt olarak etken bir madde. Antioksidan enzimler H_2O_2 'yi temizleyebilir ancak bu enzim seviyelerinin hücrede artmış veya azalmış olması hücre içi H_2O_2 miktarı hakkında direkt bilgi vermez, sadece yorum yaptırabilir. Bir antioksidan enzimin artması, o hücre içinde serbest oksijen metabolitlerinin miktarının az olması ile eş değer değil. Hücre içinde serbest oksijen metabolitlerinin artması sebebiyle de antioksidan enzim seviyeleri artabilir. Hem H_2O_2 'yi ölçmek hem de antioksidan enzim düzeylerine bakmak asıl olanı bizlere gösterecektir.

2.6 Antioksidant Enzim İfadelerinin Belirlenmesi Semi-Kantitatif RT-PCR Yöntemi İle Yapılacaktır

Tekrar yaratılan PTEN wt ve mutantlarının antioksidant enzimler SOD ve GPx ifadelerine olası etkilerini saptamak için PTENwt, PTENG129E, PTENG129R kalıcı transfekte edilen akciğer kanseri hücre dizilerinin mRNA'ları Trizol yöntemi ile

(CHOMCYZNSKI ve SACCI, 1987) izole edildikten sonra antioksidant enzim ifadeleri RT-PCR yöntemi ile kantite edildi. Bu amaçla literatür taranarak uygun primer dizisi saptanmış ve ayrıntısı aşağıda verilmiştir (SINHA, 2005). Kalıcı transfekte edilen hücrelerden her grubun mRNA'sı ayrı ayrı izole edilip konsantrasyonu saptandıktan sonra, RT-PCR tek tüpte sentez yöntemiyle, ilk zincir cDNA sentezi Platinum Taq DNA Polimeraz kiti (Invitrogen) ile kitin manuelinin yönergelerine göre gerçekleştirildi. Ardından, 10 mM dNTP karışımı, 0,2mM aşağıda sekansları verilen primerler ile 98°C/5 dak ilk denatürasyonu takiben 95°C 71 dak, SOD2 ve GPx için 58°C/45sn, SOD1 için 60°C/45sn, 72°C/45sn 30 döngüde çoğaltıldı. İnternal reaksiyon kontrolü ve test bantlarının analizi için aktin geni mRNA'sı kullanıldı. Ürünler %2 agaroz jel elektoroforezinde ayrıldıktan sonra, jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip, bantların yoğunlukları imaj analiz programı ile belirlenecek ardından aktin mRNA seviyesi standart alınarak antioksidant enzim ifadelerindeki değişiklikler yorumlandı.

(Zn-Cu)SOD1:

F: 5'-AGC GAG TTA TGG CGA CGA AG-3'

R: 5'-GGA TCG CCC AAT AAA CAT TCC C-3'

(Mn)SOD2:

F: 5'-ATA TCT AGA TAAGCC AGC ACT AGC AGC-3'

R: 5'-ATA TCT AGA GCA CAT CTT AGA AGA CAG GAC-3'

(GPx) Glutasyon Peroksidaz:

F: 5'-CCT TCT AGA ATT GCG CCA TGT GTG CTG-3'

R: 5'-ATA TCT AGA GGA GGG GCG CCC TAG GC-3'

Aktin:

F: 5'-GCT CGT CGT CGA CAA CGG CTC-3'

R: 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'

2.7 Kalıcı Transfeksiyon Yoluyla PTEN Vektörlerinin Hücelere Aktarımı

2.7.1 PTEN cDNAların pcDNA4TETON Vektörüne Klonlanması

Planlanan çalışmada kullanılacak vektör klonlanan genin ifadesinin tetrasiklin ile kontrol edilmesine olanak sağlayan TETON vektörüdür. Boş vektör multiple klonlama bölgesinde taşıdığı EcoRI restriksiyon enzimi kesim bölgesi kullanılarak kesilecek ve PTEN wt ile mutant genleride aynı enzimle kesildi. Restriksiyon endonükleaz kesimi 37°C 16 saat olarak yapıldı ve 1 mikrogram DNA 1 Unite enzim kullanılarak kesildi. Kesimin doğrulanması %1 agaroz jel elektroforezinde yapıldı. Kesildiğine emin olunan insört PTEN cDNA'ları ve vektör U.V. ışığı altında jelden bistrü ile kesilerek bir ependorf tüpe alındı ve hemen promega'nın gelden DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA'lar izole edildiler. Daha sonra ligation reaksiyonunda vektörün kendi kendine kapanmasını (insört almadan) engellemek amacı ile vektör alkalin fosfataz enzimi (CIAP) ile aşağıda belirtildiği şekilde defosforile edildiler;

4 mikrogram Vektör DNA

20 Unit Calf Intestinal Alkaline Fosfataz

5ml 10xAlkaline Fosfataz Buffer

ve toplam hacim 50 mikro litreye Steril distile su kullanılarak tamamlandıktan sonra, 37°C de 30 dakika inkübe edilecek ardından enzimin inaktif hale getirilmesi için 75°C de 10 dakika inkübe edilecektir. Ardından 2 kez fenol/kloroform (1:1) ekstraksiyonu yapılarak örneğe final konsantrasyon 150 mM olacak şekilde NaCl eklenecek ve üzerine örneğin 2.5 katı soğuk etanol konularak prespite edildi ve böylece 3'fosfat grupları uzaklaştırılmış vektör DNA saf olarak elde edilmiştir.

Defosforile edilen vektör spektrofotometrik olarak konsantrasyonu hesaplandıktan sonra vektör insört oranı 1 e 4 olacak şekilde PTEN wt, PTEN G129E, PTEN G129R için ayrı tüpler hazırlanacak ve bu tüplere; T4DNA ligaz + T4 DNA ligaz 10x Buffer da ilave edilip total hacim 20 mikrolitreye steril distile su tamamlanıp 16°C de 16 saat inkübe edilerek ligation reaksiyonun tamamlanması sağlanmıştır.

2.7.2 Transformasyon

Ligation reaksiyonunun bitmesinin ardından tüm örnek E.Colinin bir suşu olan JM109' a transformasyon yoluyla aktarılıp daha sonra plazmit izolasyonu yapıldı ve klonlamanın olup olmadığı klonlamada kullanılan EcoRI enzimi ile kesim yapılarak agaroz jel elektroforezinde test edildi. Buna göre klonlama gerçekleşiyse PTENwt, PTEN G129R ve PTEN G129E için restriksiyon endonükleaz kesimi sonucunda 5.3 kb(vectör) ve 1.2 kb (PTEN cDNA) olmak üzere 2 bant verecektir. Ardından hazırlanan PTEN wt, PTEN G129R ve PTEN G129E ifade vektörleri tekrar sekans analizine gönderilerek klonlama sırasında herhangi bir mutasyon yaratılmadığı test edildi ve ifadesinin doğrulanması için kalıcı transfeksiyon yönteminden önce geçici transfeksiyon yöntemiyle PC14 hücrelerine FUGEN HD kullanılarak aktarıldı ve PTEN ifade vektörlerinin çalışıp çalışılmadığı da western blot yöntemiyle kontrol edildi.

2.8 İnvazyonunun Belirlenmesi

Planlanan çalışmada PTEN'in hücre invazyonuna etkisinin saptanması için BioCoat Matrigel İnvazyon Chamber-İnvazyon odaları (BD Biosciences, Clontech) kullanıldı. Bu invazyon odacıklarının hücrelere sağladıkları özel şartlar sayesinde biz *in vitro* koşullar altında hücrelerin invaziv özelliklerini saptayabilmekteyiz. Bu invazyon odacıkları 8 mikron çaplı porlar içeren bir membran ile örtülüdür ve bu porlu membran ayrıca bir matrijel matrix ile kaplıdır. Bu matrigel matrix bize bazal membranı *in vitro* koşullarda oluşturma imkanı sağlar. Bu membran sayesinde invaziv özelliği olmayan hücrelerin membranın diğer yüzeyine geçmesi engellenmektedir. Bu membrandan diğer yüze ancak invaziv hücreler geçebilmektedir. Dolayısı ile matrijel membran bize invaziv ve invaziv olmayan hücrelerin birbirinden ayırabilme imkanı sunar.

Boş vektör ve stabil PTEN ifade eden (PTENwt (pcDNATETON-Pten), PTEN G129E (pcDNATETON -PTEN G129E), PTEN G129R (pcDNATETON -PTEN G129R)) PC14 hücreleri her invazyon odasında 1.25×10^5 olacak şekilde invazyon odalarına ekildi üzerlerine 0.5ml RPMI1640 (serum içermeyen) konulurken invazyon

odacığının dışına 0.75 ml %10 FBS içeren RPMI1640 konuldu hücreler 24 saat 37⁰C de CO₂'li inkübatörde inkübe edildiler. İnkübasyon saatinin sonunda invaziv özellikte olan hücreler invazyon odacığının porlu olan membranının dış yüzeyine geçeceklerinden invazyon odacığının içindeki besi yeri uzaklaştırıldı ve ardından spatülle iç yüzeyindeki hücreler kazınıp atıldı. Dış yüzeydeki hücreler önce metanol ile fixe edildi, ardından da Toluidine (%1) ile boyanıp, kurutuldu ve mikroskop altında invaziv hücreler sayıldı.

2.9 Hücrelerin Soft Agarda Koloni Oluşturma Yeteneklerinin Belirlenmesi

İnvazyon ve metastaz olaylarının erken aşamasında hücrelerin buldukları veya tutdukları bölgeden ayrılmaları gelmektedir. Bu sebeple Invaziv kapasitelerinin belirlenmesinde bir diğer etkili metod “anchorage bağımsız” büyüme yeteneklerinin saptanmasıdır. Bu yöntemde, kalıcı olarak pcDNATETON boş vektörü, PTENwt (pcDNATETON -PTEN), PTEN G129E (pcDNATETON -PTEN G129E), PTEN G129R (pcDNATETON -PTEN G129R) kalıcı transfekte edilen PC14 hücreleri aşağıda ayrıntılı şekilde anlatıldığı gibi hazırlanan olan soft agar içersinde büyümeye bırakıldı ve 3 hafta sonra hücrelerin oluşturdukları koloni sayısı tespit edildi. İki kat konsantrasyon olarak hazırlanacak olan RPMI1640 besi ortamı ve %1.2 lik noble agar steril edildikten sonra agar ve besi ortamı 1:1 oranında karıştırılarak alt zemin agarın (%0.6 konsantrasyonunda) her wellde 1.5 ml olacak şekilde 6 well platelere döküldü ve donması beklendi. Bu aşamada üst tabaka agarın hazırlanması için hücreler tripsinize ederek ayrı ayrı sayıldı ve her gurup birbirinden ayrı 1x10⁵ hücre/ml olacak şekilde steril tüpler içinde bekletildiler. Sayılan hücreler her deney grubu için 50 ml tüp içersine, her örnekten 3 tekrarlı olacak şekilde 2ml 2x besi ortamı+1ml %1.2 noble agar+0.6ml distile su+0.4 ml stok hücre konarak karıştırıldı ve 6 weller'de kurumuş olan alt tabaka agar üzerine ikinci tabaka olarak her welle 1ml döküldü. Bu şekilde hazırlanan hücreler 37⁰C de %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde 3 hafta inkübe edildiler. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler %1.5 glutaraldehit ve %0.06 metilen mavisi içeren PBS içersinde fikse edilip boyanarak oluşturdukları koloni sayısı belirlendi.

3.Bulgular

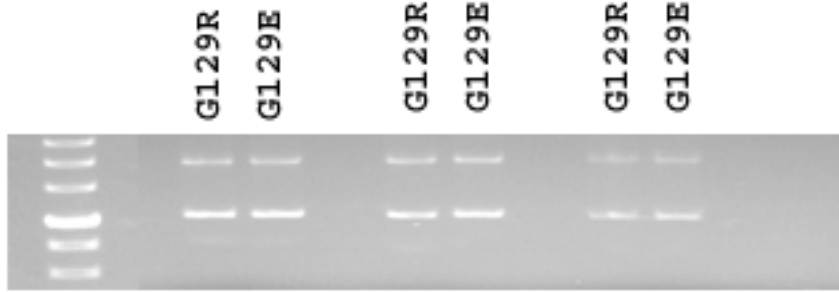
3.1 Yönlendirilmiş mutasyon Yöntemi İle Wt-PTEN cDNA'da PTENG129R ve PTENG129E Mutasyonlarının Oluşturulması

PTEN, dual etkili (hem protein fosfataz hem de lipid fosfataz olmak üzere iki farklı etkisi olan) bir tümör baskılayıcı gen ürünüdür. Bu dual etkisinde 129. amino asitin rolünün önemli olduğu rapor edilmiştir (MAYERS MP. ve ark., 1998, OKUMURA K. ve ark., 2005). Normalde wt PTEN proteinin 129. amino asiti glisindir (GGA) ve bu PTEN tümör supressör geninin hem lipid defosforilaz hem de protein defosforilaz etkisini göstermesine izin verir. 129. aminoasitin glutamik asit ile yerdeğiştirmesi (GAA) PTEN in lipid fosfataz aktivitesinin kaybına neden olup protein fosfataz aktivitesinin devamını sağlar (MAYERS ve ark., 1998). 129. amino asitin arjinine (AGA) dönüştürülmesi PTEN in hem protein fosfataz hem de lipid fosfataz aktivitesinin kaybına neden olarak katalitik olarak inaktif PTEN yaratır (OKUMURA ve ark., 2005). Dolayısı ile dual etkili olan PTEN' in NSCLC daki invazyonu baskılayıcı etkisinin protein fosfataz etkisi ile mi, yoksa lipidfosfataz etkisi ile mi olduğunu anlamak amacıyla projemizde PTEN geninin iki mutantının oluşturulmasını amaçladık. Bu amaçla, Nokta mutasyonlarının oluşturulması için "genTailor Site-Directed Mutagenesis System" (invitrogen) kullanılmıştır.

Bu sistem kabaca şöyle çalışmaktadır: Kalıp olarak kullanılacak olan mutasyonu yapılacak olan cDNA'yı ihtiva eden ifade vektörü ilk önce metilasyon reaksiyonuna tabi tutuluyor ve böylece metillenmesi sağlanıyor, ardından bu metilli vektör kalıp olarak kullanılarak, yaratılması istenilen nokta mutasyonunu taşıyan primerler ile PCR reaksiyonu gerçekleştiriliyor ve böylece istenilen mutasyonu ihtiva eden ifade vektörü PCR reaksiyonu sonucu sentezlenmiş oluyor. Dolayısı ile işlemlerin ardından kalıp olarak kullanılan ve wt cDNA'yı içeren vektör metillenmişken yeni sentezlenmiş ve istenilen mutasyonları taşıdığı düşünülen vektör metillenmemiş oluyor. Ardından tüm bu ürünler özel bir E.Coli suşu olan DH5alfa-T1'e transforme edildiler. Bu suşun özelliği sahip olduğu "Mcr" ve "Mrr" restriksiyon enzimleri sayesinde metillenmiş olan DNA'yı keserek metilli kalıp DNA'nın yıkılmasına sebep vermeleridir. Dolayısı ile tüm PCR reaksiyonu bu DH5alfa-T1 E.Coli suşuna transformasyon yöntemi ile aktarıldığında tüp içinde az miktarda olan metillenmiş

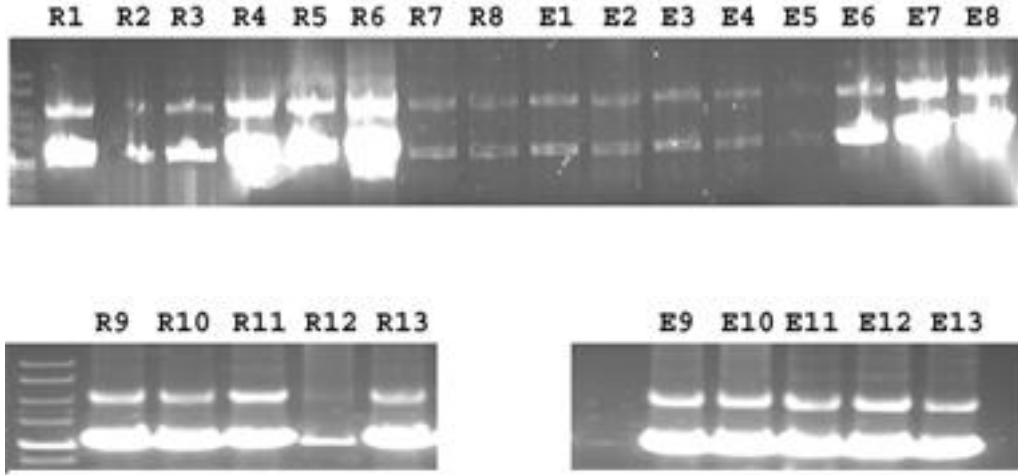
kalıp wt cDNA'yı taşıyan vektör bakteri enzimleri tarafından yıkıldığından ve sadece PCR reaksiyonu sayesinde oluşturulan metilsiz ifade vektörünün bakteride çoğaltılması sağlanmıştır.

Biz bu yöntemle PTEN cDNA'da G129R ve G129E mutasyonlarını yöntem bölümünde ayrıntılı olarak açıkladığı gibi klonladık. "Yönlendirilmiş mutasyon" reaksiyonları birbirinden bağımsız günlerde 3 tekrar olarak yapılmıştır. Bu deneyler sonucu elde edilen PCR ürünleri şekil 3.1'de görülmektedir.



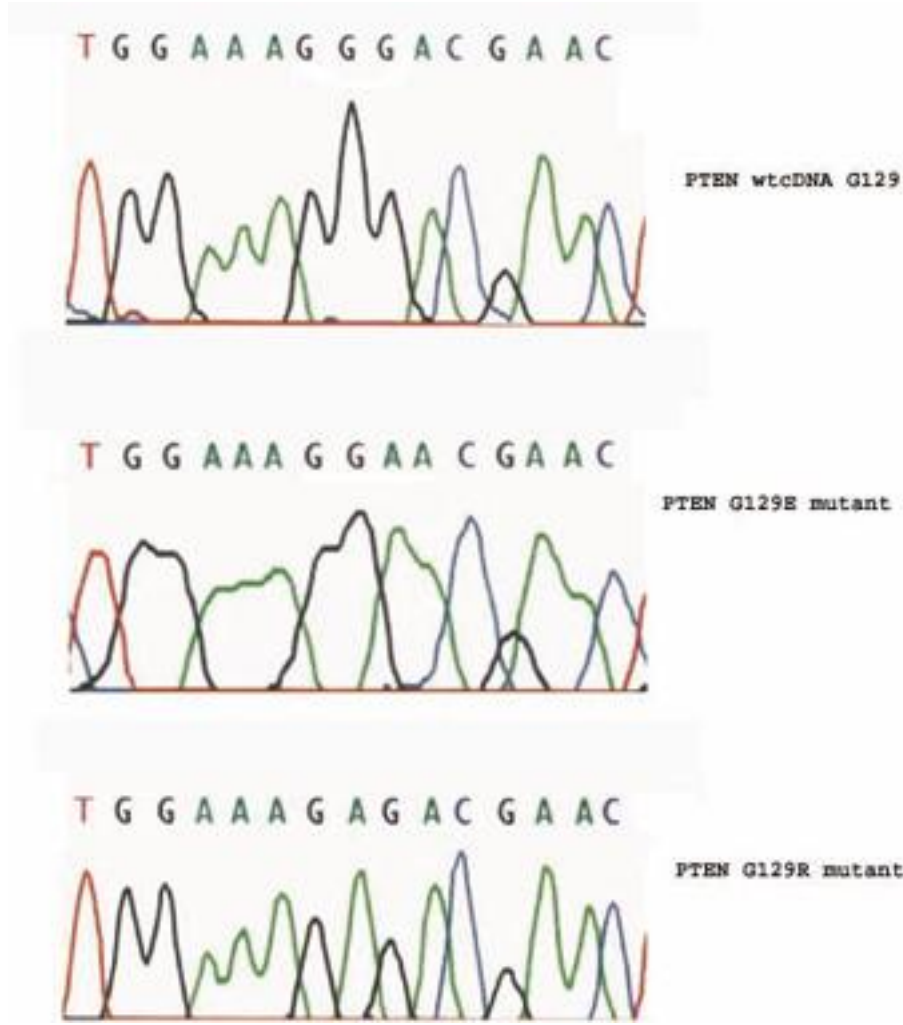
Şekil 3. 1 Yönlendirilmiş mutasyonun yaratıldığı PCR reaksiyonu sonucu oluşan ürünler

Şekil 3.1 de görülen pcr ürünleri (birbirinden bağımsız 3 farklı deney sonucu elde edilmişlerdir) DH5alfa-T1 E.Coli suşuna transforme edildiler. Bu suşun özelliği sahip olduğu Mcr ve Mrr restriksiyon enzimleri sayesinde metilenmiş olan DNA yı keserek metilli kalıp DNA'nın yıkılmasına sebep vermeleridir. Dolayısı ile tüm PCR reaksiyonu bu DH5alfa-T1 E.Coli suşuna transformasyon yöntemi ile aktarıldığında tüp içinde az miktarda olan metilenmiş kalıp DNA yıkılacak ve PCR reaksiyonu sayesinde oluşturulan mutasyonu taşıyan DNA bakteride çoğaltılacaktır. İfade vektörümüzün amphisilin direnç geni taşıdığından dolayı transformasyon işleminden sonra DH5alfa-T1 E.Coli suşu amphisilin (50 mikrogarm/ml) içeren katı besi yerine yayma yöntemi ile ekilmiş ve 37°C'de 18 saat inkübe edildiklerinde kolonilerin oluştuğu gözlenmiştir. Oluşan bu kolonilerin hangisinde bizim yarattığımız mutasyonun oluştuğunu saptamak amacı ile tek koloni yöntemi ile tek tek alınarak amphisinli (50 mikrogarm/ml) LB içersinde 37°C de 24 saat çoğaltılan bakterilerden plazmit izolasyonu yapılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2 DH5alfa-T1 E.Coli suşundan izole edilen plazmitler.

Dolayısı ile PTENG129R ve PTENG129E mutasyonları için 13'er farklı koloniden izole edilen 26 farklı plazmit (Şekil 3.2) mutasyonun yaratılıp yaratılmadığını doğrulamak için DNA sekans analizine gönderilmiştir. DNA sekans analiz sonuçları G129R mutasyonunun R2 ve R11 isimli kolonilerde, G129E mutasyonunun ise E2 isimli kolonide olduğunu doğrulamıştır (Şekil 3.3).



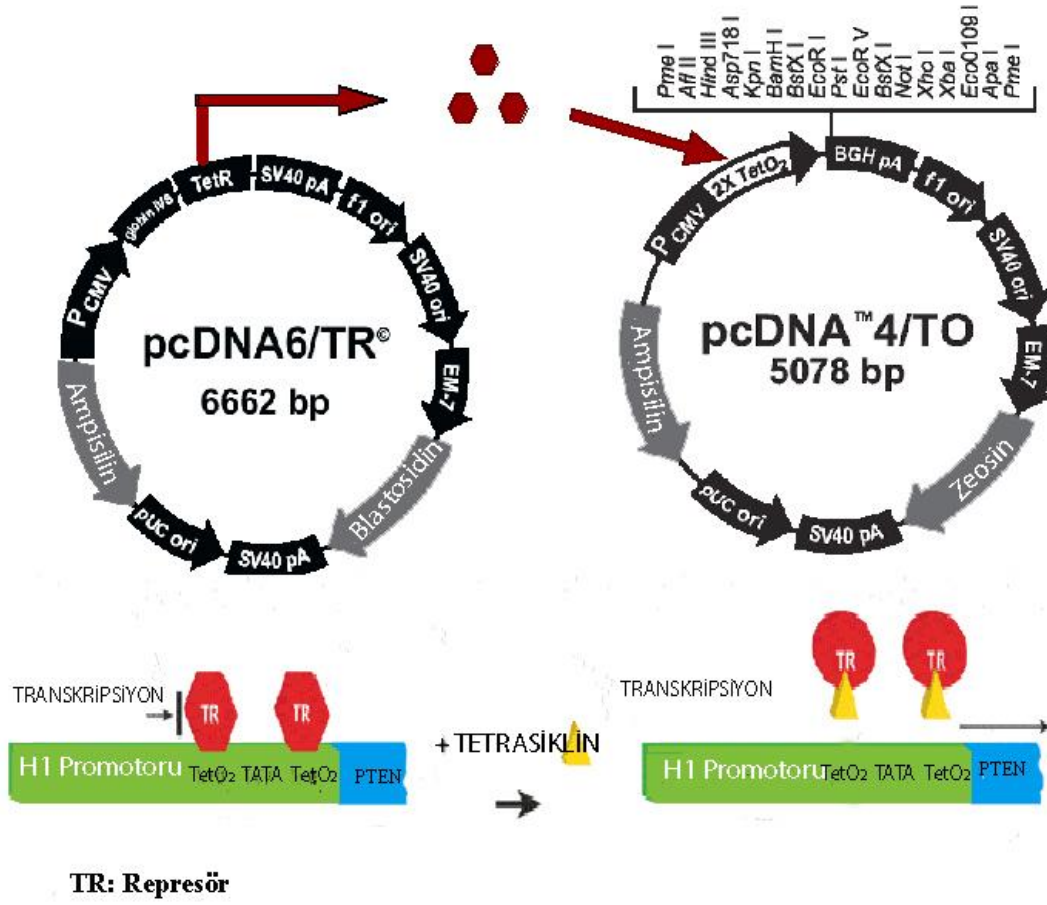
Şekil 3. 3 Yönlendirilmiş mutasyon reaksiyonu ile istenilen mutasyonların yaratıldığını gösteren DNA sekans analiz sonucu

Dolayısı ile bu sonuçlar Projemizde yapmayı ön gördüğümüz PTEN G129R ve PTEN G129E mutasyonlarının yapıldığını açıkça göstermektedir.

3.2 TETON Sistemine PTENcDNA'ların Klonlanması

Bir önceki TÜBİTAK projemizde wt PTENcDNA'sını klonladığımız ve bu proje çalışmalarımızda da kalıp olarak kullandığımız PTENwt pcDNA3.1 vektörü bir aşırı ifade vektörüdür. Dolayısı ile tümör baskılayıcı genlerin aşırı ifadesi hücre ölümüne sebep olabileceğinden gen transferi sonrası transfekte hücrelerin seçiliminde problem yaşanacağı öngörülerek bu çalışmamızda vektör sistemi olarak kültür ortamına tetrasiklin eklendiğinde klonlanan genin ifadesine izin veren TETON ifade vektör

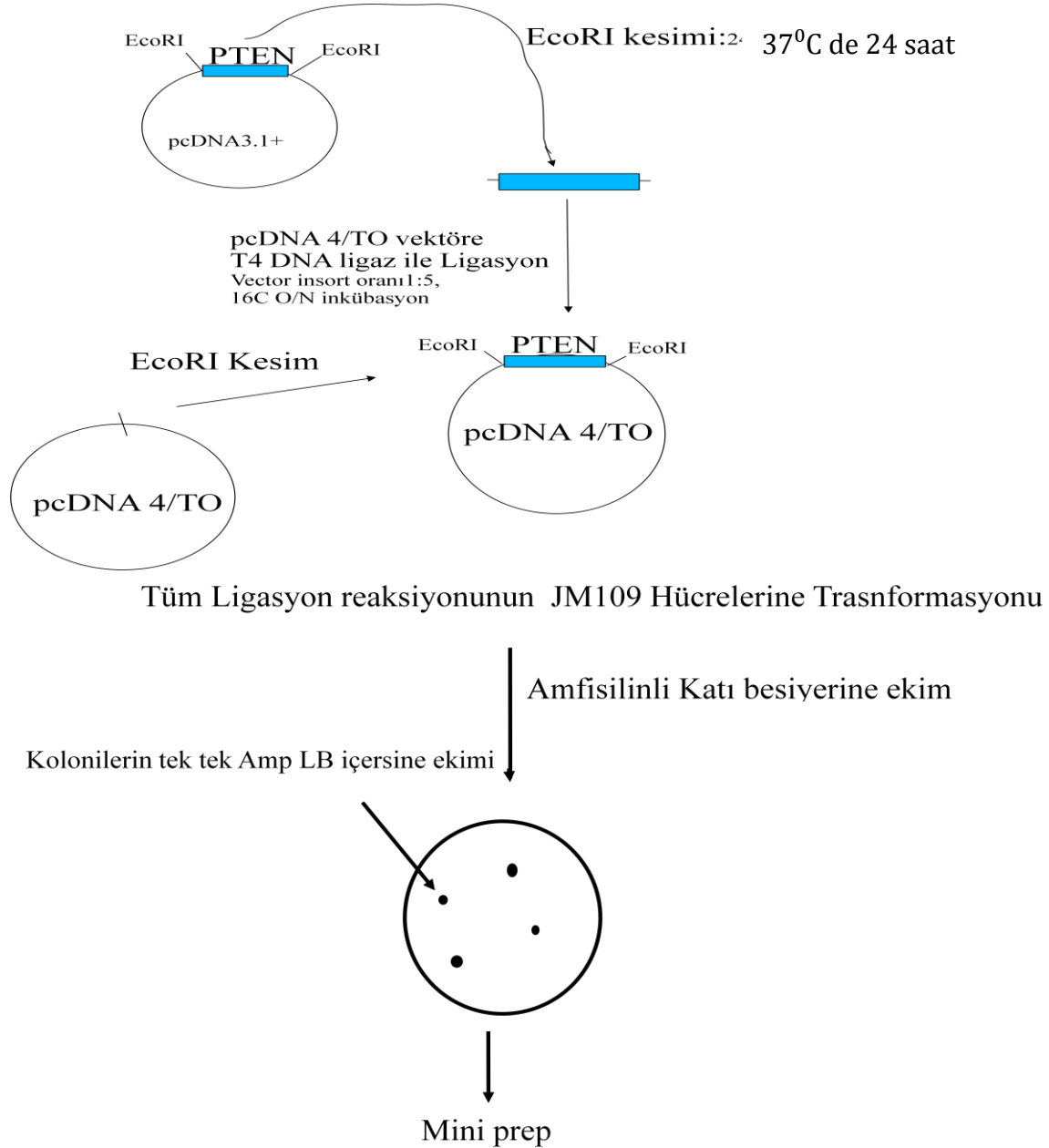
sistemi kullanılmıştır. Bu vektör sistemi pcDNA6/TR ve pcDNA 4/TO olmak üzere iki vektörden oluşmaktadır (Şekil 3.4).



Şekil 3. 4 TETON sistem vektörleri iki vektörden oluşmaktadır. PcDNA6/TR devamlı bir represör ifadesi yaratır ve bu repressor pcDNA 4/TO vektörünün promotorunda yer alan bağlanma bölgesine bağlanarak promotor altına klonlanan genin ifadesine engel olur. Ortama tetrasiklin eklendiğinde ise tetrasiklin represöre bağlanır ve repressörün pcDNA 4/TO promotoruna bağlanmasını engelleyerek klonlanan genin ifadesine izin verir.

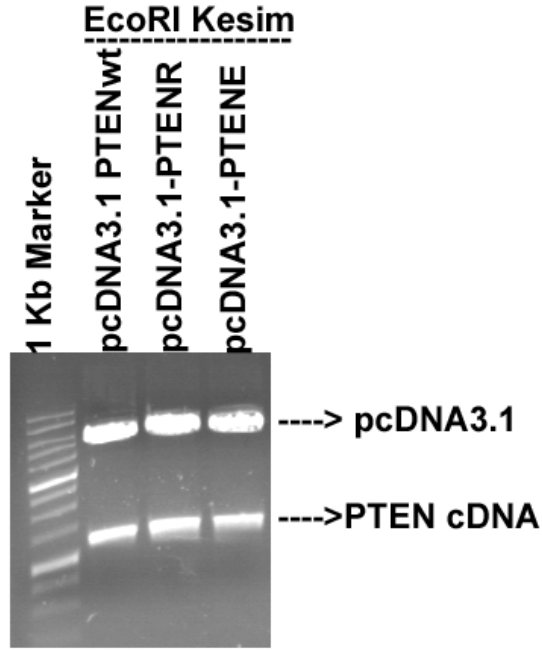
Bir önceki TÜBİTAK projemiz kapsamında pcDNA3.1'e klonlanan PTENwt bu çalışmalarımız kapsamında "Yönlendirilmiş mutasyon" reaksiyonunda kalıp olarak kullanıldığından dolayı wt ve G129E,G129R mutasyonlu PTEN cDNA'ların tümü pcDNA3.1 vektörü üzerinde yer almıştır. Dolayısı ile bunların bu vektörden çıkartılarak TETON vektör sistemi taşıyıcı vektörü pcDNA4/TO vektörüne yeniden

klonlanmaları gerekmektedir. Buna göre ilk önce pcDNA3.1-PTENwt, R ve E plazmitleri EcoRI enzimi ile kesilerek PTENwt, R ve E cDNA'ları izole edilecek bundan sonra bu cDNA'lar ve bunların klonlanacağı pcDNA4/TO EcoRI ile kesilecek, ardından da pcDNA4/TO vektörüne PTENwt, R ve E cDNA'ları ligation reaksiyonu ile takılacaktır. Bu klonlama stratejisini aşağıdaki şekilde görmekteyiz (Şekil 3.5).

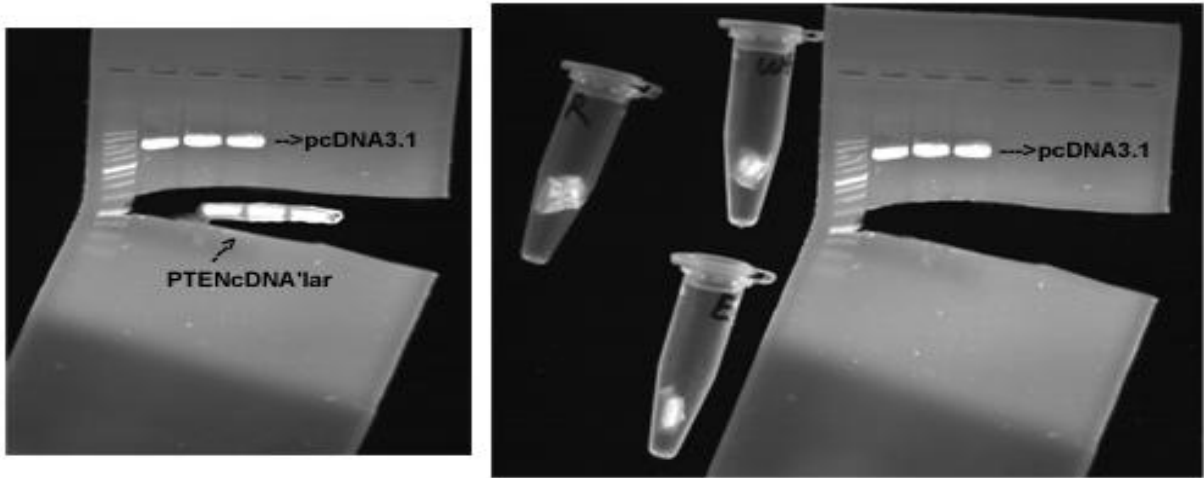


Şekil 3.5 pcDNA 3.1-PTENwt, pcDNA3.1-PTENR, pcDNA3.1-PTENE'lerden PTENcDNA'larının çıkartılarak TETON sistem vektörü pcDNA4/TO vektörüne klonlanmaları

Dolayısı ile pcDNA 3.1-PTENwt, pcDNA3.1-PTENR, pcDNA3.1-PTENE 'lerden PTEN cDNA'lar EcoRI enzimi ile 37⁰C'de (1mikrogram DNA, 1U EcoRI, 1x Buffer) kesilerek agaroz elektroforezinde cDNA'ların vektörden ayrıldığı görülmüş (Şekil 3.6) ve ardından bu cDNA'lar jelden kesilerek izole edilmiştir (Şekil 3.7).



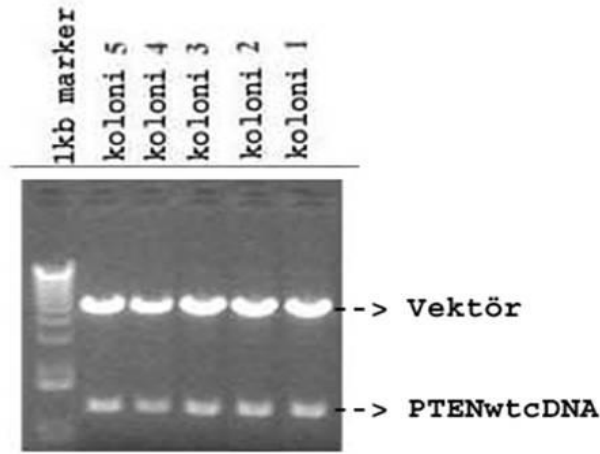
Şekil 3. 6 PTEN cDNA'ların pcDNA vektörden çıkarılması



Şekil 3. 7 PTENwt, R ve E cDNA'ların jelden kesilerek izolasyonu

Ardından jelden izole edilen PTENwt, G129R ve G129E cDNA'ları "Promega jelden DNA ekstraksiyon kiti" kullanılarak saflaştırılmış ve agarozdan arındırılmıştır. Bu cDNA'ların TETON sistem vektörlerinden pcDNA4/TO, vektörüne klonlanması amacı ile bu vektör ve jelden izole edilen PTENCdDNA'lar EcoRI enzimi ile 37°C'de (1mikrogram DNA, 1U EcoRI, 1x Buffer) kesilerek klonlama için gerekli komplementer sarkık uçların hem vektör hem de insörtlerde oluşturulması sağlanmıştır. Restriksiyon enzim kesim işleminin ardından pcDNA4/TO vektörünün insörtleri almadan kapanmasını engellemek amacı ile vektör Alkalen fosfataz enzimi ile 37°C de 12 saat defosfore (2 mikrogram Vektör DNA, 2U Alkalen fosfataz, 1x Buffer) edilmiştir. Bu sayede hazırlanan vektör ve PTENCdDNA'lar T4 DNALigaz enzimi ile 16°C de 18 saat ligation reaksiyonuna (500ng defosforile edilmiş vektör, 1500ng PTENCdDNA, 2U DNAT4Ligaz, 1x Ligaz Buffer) tabi tutulmuşlar ve ardından JM109 kompotent bakterilere bu tüm ligation reaksiyon içerikleri TET4-PTENwt, TET4-PTENG129R ve TET4-PTENG129E olarak işaretlenerek ısı şoku ile transforme edilmişlerdir. Transformasyon işleminin ardından bakteriler 50 mikrogram/ml amfisilin içeren katı besi yerlerine ekilmiş ve 37°C de 24 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresinin sonunda beliren kolonilerden tek koloni ekim yöntemi ile bakteriler alınıp 50mikrogram/ml amphisilin içeren sıvı LB içersinde çoğaltılmış ve kolonilerden plazmitler tek tek QIAGEN plazmit izolasyon kiti kullanılarak izole edilmiştir. Klonlamanın doğru bir şekilde gerçekleştiğini doğrulamak için kolonilerden izole edilen plazmitler klonlamada kullanılan EcoRI enzimi ile 37 °C'de 24 saat kesilmiş ve süre sonunda reaksiyon ürünleri agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. Buradan beklenen klonlamanın gerçekleştiği kolonilerden izole edilen plazmitlerin EcoRI kesimi sonucu klonlanan vektörden insörtün ayrılması ile insört (PTENCdDNA) ve vektörün iki ayrı bant olarak jelde belirmesidir.

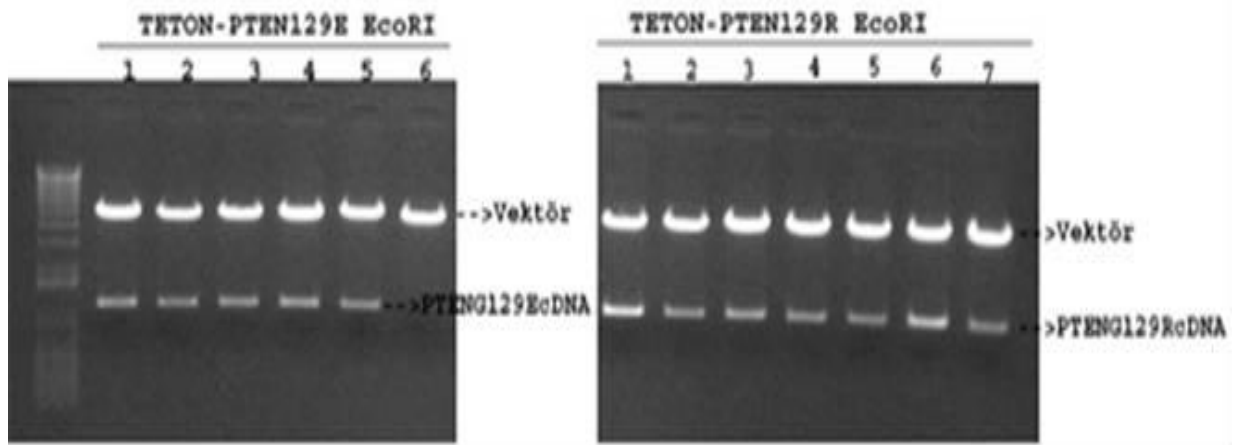
Bu amaçla, pcDNA4/TO-PTENwt ligation reaksiyonu transforme edilmiş bakterilerin bulunduğu petri kabından alınan 5 kolonide de klonlamanın gerçekleştiği ve pcDNA4/TO vektörüne PTENwt cDNA'nın yerleştirildiği anlaşılmaktadır (Şekil 3.8)



Şekil 3. 8 EcoRI enzim kesiminin ardından seçilen beş kolonininde PTENwt ihtiva ettiği görülmektedir

pcDNA4/TO-PTENG129E ligation reaksiyonu transforme edilmiş bakterilerin bulunduğu petri kabından alınan 6 kolonin 5 inde (6. Klon hariç) klonlamanın gerçekleştiği ve pcDNA4/TO vektörüne PTENG129E cDNA'nın yerleştirildiği anlaşılmaktadır (Şekil 3.8).

pcDNA4/TO-PTENR ligation reaksiyonu transforme edilmiş bakterilerin bulunduğu petri kabından alınan 7 koloniden 7'sinde klonlamanın gerçekleştiği ve pcDNA4/TO vektörüne PTENG129R cDNA'nın yerleştirildiği anlaşılmaktadır (Şekil 3.9)



Şekil 3. 9 EcoRI enzim kesiminin ardından PTENG129E için seçilen altı koloniden 5 tanesinde (6. koloni hariç) klonlanmanın gerçekleştiği görülürken, PTENG129R için ise seçilen 7 kolonin tümünde klonlamanın gerçekleştiği görülmektedir.

Klonlamada tek restriksiyon enzimi, EcoR I, Kullandığımız için bu aşamada sorulacak soru PTENcDNA'larının pcDNA4/TO vektörüne sens mi? anti sens istikametinde mi? girdiğidir. Dolayısı ile ifadesinin sağlanabilmesi için sens istikametinde (yani 5'→ 3' yönünde) klonlamanın gerçekleşmesinin şart olması sebebi ile bizim bu klonlarımızın PTENcDNA'larını sens oryantasyonunda mı? Yoksa anti sens oryantasyonunda mı? İhtiva ettiğini anlamamız gerekmektedir. Klonlama oryantasyonunu anlayabilmemiz için klonlamada kullandığımız restriksiyon enzimini kullanamayız. Bunun için klonlama bölgesi dışında hem PTENcDNA hem de pcDNA4/TO vektör sekansı içerisinde sadece 1 kesim bölgesi olan bir restriksiyon enzimi bulmamız gerekmektedir. Dolayısı ile bu bulacağımız yeni enzim ile kesim yaptığımızda sens ve anti sens klonlamada restriksiyon enzim fragmentlerinin uzunlukları farklı olacağından klonlama oryantasyonunu belirleyebileceğiz.

Bu sebeple PTENcDNA ve pcDNA4/TO vektör sekansları "Genetyx" programında restriksiyon enzim kesim bölgeleri açısından analiz edilerek programdan bu sekansları sadece bir bölgeden kesen restriksiyon enzimi sorgulanmıştır. Analizlerimiz sonucu Scal enziminin PTENcDNA ve pcDNA4/TO vektörünü birer bölgeden kestiği saptanmış ve oryantasyon saptamada bu enzimin kullanılması kararlaştırılmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3. 10 PTENcDNA ve pcDNA4/TO vektörü üzerinde Scal kesim Bölgeleri

Bu stratejiye göre PTEN cDNA sens (5'→ 3') istikametinde vektöre klonlanmış ise Scal enzimi kesimi sonucu oluşacak iki DNA fragmentinin uzunluğu:

$$4636+(1210-950)=\mathbf{4886}$$

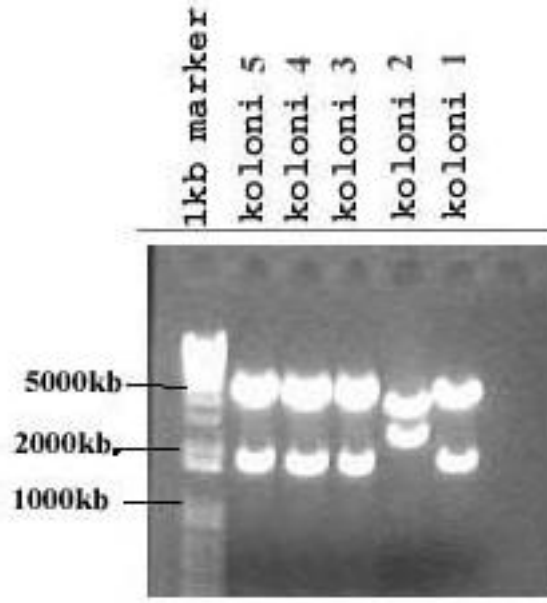
$$(6662-4636)+950=\mathbf{5002}$$

olması beklenirken, anti sens yönünde klonlama gerçekleşmiş ise bu sefer Scal enzimi kesim sonucu oluşacak fragmentlerin uzunlukları;

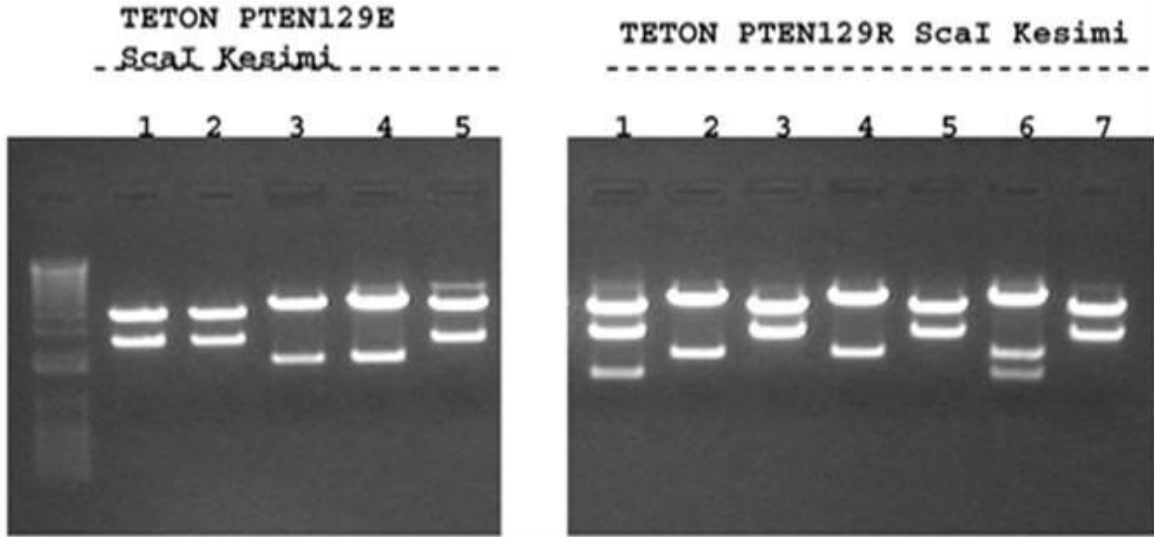
$$4636+950= \mathbf{5586}$$

$$(6662-4636)+(1210-950)=\mathbf{2286}$$
 olması beklenmektedir.

Dolayısı ile pcDNA4/TO-PTENwt için 1-5 nolu kolonilerden, pcDNA4/TO-PTENG129E için 1-5 nolu kolonilerden, pcDNA4/TO-PTENG129R için ise 1-7 nolu kolonilerden izole edilen plazmitler bu sefer Scal restriksiyon enzimi ile kesilerek agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuş ve oluşan DNA fragmentleri analiz edilerek sens oryantasyonda klonlamanın olduğu koloniler PTENwt,R ve E mutantları için belirlenmeye çalışılmıştır. Bu deney sonuçlarına göre, pcDNA4/TO-PTENwt klonlaması için sadece 2 numaralı kolonide klonlamanın sens istikametinde olduğu saptanırken (Şekil 3.11), pcDNA4/TO-PTENG129E için 1, 2 ve 5 nolu kolonilerde, pcDNA4/TO-PTENR için ise 3, 5 ve 7 nolu kolonilerde klonlamanın sens istikamette gerçekleştiği saptanmıştır (Şekil 3.12). Dolayısı ile bundan sonra yapacağımız PC14 hücrelerine gen transfeksiyonu deneylerinde bu klonlardan izole ettiğimiz plazmitler kullanılmıştır.



Şekil 3. 11 pcDNA4/TO-PTENwt ScaI kesimi agaroz jel görüntüsü

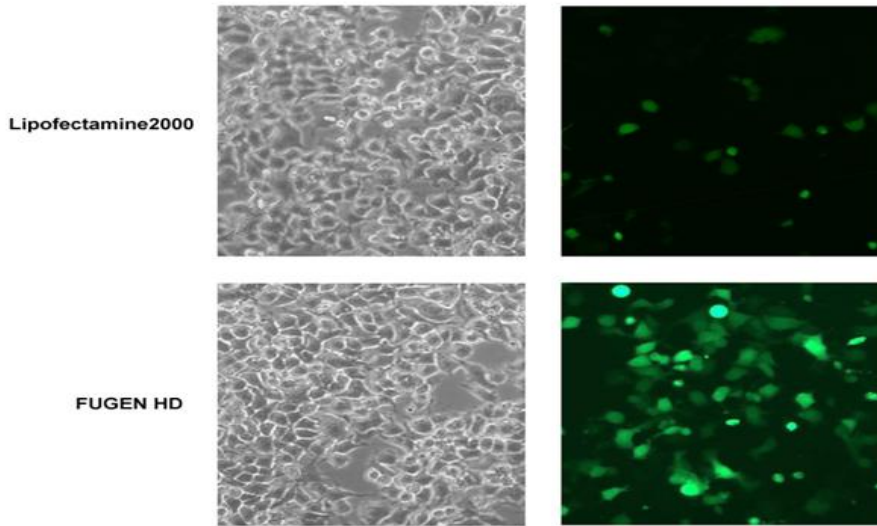


Şekil 3. 12 pcDNA4/TO-PTENE vepcDNA4/TO-PTENR ScaI kesimi agaroz jel görüntüsü

Böylece, projemizde kullandığımız PTEN wt, PTEN129R ve PTEN129E mutant cDNAlarını taşıyan ifade vektörleri, hiç PTEN ifade etmeyen PC14 hücrelerine kalıcı transfeksiyon yoluyla aktarılmak için hazır hale getirilmişlerdir.

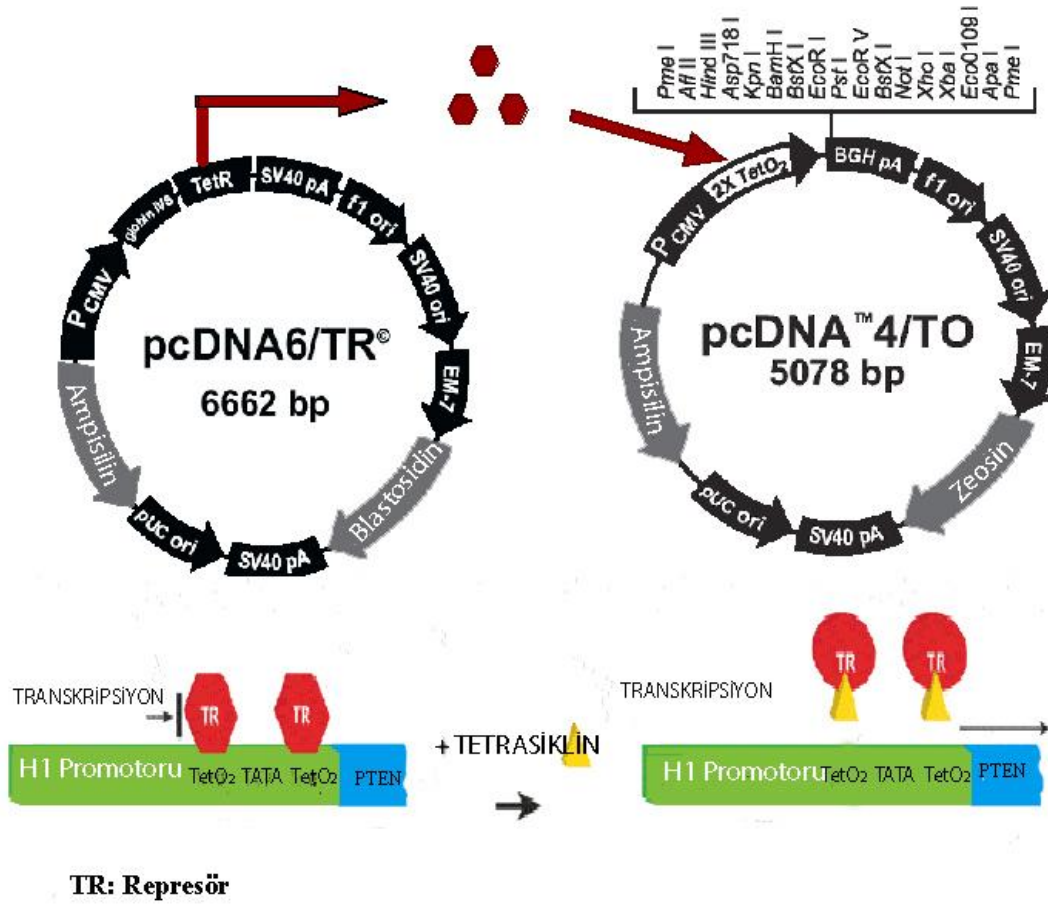
3.3 Kalıcı Transfeksiyon Yoluyla PTENwt, PTEN G129R ve PTEN G129E Genlerinin PC14 Hücrelerine Transfeksiyonu ve Transfekte Hücrelerin Seçilimi

Kalıcı transfeksiyon yönteminde hangi ajanın kullanılacağını test etmek için PC14 hücrelerine ilk önce GFP (yeşil floresans protein) vektörü, en sık kullanılan transfeksiyon ajanları olan Fugen HD ve Lipofectamine2000 ile transfekte edildi. Transfeksiyonun 24 saat ardından, transfekte hücrelerdeki GFP ifadesi floresans mikroskobu altında gözlenerek PC14 hücrelerinde hangi transfeksiyon ajanının daha etkili olduğu kararlaştırılmaya çalışıldı.



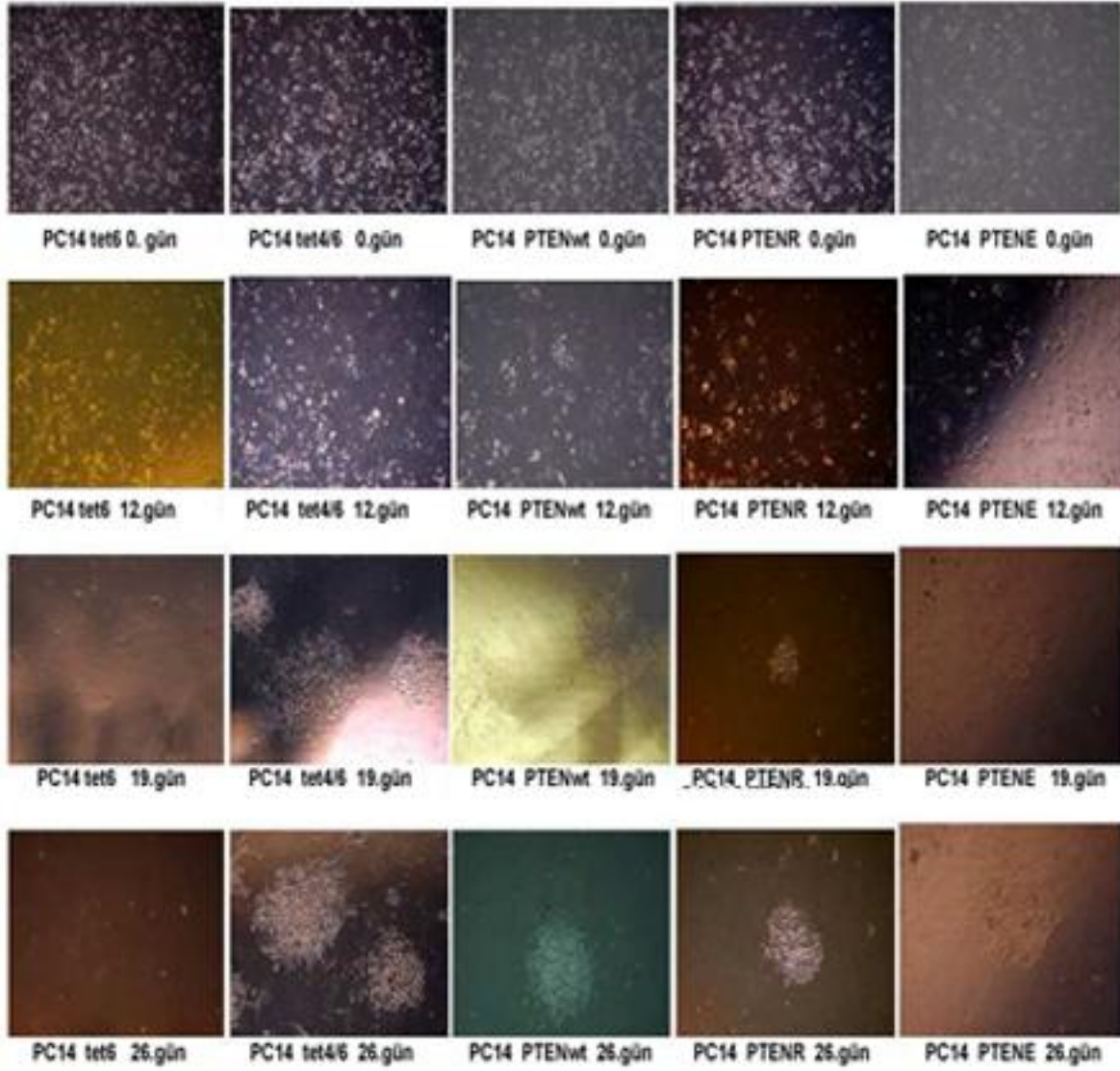
Şekil 3. 13 Transfeksiyonun 24 saat ardından PC14 Hücrelerindeki GFP ifadesi.

Şekil 3.13'de görüldüğü gibi FUGEN HD PC14 hücreleri için daha uygun bir transfeksiyon ajanıdır, dolayısı ile bundan sonraki transfeksiyon deneylerinde FUGEN HD kullanılmıştır. Projemiz kapsamında tetrasiklinle indüklenebilen TETON vektör sistemlerini kullanacağımızı daha önce belirtmiştik. TETON vektör sistemi pcDNA4 ve pcDNA6 vektörlerinden oluşmaktadır (Şekil 3.14).



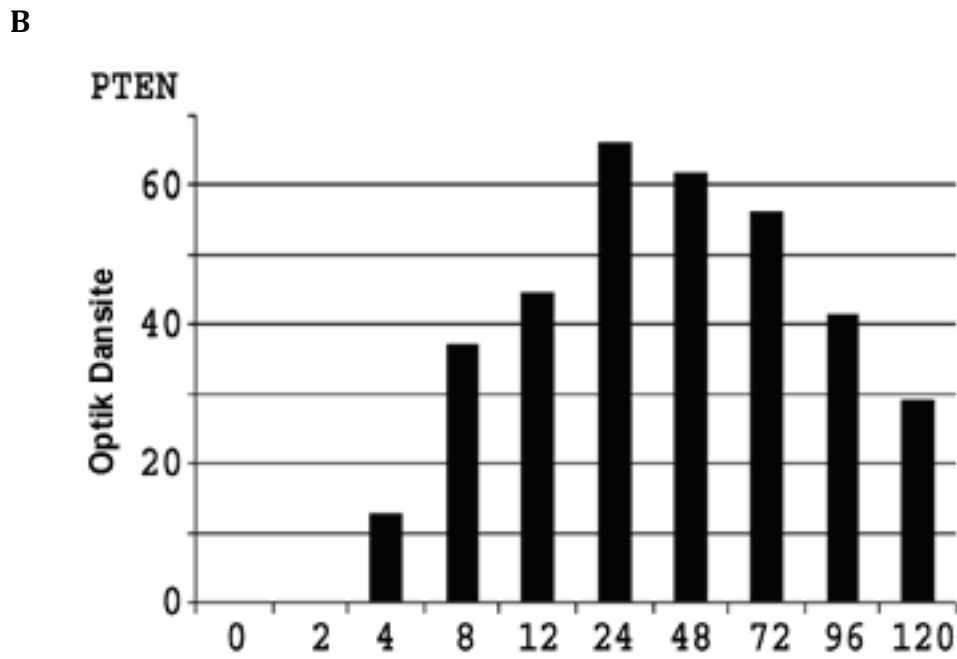
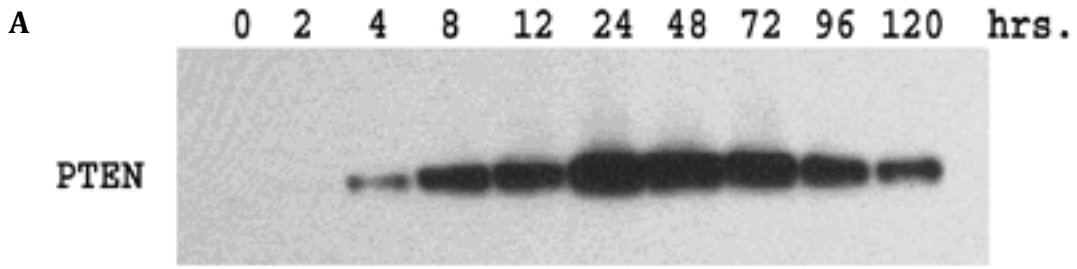
Şekil 3. 14 TETON vektör sisteminin çalışma mekanizması

TETON vektör sisteminin çalışması için hücrelerin ilk önce devamlı repressör üretimi gerçekleştirip pcDNA4 de klonlanmış olan genin ifadesini engelleyen pcDNA6 ile transfeksiyonları gerekmektedir. Ardından pcDNA6 transfekte edilen hücelere klonlanmış gen ihtiva eden pcDNA4 transfekte edilmelidir. Dolayısı ile PC14 hücreleri ilk önce pcDNA 6 ile transfekte edildiler ve Blastosidin (100mikrog/ml) seçildiler. Blastoside dirençli dolayısı ile pcDNA6 içeren PC14 hücrelerinin seleksiyonu 3 hafta sürdü. Ardından, Dr. Akça tarafından hazırlanmış olan pcDNA4-PTENwt, pcDNA4-PTENG129R ve pcDNA4-PTENG129E ifade vektörleri bu seçilen hücelere FUGEN HD ile transfekte edildi ve transfektantlar blastosidin (100mikrog/ml) + zeosin (10 mikrog/ml) ile 26 gün boyunca seçildiler (Şekil 3.15).



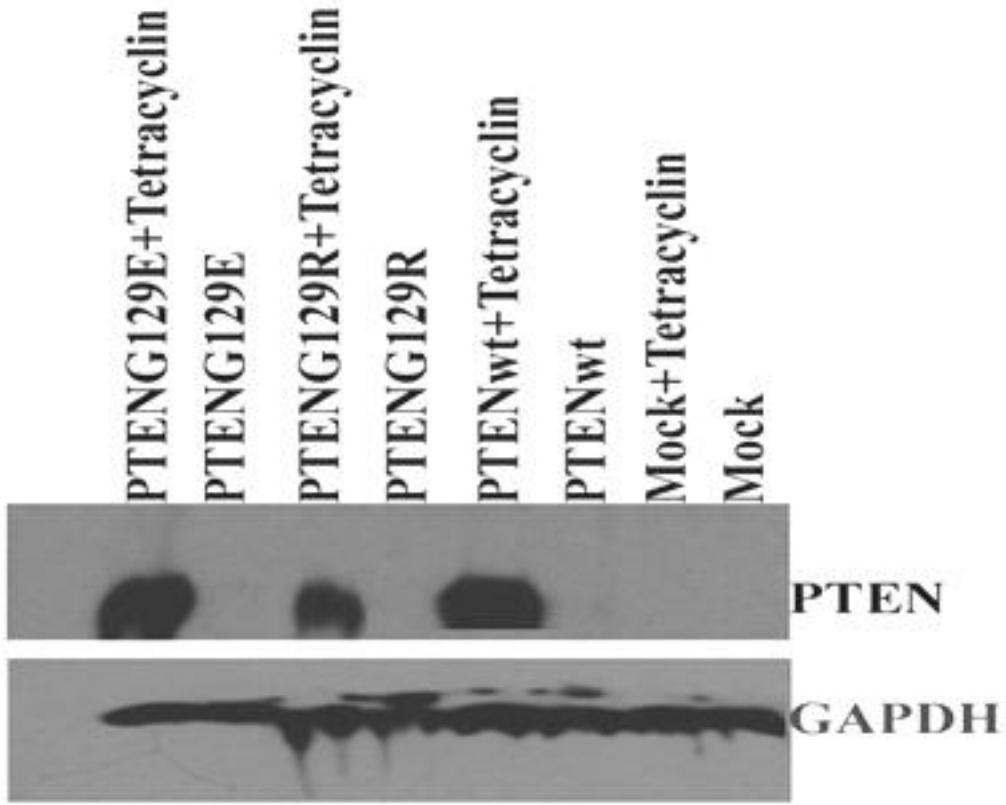
Şekil 3. 15 Transfeksiyonun ardından hücrelerin seçilimi

26 gün sonunda koloniler tripsine edilerek dağıtılmış ve PC14-tet4/6(boşvektör, mock), PC14-PTENwt, PC14-PTENG129R ve PC14-PTENG129E olarak isimlendirilmişlerdir. Transfekte PC14 hücrelerinde PTEN ifadesinin tetrasiklin ile sağlanıp sağlanamayacağını dolayısı ile TETON vektör sisteminin çalışıp çalışmayacağını test etmek için, PTENwt transfekte edilen hücrelerde besi ortamına 2 mikrogram/ml tetrasiklin ilavesinden sonra PTEN ifadesinin ne zaman başladığı ve ne kadar sürdüğü western blot yöntemi ile 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde araştırılmıştır.



Şekil 3. 16 TETON sisteminin 2 mikrogram/ml tetrasiklin ilavesinin ardından çalışarak PTENwt ifadesinin gerçekleşmesi A) Tetrasiklin ilavesinden sonra PTEN ifadesinin western blot yöntemiyle saptanması B) Western blot bantlama densitometrik analiz sonuçları

Şekil 3.16' da görüldüğü üzere tetrasiklin ilavesinin ardından PTEN ifadesi 4. saatte başlamakta, 24. saatte maksimum seviyesine çıkarak 120. saatin sonunda bile devam etmektedir. Bu sonucun ardından boş vektör, PTEN wt, PTENG129R ve PTENG129E trasfekte edilen hücrelerdeki PTEN ifadeleri de western blot yöntemi ile araştırılmıştır.

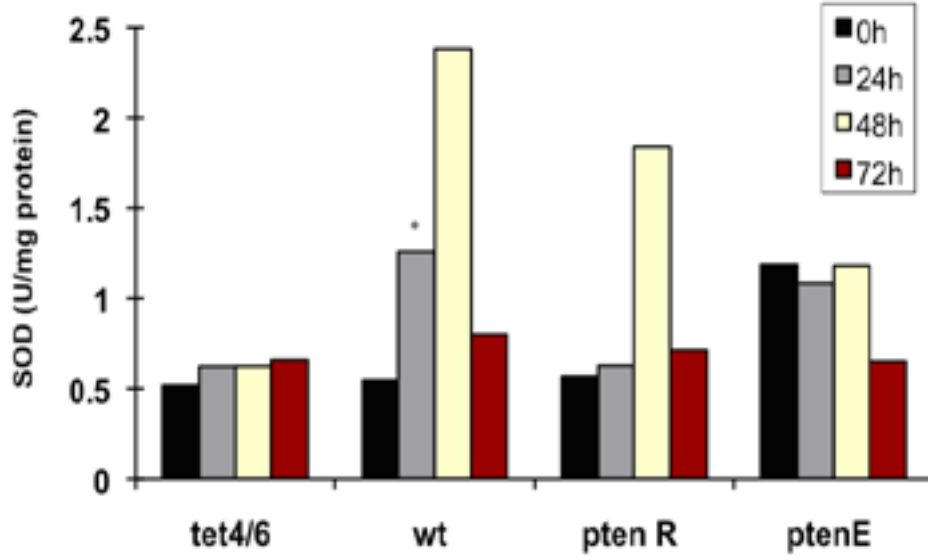


Şekil 3. 17 Mock (pcDNA4+pcDNA6), PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E transfekte edilen hücrelerde PTEN ifadelerinin tetrasiklin ile gerçekleştirilmesi

Şekil 3.17' de normalde PTEN ifade etmeyen PC14 hücrelerinde PTEN transfeksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ve PTEN ifadesinin sadece tetrasiklin ilavesi ile 24. saatin sonunda gerçekleştiği açıkça görülmektedir. Bu sonuçlar bize hem PTENwt ve mutantlarının transfeksiyonunu başarı ile gerçekleştirdiğimizi hem de TETON vektör sisteminin başarılı bir şekilde çalıştığını göstermektedir. Bu sonuçlar ardından bu transfekte hücrelerdeki SOD, GPx, Katalaz aktiviteleri hem enzim aktivitesi hem de RNA ifadesi yönleri ile tetrasiklin araştırılmıştır.

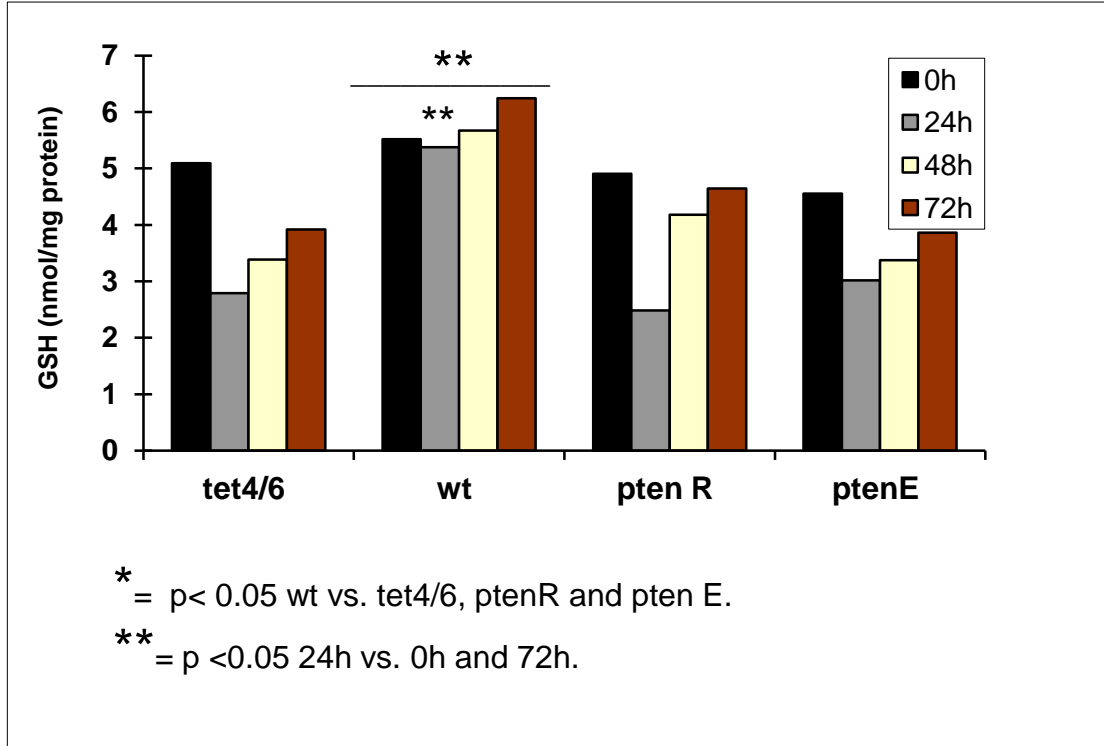
Antioksidant enzimler SOD, GPx ve Katalaz aktivitelerinin boş vektör, PTENwt, PTENR ve PTENE transfekte edilen hücrelerdeki ve mRNA ifadeleri aşağıda görülmektedir.

3.4 PTEN İfadesinin SOD, GPx ve Katalaz Aktivitesi Üzerine Etkisi



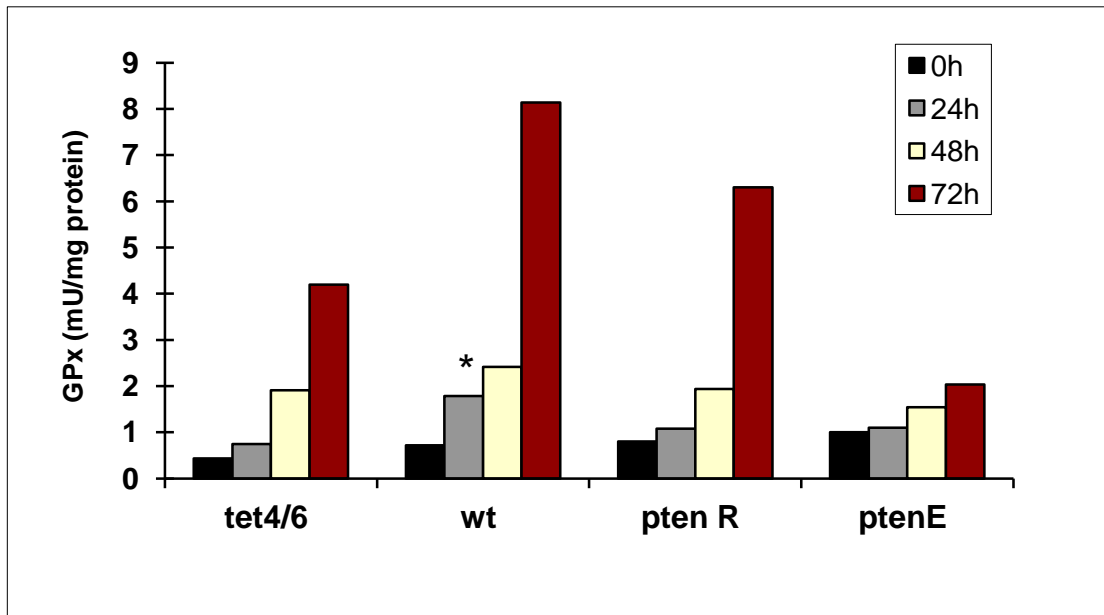
Şekil 3. 18 PTENwt ve mutantlarının ifadelerinin SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi

Boş vektör (tet4/6) transfeksiyonu SOD enzim aktivitesini 0. saate göre değiştirmezken, PTENwt transfeksiyonu 24 ve 48. saatlerde aktivite artışına neden olmuştur. PTENG129R transfekte hücrelerde SOD enzim aktivitesi sadece 48. saate neden olmuştur. PTENG129E transfekte hücrelerde ise SOD enzim aktivitesi 0. saatle karşılaştırıldığında artmamış hatta 72 saatte düşmüştür (Şekil 3.18).



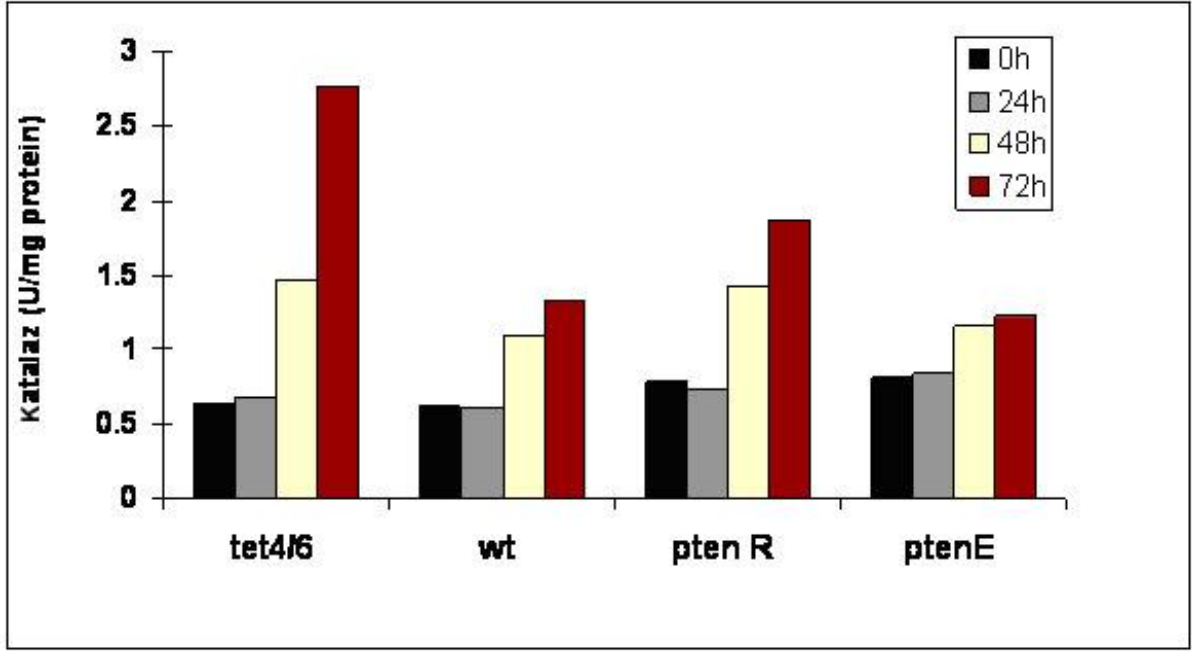
Şekil 3. 19 GSH üzerine boşvektör, PTEN wt, PTENG129E ve PTENG129R ifadelerinin etkisi, p<0.05.

PTEN ifadesinin GSH üzerinde spesifik bir etkisi saptanamamıştır.



Şekil 3. 20 GPX enzim aktivitesi üzerine boşvektör, PTEN wt, PTENG129E ve PTENG129R ifadelerinin etkisi, p<0.005.

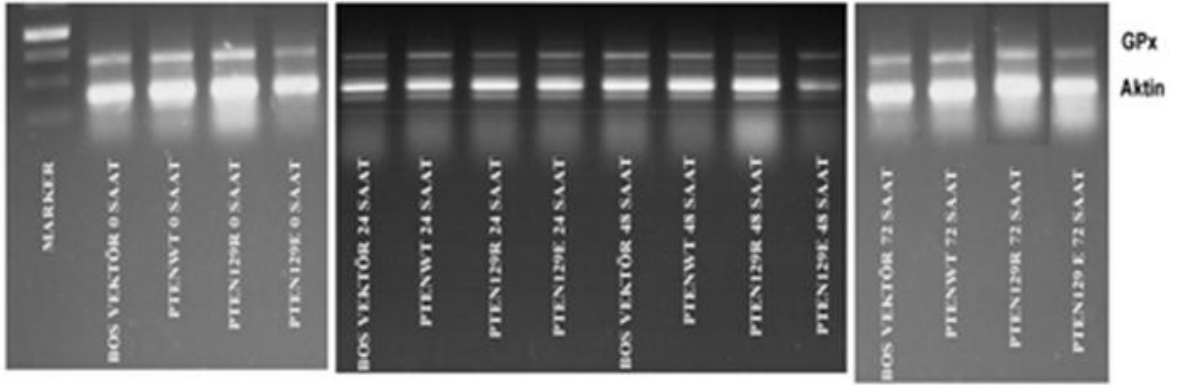
Boşvektör, PTENwt, PTENG129R, PTENG129E transfeksiyonu GPx aktivitesini 0, 24, 48 ve 72. saatlerde tüm transfektant gruplarda paralel olarak artığı saptansa da, bu artış PTENwt transfekte hücrelerde diğer gruplara nazaran daha yüksektir (Şekil 3.20).



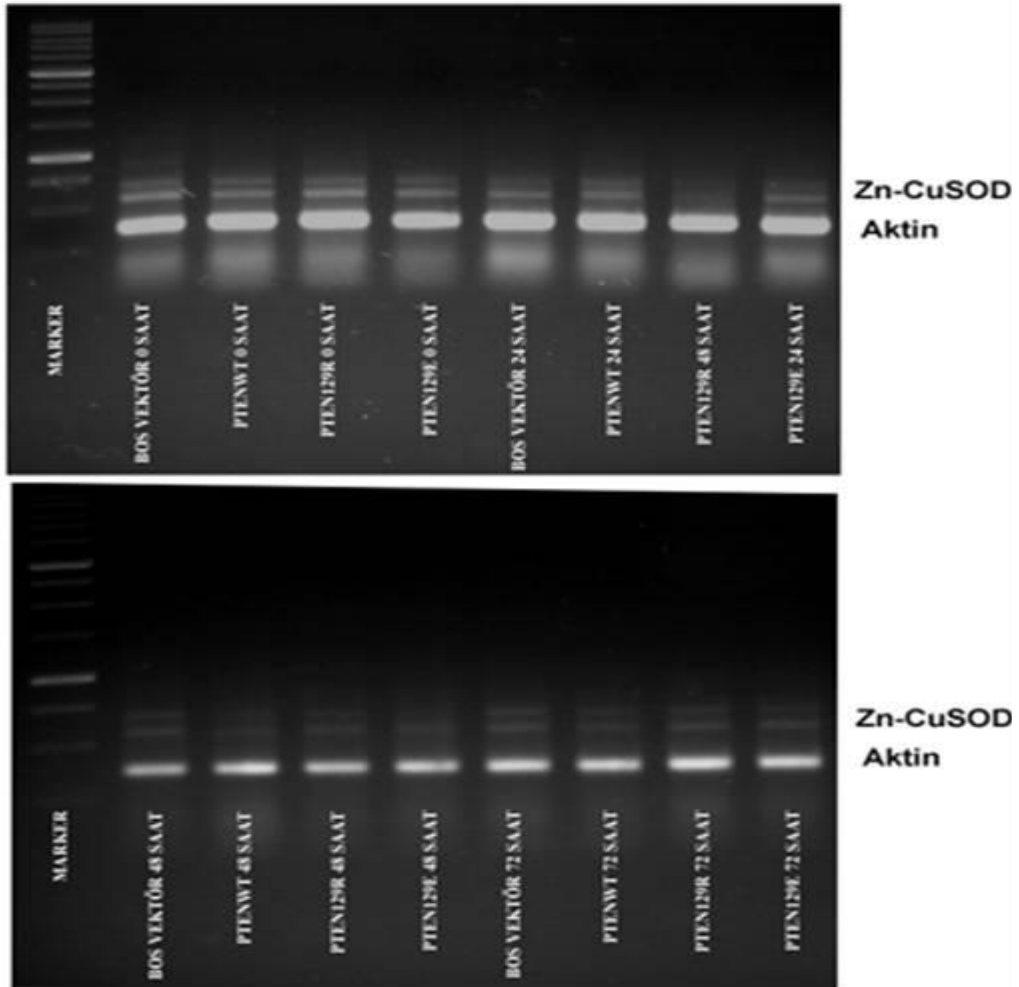
Şekil 3. 21 PTENwt ve mutant ifadelerinin Katalaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Katalaz aktivitesi boş vektör transfekte edilenler hücrelerde en yüksek saptanmıştır. PTENwt transfeksiyonu 48 ve 72. saatlerde katalaz aktivite artışına neden olmuş, PTENE transfekte edilen hücrelerde katalaz aktivitesi hemen hemen PTENwt transfekte edilen hücrelerdeki seviyede iken, PTENR transfeksiyonu katalaz aktivitesini PTENwt ve PTENE hücrelerine nazaran arttırmıştır (Şekil 3.21). Enzim aktivitelerinden SOD ve GPx enzim aktiviteleri ile GSH üzerine PTEN wt ifade etkisinin 24. Saatlerde PTEN mutant ve boşvektör ifadelerinden farklı olduğu belirlenmiştir($p<0.05$). Fakat PTENwt ifadesinin katalaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisi istatistiksel olarak diğer gruplardan farklı bulunmamıştır.

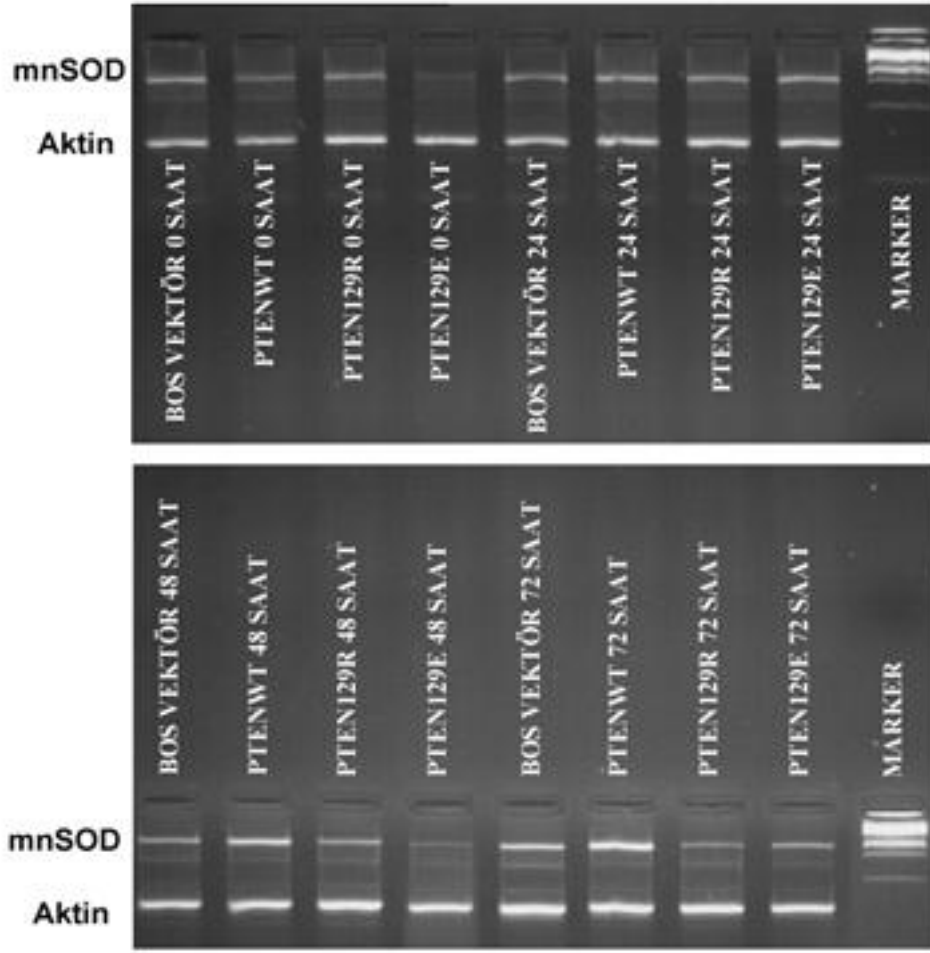
Enzim aktivitelerinin üzerine PTEN wt ve mutantlarının etkileri araştırıldıktan sonra bu enzimlerin mRNA ifadelerinin PTENwt ve mutant transfeksiyonundan etkilenip etkilenmediği de semiRT-PCR tekniği ile 0, 24, 48 ve 72. saatlerde araştırılmıştır (Şekil3.22, 3.23 ve 3.24).



Şekil 3.22 PTENwt ve Mutantlarının GPx mRNA ifadesi üzerindeki etkileri



Şekil 3.23 PTENwt ve Mutantlarının Zn-CuSOD mRNA ifadesi üzerindeki etkileri



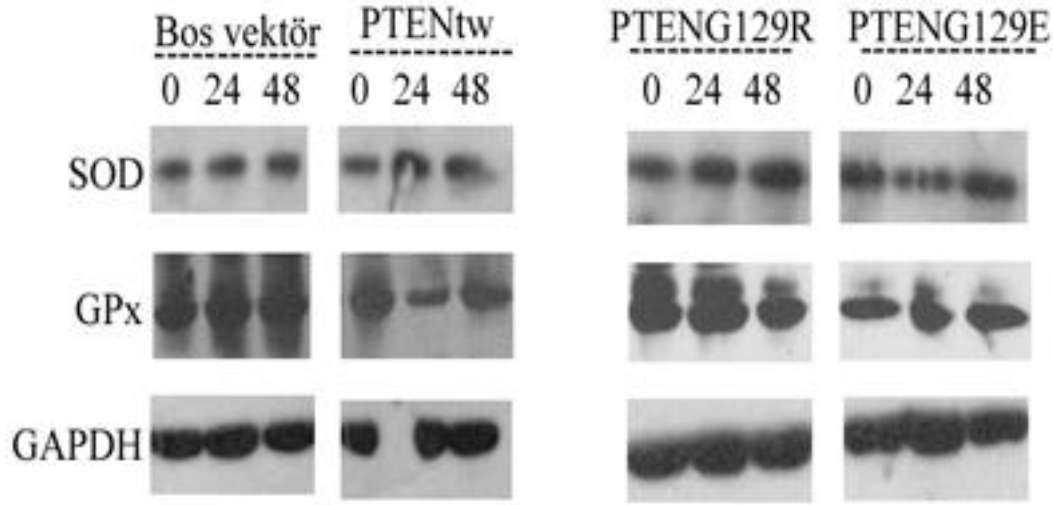
Şekil 3. 24 PTENwt ve Mutantlarının MnSOD mRNA ifadesi üzerindeki etkileri

SemiRT-PCR sonuçları mnSOD mRNA ifadesi hariç maalesef enzim aktivite sonuçlarımızı desteklememektedir. Bunun sebebi enzim aktivitelerindeki farklılıkların birbirine yakın olması ve dolayısı ile semi RT-PCR tekniğinin bu farkı yakalayacak hassasiyette olmamasından kaynaklanıyor olabilir.

3.5 SOD, GPx ve Katalaz Enzim ifadelerinin Western Blot Yöntemi İle Belirlenmesi

Westen blot sonuçlarımıza göre SOD ifadesini PTEN wt zamana bağlı olarak artırırken PTENG129R ve PTENG129E ifadelerinin SOD enzim ifadesi üzerine etkisi saptanamamıştır (Şekil 3.25). Bu western blot sonuçlarımız RT-PCR sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Aynı şekilde PTEN wt ve mutantlarının ifadelerinin GPx ifadesine bir etkisinin olmadığı da görülmektedir (Şekil 3.25). Bu sonuçlarımız RT-

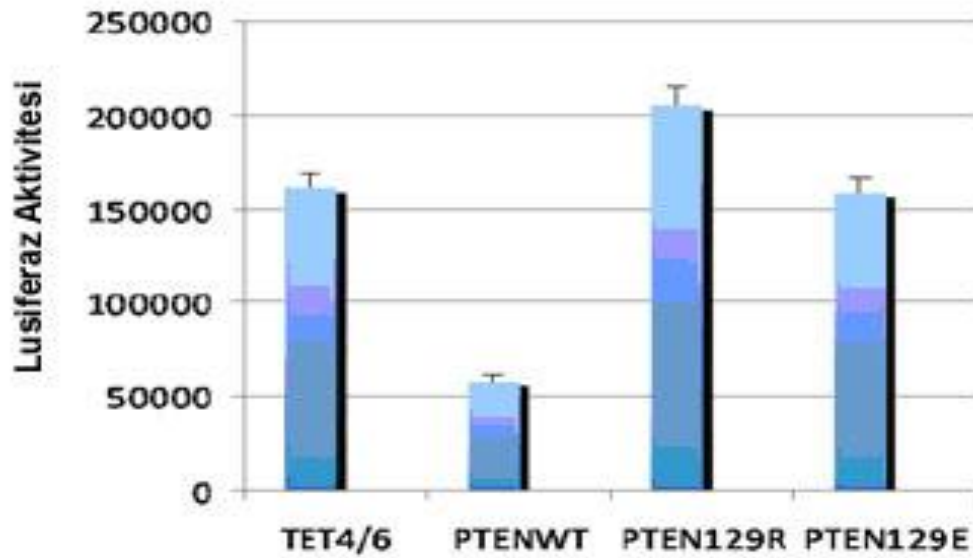
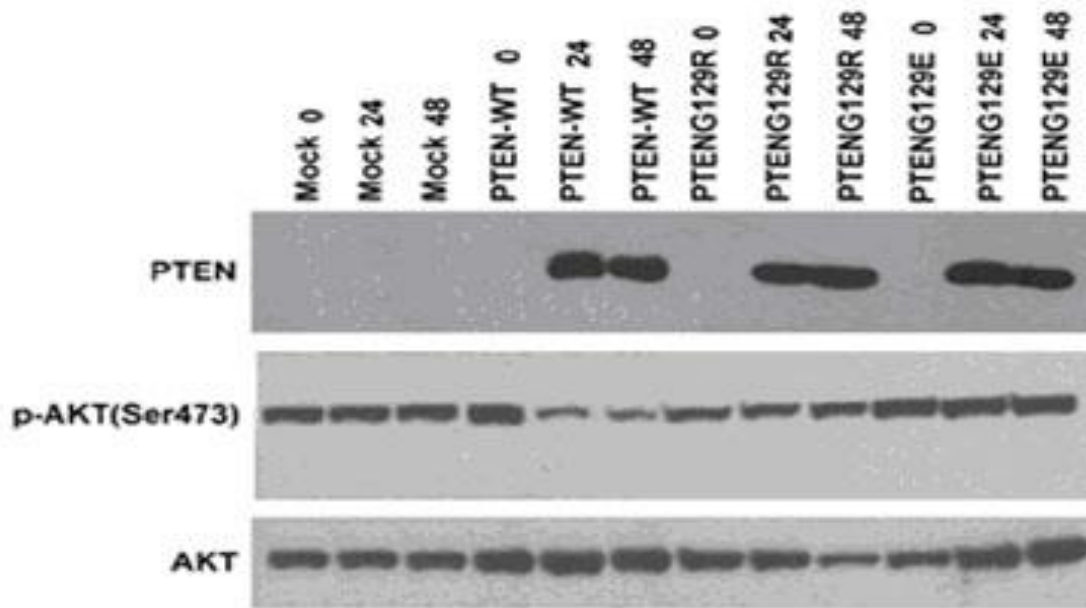
PCR sonuçları ile örtüşmektedir. Maalesef 3 bağımsız denememize rağmen bu hücrelerde katalaz enzim ifadesi western blot yöntemi ile saptanamamıştır.



Şekil 3. 25 SOD, GPx ifadesi üzerine PTEN ifadelerinin etkisi.

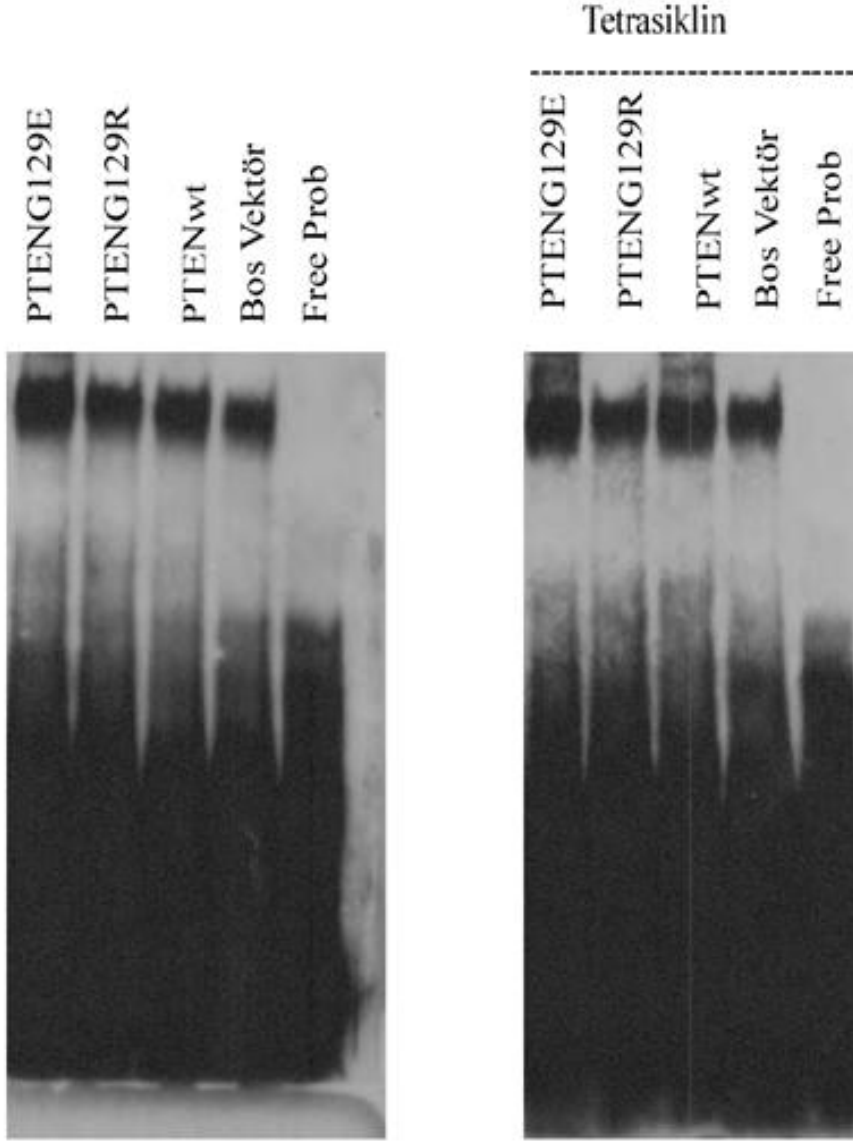
3.6 Yeniden Yaratılan PTEN İfadesinin AKT/Nfkb Yolağı Üzerindeki Etkisi

Boş vektör, PTEN wt, PTENG129R ve PTENG129E ifade eden PC14 hücrelerinde yeniden yaratılan PTEN ifadelerinin AKT aktivasyonuna etkileri western blot yöntemi ile araştırılmıştır. Buna göre sadece wt PTEN AKT aktivasyonunu engellerken Lipid fosfataz dead PTEN (PTENG129E) ve katalitil olarak inaktif PTEN (PTENG129R) AKT aktivitesine etki etmemesi PTEN'in AKT aktivitesini lipid fosfataz özelliği ile engellediğini açıkça göstermektedir (şekil 3.26), dolayısı ile PTEN AKT aktivasyonunu PI3K aktivitesini engelleyerek inhibe etmektedir. Bu verinin ardından PTEN 'in NFkB aktivitesine olan etkiside gen reporter yontemi ile araştırılmıştır. Şekil 3.26' da görüldüğü gibi PTEN wt NFkB aktivitesini baskılarken PTENG128R ve PTENG129E NFkB aktivitesi üzerine herhangi bir etki göstermemektedir. Bu sonuç bize PTEN'in PI3k/AKT/NFkB yolağını kendi lipid fosfataz aktivitesi ile baskıladığını açıkça göstermektedir (Şekil 3.26).



Şekil 3.26 Boş vektör, PTENwt, PTENG129E ve PTENG129R ifadelerinin PI3K/AKT/NFκB yolağı üzerindeki etkisi

PTEN ifadesinin NFkB aktivitesi üzerine etkisinin Gen reporter yöntemi ile belirlenmesinin ardından. Proje teklifimiz sırasında ifade ettiğimiz üzere PTEN ifadesinin NFkB aktivitesi üzerine etkisinin saptanmasını bir diğer metod olan non radyo aktif EMSA metodu ile de gerçekleştirdik. Bu amaçla, boşvektör, PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E kalıcı transfekte edilmiş olan PC14 hücreleri PTEN ifadesinin sağlanması için 2 mikrogram tetrasiklin ile 24 saat muamele edilmişler ve ardından bu hücreler materyal ve metod bölümünde anlatıldığı gibi önce lizis edilmişler ardından bu lizatlar biyotin işaretlenmiş double strand NFkB probu 5'-GTTGAGGGACTTTCCCAGG-3' ile 1 X Tris-EDTA, 1 mM KCl, %10 gliserol, 1 mM dithiothreitol, ve 1 mg/ml polydeoksisitozin-deoksinozin içeren çözelti içerisinde 30 dakika oda sıcaklığında reaksiyona bırakılmışlardır. Ardından örnekler %5 poliakrilamid jel'e yüklenerek elektroforez yapılmış ve Elektroforez işleminin bitiminde jel naylon membrana blotlanmış ve DNA'nın membrana fiksasyonu için membran 15 dakıda UV ışığı altında fixe edilmiştir. Ardından, oluşan DNA-protein kompleksi radyoaktif olmayan EMSA detektion kit (PIERCE) kullanılarak tespit edilmiştir (şekil 3.27).

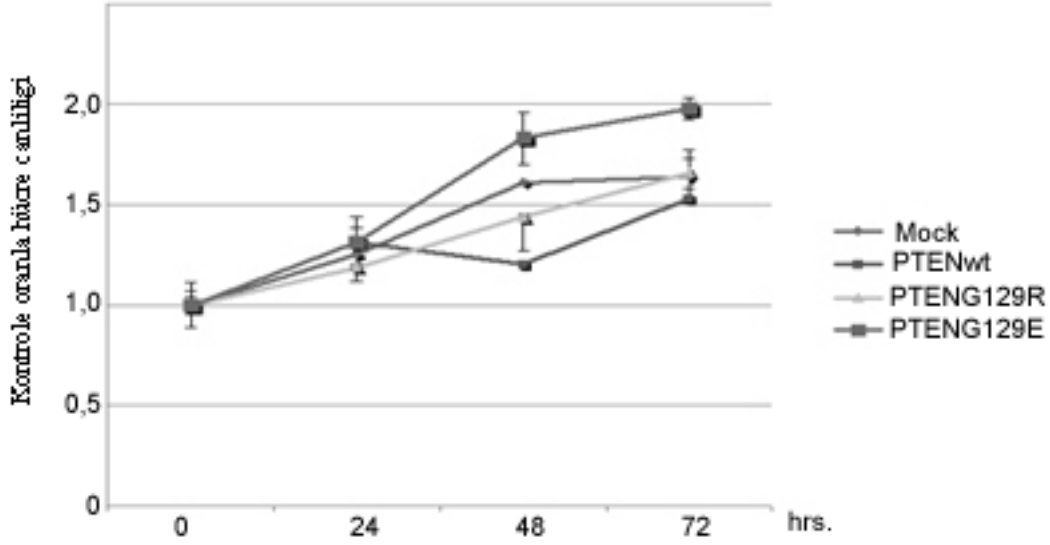


Şekil 3. 27 NFkB aktivitesine PTEN ifadelerinin etkisinin EMSA yöntemi ile belirlenmesi.

Şekil 3.27’de PTEN wt in NFkB’nin DNaya bağlanma afinitesini çok fazla değiştirmedeği görülmektedir, free prob (probsuz örnek) sütününde bant olmaması deneyimizin güvenilirliğini ve saptadığımız bandın NFkB + DNA probu bantı olduğunu bize göstermektedir. Gen reporter yöntemi ile lusiferaz metodu ile saptadığımız PTENwt in NFkB aktivitesinin baskılayıcı etkisini EMSA yöntemi ile saptayamamızın gerekçesi gen reporter yönteminin EMSA metoduna göre çok daha hassas olması olabilir.

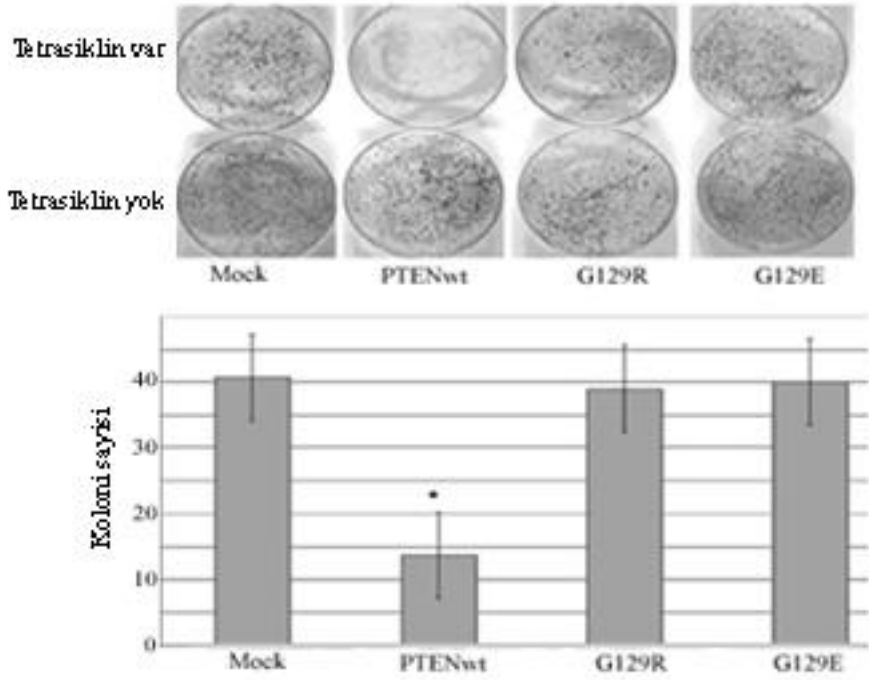
3.7 Yeniden Yaratılan PTEN İfadesinin PC14 Hücrelerinin Anchorage Bağımlı Ve Anchorage Bağımsız Çoğalmasına Etkisi

Aşağıdaki şekilde açıkça görüldüğü gibi yeniden yaratılan PTEN ifadesinin PC14 hücrelerinin anchorage bağımlı çoğalmasına anlamlı bir etkisinin olmadığı görülmektedir (Şekil 3.28).



Şekil 3. 28 Boş vektor (mock), PTENwt, PTENG129E ve PTENG129E ifadelerinin PC14 hücrelerini çoğalmasına etkisi

Bu deneyin ardından invazyon olayı için için önemli bir parametre olan anchorage bağımsız hücre çoğalması üzerine PTENwt ve mutantlarının etkisini araştırılmak için soft agar deneyi daha önce belirttiğimiz metoda uygun olarak gerçekleştirdi. Buna göre, 6 well petri kaplarına ilk önce 0.5% noble agar döküldü, bu donduktan sonra 5×10^4 hücre içeren 0.4% noble agar üst katmana döküldü. Her iki katmanda hücrelerin yaşaması için uygun besi yerini ihtiva etmekle birlikte, PTEN ifadesinin sağlanması için bir guruba (2 mikrogram/ml) tetrasiklin verildi diğer guruba verilmedi. Hücreler CO₂'li inkübatörde 37⁰C de 2-3 hafta inkübe edildikten sonra %1.5 glutaraldehit ve %0.06 methilen mavisi içeren HBSS tamponunda fikse edildiler ve görünen koloniler sayıldı (Şekil 3.29).

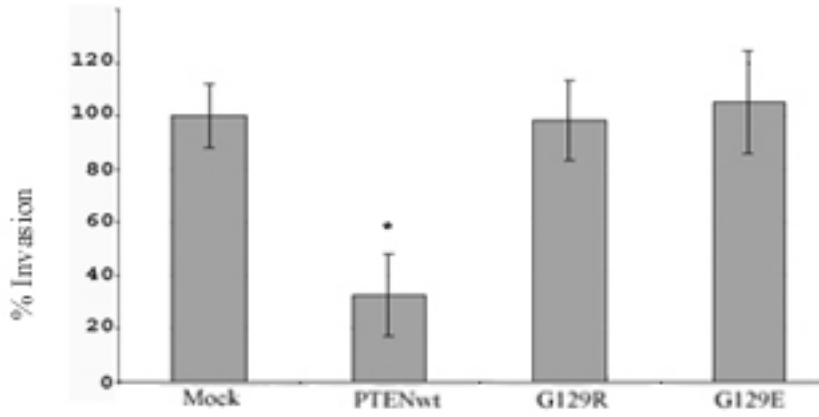


Şekil 3. 29 Boş vektor (mock), PTENwt, PTENG129E ve PTENG129E ifadelerinin PC14 hücrelerinin anchorage independent çoğalmasına etkisi.

Şekil 3.29' da PTEN ifadesinin tetrasiklinle yaratılmasının ardından sadece PTENwt soft agarda koloni oluşumunu önlerken, lipid fosfataz dead PTENG129E ve kinaz dead PTENG129R koloni oluşumuna ekti etmediği açıkça görülmektedir ($p < 0,05$). Bu sonuç bize PTEN'in anchorage independent hücre çoğalmasını lipid fosfataz etkisiyle, dolayısı ile PI3K/AKT/NFkB yolağını baskılayarak gerçekleştirdiğini göstermektedir.

Anchorage bağımlı ve bağımsız hücre çoğalmasına PTEN tümör baskılayıcı geninin etkilerini saptadıktan sonra, yeniden yaratılan PTEN ifadesinin hücre invazyonunu nasıl etkilediğini saptamak için invazyon deneyi dizayn edildi. Hücre invazyonu deneyleri için growth factor reduced trans-well matrigel invasion chamber (Becton Dickinson) kullanılmıştır. Buna göre boş vektor (mock), PTENwt, PTENG129E ve PTENG129E kalıcı transfekte edilmiş PC14 hücreleri tripsinize edilmiş ve % 0.1 BSA içeren RPMI1640 fakat serum içermeyen besi yeri içersinde 1×10^4 hücre trans-well chamberin içersine konulmuş ve hücre invazyonu için 24 saat 37°C de CO_2 inkübatörde inkübe edilmişlerdir. Transwell chamberin dışına ise %10 serum içeren RMPI1640 konularak hücrelerin invazyonu için kemoattractant ortam

sağlanmıştır. 24 saatin ardından trans-well chamber in içindeki besi yeri uzaklaştırılmış ve oda içinde kalan invaziv olmayan hücreler ucu pamuk kaplı çubuklarla kazınarak non invaziv hücreler chamberdan uzaklaştırılmıştır. Transwell chamberin dış yüzüne çıkan hücreler ise ilk önce methonolle fixe edilmiş ardından boyanarak mikroskop altında sayılmıştır. Şekil 3.30' da PTENwt ifadesinin hücre invazyonunu %72 oranında baskıladığı görülmektedir ($p<0,001$). Aynı şekilde lipid fosfataz aktivitesi olmayan PTENG129E ve kinaz dead PTENG129R ifadelerinin hücre invazyonuna etki etmemesi PTEN'in hücre invazyonunu PI3K/AKT/NFkB yoluyla üzerinden baskıladığını açıkça göstermektedir.



Şekil 3.30 Boş vektor (mock), PTENwt, PTENG129E ve PTENG129E ifadelerinin PC14 hücre invazyonuna etkileri ($p<0,001$).

4. Tartışma

Akciğer kanseri kanseri kanser nedeni ölümler içerisinde dünya genelinde ilk sırada yer almaktadır. (GRENLEE ve ark., 2001). Yapılan birçok çalışmada normal akciğer kanseri dokularında çok yüksek miktarda PTEN ifadesi saptanırken akciğer kanser hücrelerinin %29'unda çok düşük oranda PTEN ifadesi saptandığı, %44'ünde ise PTEN ifadesinin kaybolduğu rapor edilmiştir (KOHNO ve ark., 1998, SORIA ve ark., 2002, MARSIT ve ark., 2005, NORO ve ark., 2007). Küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastaların tümör örneklerinde fosforlanmış (aktif) AKT aşırı ifadesi o hastaların kötü progresyonu ile ilişkili olduğu da rapor edilmiştir (TANG ve ark., 2006). Ayrıca bizim daha önceki sonuçlarımızda AKT fosforilasyonunun PTEN ifade etmeyen akciğer hücrelerinde yüksek iken PTEN ifade eden akciğer hücrelerinde oldukça düşük olduğunu göstermektedir (AKCA ve ark., 2011) Bu sonuçlar bize PTEN ifadesinin akciğer kanseri hücrelerinde AKT fosforilasyonunun düzenlenmesinde oldukça önemli olduğunu göstermektedir. Bu verile ışığında biz, PTEN inaktivasyonunun ve onun PI3K/AKT/NFkB yolağı üzerindeki etkisinin akciğer kanser hücrelerinin invazyonunda önemli bir mekanizma olacağını düşünerek bu çalışmamızı dizayn ettik. Hipotezimizi doğrulamak için ilk önce PTEN'in wt, katalitik olarak inaktif (G129R) ve lipid fosfataz olarak inaktif (G129E) mutantlarını "Yönlendirilmiş mutasyon" ile yarattık ve ifadesi tetrasiklin ile kontrol edilebilen TETON sistem vektörüne klonladık. Bu vektör sistemini seçmedeki amacımız PTEN'in tümör baskılayıcı bir gen olması sebebi ile pcDNA3 gibi ökaryotik ifade vektörlerine klonlanarak hücrelere kalıcı transfeksiyon ile aktarılması bu hücrelerde aşırı PTEN ifadesine neden olacağından hücre ölümüne sebep verebilir ve stabil PTEN ifade eden koloni seçimi bu sebeple mümkün olamayacağıdır. Çalışmamızda TETON vektör sistemi kullanılmıştır. Dolayısı ile biz bu yöntemle kolonilerimiz seçip PTEN ifadesini tetrasiklin ekleyerek istediğimiz süre gerçekleştirebildik. Kalıcı olarak PTEN ifade eden PC14 hücreleri seçildikten sonra 0, 24 ve 48 saatlerde tetrasiklin (2 mikrogram/ml) ilave edilerek PTEN ifadesinin sağlandığı şekil 3.16'da görülmektedir. Aynı şekilde PTEN ifadesinin tetrasiklinle sağlanmasının ardından sadece PTENwt'in AKT aktivitesini baskıladığı, katalitik olarak inaktif PTENG129R ve lipid fosfataz özelliği olmayan PTEN ifadelerinin AKT aktivasyonuna etki etmediği de açıkça

görülmektedir. Bu sonuç bize PTEN'in lipid fosfataz aktivitesi ile PI3K inaktivasyonuna ve AKT aktivitesinin inhibasyonuna neden olduğu göstermektedir.

PTEN ifadesinin görülmesinin ardından ilk olarak PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E ifadelerinin hücre proliferasyonuna etkisini araştırdık ve gördük ki bu ifadelerin hücre çoğalmasına farklı etkileri yoktur. FURNARI ve ark., (1997) PTENG129R ve PTENG129E ifadelerinin glioblastoma hücrelerinin proliferasyonlarında bir değişikliğe neden olmadıklarını rapor etmişlerdir. Bizim sonuçlarımız daha önce rapor edilen bu makale ile uyumludur. PTENwt ve mutantlarının hücre proliferasyonuna etki etmediklerinin saptanmasının ardından bu ifadelerin kanser hücrelerinin anchorage bağımsız büyüme yeteneğine etkilerini araştırdık. Sonuçlarımız sadece wt PTEN ifadesinin hücrelerin anchorage bağımsız büyümesini inhibe ederken mutant PTEN ifadelerinin anchorage bağımsız büyümeye herhangi bir etkisi olmadığını açıkça göstermektedir. Katalitik olarak inaktif PTEN ve lipid fosfataz özelliği olmayan PTEN ifadelerinin anchorage bağımsız hücre büyümesine etkisi olmazken wt PTEN ifadesinin bu büyümeyi baskıladığının görülmesi bize PTEN'in anchorage bağımsız hücre büyümesini kendi lipid fosfataz aktivitesi ile inhibe ettiğini açıkça göstermektedir. Bizden önce yapılan çalışmalar PTEN wt ifadesinin anchorage bağımsız hücre çoğalmasını hepatoma hücrelerinde (NAKANISHI ve ark., 2002) meme ve melanoma (LOBO ve ark., 2009) hücrelerinde baskıladığını göstermektedir. Bu çalışmalar sonuçlarımızla uyumludur.

PTEN ifadesinin meme kanseri, glioma ve kolon kanseri hücrelerinin invazyonunu baskıladığı daha önce rapor edilmiştir (HEERING ve ark., 2009; MAIER ve ark., 1999; BOWEN ve ark., 2009). Bu nedenle, bizde bir sonraki adım olarak PTEN ifadesinin akciğer kanser hücre invazyonu baskılayıp baskılayamayacağını araştırdık. Bu amaçla PTEN ifade etmeyen PC14 hücrelerini boş vektör, PTEN wt, PTENG129R ve PTENG129E ile kalıcı olarak transfekte ettik. Sonuçlarımız PTEN wt ifadesinin PC14 hücrelerinin invazyonunu %72 oranında baskımlarken, katalitik olarak inaktif PTEN(G129R) ve lipid fosfataz özelliği olmayan PTEN (G129E) ifadelerinin invazyona herhangi bir etkilerinin olmadığını göstermektedir. PTEN 'in prostat kanseri hücre invazyonunu baskıladığı daha önce rapor edilmiştir (SHUKLA ve ark., 2007) Ayrıca PTEN glioma hücre invazyonunuda baskılamaktadır (MAIER ve ark., 1999) fakat bu iki hücredeki invazyonun baskılanma mekanizması birbirinden farklıdır.

SHUKLA ve ark., (2007) PTEN' in prostat kanseri hücre invazyonunu PI3K/AKT yolağını kendi lipid fosfataz özelliği ile baskılayarak inhibe ettiğini rapor ederlerken, MAIER ve ark., (1999) PTEN'in lipid fosfataz özelliğinin glioma hücre invazyonun baskılanmasında etkili olmadığını rapor etmişlerdir. Bizim sonuçlarımız açıkça göstermektedir ki, PTEN akciğer kanseri hücre invazyonunu lipid fosfataz aktivitesi yoluyla baskılamaktadır. Son günlerde, ZHANG ve ark., (2010) microRNA21'in akciğer kanseri hücrelerinde PTEN ifadesini baskılayarak bu hücrelerin invazyonunu arttırdığını rapor etmiş fakat akciğer kanseri invazyonunun moleküler mekanizmalarına değinmemiştir. NFkB'nin aktifleşmiş AKT'nin ana hedefi olması sebebi ile biz çalışmamızda AKT/NFkB yolağı aktivitesi ve akciğer kanseri invazyonu arasında bir ilişki olabileceğini düşündük. Bu olası ilişkiyi gösterebilmek için gen reporter assay deney düzeneğini kullandık. Bu sebeple NFkB lusiferaz reporter vektör renila luciferaz reporter vektörleri birlikte, stabil PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E ifade eden PC14 hücrelerine transfekte edildiler. Gen reporter deney sonuçlarımız sadece PTEN wt ifadesinin NFkB aktivitesinin inhibasyonuna neden olurken, mutant PTEN ifadelerinin NFkB aktivitesine etkisinin olmaması, PTEN'in NFkB aktivitesini lipid fosfataz özelliği ile baskıladığını göstermektedir. PI3K fosfoinozitolleri üçüncü inozitol halkasından fosforlayarak 3, 4, 5 trifosfat yaratır. Bu oluşum hücre iç membranında AKT aktivasyonu için gerekli bir substrattır. AKT aktifleştikten sonra hücre içinde birçok hedef molekülünü aktive eder, AKT hedeflerinden biriside NFkB dir. Biz bu çalışmamızda AKT aktivitesinin ve dolayısı ile AKT/NFkB yolağının NSCLC hücre invazyonu için çok önemli bir yolak olduğunu ve bu yolağın tümör baskılayıcı gen PTEN tarafından inhibasyonunun NSCLC hücre invazyonunu baskıladığını göstermekteyiz.

Çalışmamızın bir diğer yönü ise PTEN tarafından baskılanan PI3K/AKT/NFkB yolağının anti oksidant enzim aktivitesi ve ifadeleri üzerine etkilerininide araştırması idi. Dolayısı ile PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E stabil transfekte edilmiş PC14 hücrelerinde SOD, GPx, GSH ve Katalaz aktiviteleri ölçüldü. PTEN wt ifade eden hücrelerde boş vektör, G129R ve G129E ifade edenlere göre SOD ve GPx aktivitesinin daha fazla olduğu GSH ve Katalaz aktivitelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu sonuç PI3K/AKT/NFkB yolağının SOD ve GPx aktivitesini baskıladığını ve bu yolağın PTEN tarafından baskılanmasının

SOD ve GPx aktivitesinde artışa neden olduğunu göstermektedir. CHEN ve ark., (2007) Cox-1 ifadesinin artışı ile NFkB arasında ilişki olabileceğini rapor etmişlerdir. Ayrıca SHARMA ve ark., (2006) antioksidant enzimlerin AKT aktivitesini düzenlemede rol alabileceklerini belirtmişlerdir. Literatürde bir kaç çalışma antioksidant enzimlerin AKT kinaz ile ilişkisi olabileceğine değinsede (LI ve ark., 2006, GIELS ve ark., 2006), bu güne kadar antioksidant enzim aktivitelerinin PTEN tarafından düzenlendiğini rapor eden bir çalışma bulunmamaktadır. Biz bu çalışmamızda anti oksidant enzimler SOD ve GPx aktivitelerinin tümör supresör gen PTEN tarafından PI3K/Akt/ NFkB yolağının baskılanması mekanizması ile arttırıldığını da göstermekteyiz.

Kaynaklar

- AHN KS., Sethi G., Jain AK., Jaiswal AK., Aggarwal BB. Genetic deletion of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 abrogates activation of nuclear factor-kappaB, I kappa B alpha kinase, c-Jun N-terminal kinase, Akt, p38, and p44/42 mitogen-activated protein kinases and potentiates apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 281(29),19798-808, (2006).
- AKCA H., Demiray A., Tokgun O., Yokota J., Invasiveness and anchorage independent growth ability augmented by PTEN inactivation through the PI3K/AKT/NFkB pathway in lung cancer cells. *Lung Cancer*, 73, 302-309, (2011).
- ARBISER JL., et al. Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99, 715–720, (2002).
- ARNOLD RS., et al. Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 5550–5555, (2001).
- ASLAN M., Freeman BA. Oxidases and oxygenases in the regulation of vascular nitric oxide signaling and inflammatory responses. *Immunologic Research*, 26,107-118, (2002).
- ASLAN M., Özben T. Oxidants in receptor tyrosine kinase signal transduction pathways. *Antioxid Redox. Signal*, 5, 781-788, (2003).
- ASLAN M., Thornley-Brown D., Freeman BA. Reactive species in sickle cell disease. *Ann. N. Y Acad. Sci.*, 899, 375-391, (2000).
- BELKHIRI A., Richards C., Whaley M., McQueen SA., Orr FW. Increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 by human endothelial cells after sublethal H₂O₂ exposure. *Lab. Invest.*, 77, 533–9, (1997).
- BHAT NR., Zhang P., Lee JC., Hogan EL. Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor alpha gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J Neurosci.*, 18, 1633–41, (1998).
- BIANCO R., Incheol S., Ritter CA., Yakes MF. and et al. Loss of PTEN/MMAC1/TEP I in EGF receptor expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*, 22, 2812-2822, (2003).
- BOWEN KA., Doan HQ., Zhou BP., Wang Q., Zhou Y., Rychahou PG., et al. PTEN loss induces epithelial–mesenchymal transition in human colon cancer cells. *Anticancer Res.*, 11, 4439–49, (2009).

- BUNN PA., Kato H. current perspectives in the treatment of non-small cell lung cancer. *Semin. Oncol.*, 28, 1-2, (2001).
- BUTTITTA F., Flecioni L., Borassi F., et al. PIK3CA mutation and histological type in breast carcinoma: high frequency of mutations in lobular carcinoma. *J. Pathology*, 208, 350-55, (2006).
- CHAMBERS AF., Tuck AB. Ras-responsive genes and tumor metastasis. *Crit. Rev. Oncog.*, 4, 95-114, (1993).
- CHEN KH. et al. Targeting suppresses K-1 beta-induced cyclooxygenase (cox)-2 expression through inhibition of p38 MAPK, JNK and Akt activation in human lung cancer cells. *Biochem Pharmacol.*, 15, 73(2), 215-27, (2007).
- CHOMCZYNSKI P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*, 162(1), 156-9, (1987).
- CRUZ MT., Duarte CB., Goncalo M., Carvalho AP., Lopes MC. Involvement of JAK2 and MAPK on type II nitric oxide synthase expression in skin-derived dendritic cells. *Am. J. Physiol.*, 277, 1050-7, (1999).
- DI CRISTOFANO A., Pesce B., Cordon Cardo C., and Pandolfi P. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat. Genet.* 19, 348-355, (1998).
- ENGERS R., Gabbert HE. Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.*, 126, 682-92, (2000).
- FEARON ER., Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-767, (1990).
- FURNARI FB., Lin H., Huang HS., Cavenee WK. Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 94, 12479-84, (1997).
- GIELS GL. The redox regulation of thiol dependent signaling pathways in cancer. *Curr. Pharm.*, 12(34), 4427-43, (2006).
- GARCIA-ROSTAN G., Costa AM., Pereira-Castro I., et al. Mutation of the PIK3CA Gene in Anaplastic Thyroid Cancer. *Cancer Res.*, 65(22), 10199-207, (2005).
- GREENLEE RT., Hill-Harmon MB., Murray T., Thun M. Cancer statistics. CA. *Cancer J. Clin.*, 51, 16-36, (2001).
- GRILLE SJ., Bellacosa A., Upson J., Klein-Szanto AJ., et al. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res.*, 1,63(9), 2172-8, (2003).

- GUSTIN JA., Korgaonkar CK., Pincheira R., Li Q., Donner DB. Akt regulates basal and induced processing of NF-kappaB2 (p100) to p52. *J. Biol. Chem.*, 16, 281(24), 16473-81, (2006).
- GUSTIN JA., Maehama T., Dixon JE., Donner DB., The PTEN tumor suppressor protein inhibits tumor necrosis factor-induced nuclear factor kappa B activity. *J. Biol. Chem.*, 20, 276(29), 27740-4, (2001).
- GUSTIN JA., Ozes ON., Akca H., Pincheira R., Mayo LD., Li Q., Guzman JR., Korgaonkar CK., Donner DB. Cell type-specific expression of the I kappa B kinases determines the significance of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling to NF-kappa B activation. *J Biol. Chem.*, 16, 279(3), 1615-20, (2004).
- HALLIWELL B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J.*, 1, 401(1), 1-11, (2007).
- HAYDEN MS., Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.*, 18(18), 2195–224, (2004).
- HEERING J., Erlmann P., Olayioye MA. Simultaneous loss of the DLC1 and PTEN tumor suppressors enhances breast cancer cell migration. *Exp. Cell Res.* 315, 2505–14, (2005).
- HSU TC., Young MR., Cmarik J., Colburn NH. Activator protein 1 (AP-1)- and nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent transcriptional events in carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.*, 1, 28(9), 1338-48, (2000).
- KIM D., Kim S., Koh H., Yoon SO., Chung AS., C ho KS., Chung J. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J.* 15(11), 1953-62, (2001).
- KIM CH., Han SL., Lee SY., Youk HS., Moon JY., et al. Protein Kinase C-ERK1/2 Signal Pathway Switches Glucose Depletion-Induced Necrosis to Apoptosis by Regulating Superoxide Dismutases and Suppressing Reactive Oxygen Species Production in A549 Lung Cancer Cells. *J. Cell. Physiol.*, 211, 371–385, (2007).
- KOHNO T., Takahashi M., Manda R., and Yokota J. Inactivation of the PTEN/MMAC1/TEP I gene in human lung cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 22, 152-156, (1998).
- LI Y., Liu J., Liu X., Xing K., Wang Y., Li F., Yao L. Resveratrol-induced cell inhibition of growth and apoptosis in MCF7 human breast cancer cells are associated with modulation of phosphorylated Akt and caspase-9. *Appl Biochem Biotechnol.*, 135(3), 181-92, (2006).
- LI N., Karin M. Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *FASEB J.*, 13 (10), 1137–43, (1999).

- LI J., Yen C., Liaw D., Podsypanina K., Bose, S., et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 275, 1943-1947, (1997).
- LIAW D., Marsh DJ., Dahia PL., Wang SI., et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat. Genet.*, 16, 64-67, (1997).
- LIU JW., Nagao N., Kageyama K., et al. Antimetastatic and anti-invasive activity of phospho-ascorbyl palmitate through intracellular ascorbate enrichment and the resultant antioxidant action. *Oncol. Res.*, 11(10), 479-87, (1999).
- LOBO GP., Waite KA., Planchon SM., Romigh T., Nassif NT., Eng C. Germline and somatic cancer-associated mutations in the ATP-binding motifs of PTEN influence its subcellular localization and tumor suppressive function. *Hum Mol Genet.*, 15, 2851-62, (2009).
- MAEHAMA T., and Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.*, 273, 13375-13378, (1998).
- MAIER D., Jones G., Li X., Schönthal AH., Gratzl O., Van Meir EG., et al. The PTEN lipid phosphatase domain is not required to inhibit invasion of glioma cells. *Cancer Res.*, 59, 5479-82, (1999).
- MARSIT CJ., Zheng S., Aldape K., Hinds PW., Nelson HH., Wiencke JK., et al. PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics allelic loss, and epigenetic alteration. *Human Pathol.*, 36, 768-76, (2005).
- MAYERS MP., Pass I., et al. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(23), 13513-13518, (1998).
- MBURU YK., Wang J., Wood MA., Walker WH., Ferris RL. CCR7 mediates inflammation-associated tumor progression. *Immunol Res.*, 36(1-3), 61-72, (2006).
- MONTE M., Davel LE., Sacerdote de, Lustig E. Hydrogen peroxide is involved in lymphocyte activation mechanisms to induce angiogenesis. *Eur. J. Cancer*, 33, 676-82, (1997).
- MUSCHEL R., Liotta L.A. Role of oncogenes in metastases. *Carcinogenesis*, 9, 715-710, (1998).
- MYERS MP., Pass I., Batty IH., Van der Kaay J., et al. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95, 13513-13518, (1998).
- NAIR AS., Shishodia S., Ahn KS., Kunnumakkara AB., Sethi G., Aggarwal BB. Deguelin, an Akt inhibitor, suppresses I κ B α kinase activation leading to suppression of

- NF-kappaB-regulated gene expression, potentiation of apoptosis, and inhibition of cellular invasion. *J. Immunol.*, 15, 177(8), 5612-22, (2006).
- NAKANISHI K., Sakamoto M., Yasuda J., Takamura M., Fujita N., Tsuruo T., Todo S., Hirohashi S. Critical involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in anchorage-independent growth and hematogeneous intrahepatic metastasis of liver cancer. *Cancer Res.*, 5, 62(10), 2971-5, (2002).
- NISHIKAWA M., Tamada A., Kumai H., Yamashita F., And Hashida M. inhibition of experimental pulmonary metastasis by controlling biodistribution of catalase in mice. *int. j. Cancer*, 99, 474–479, (2002).
- NICOLSON GL. Quantitative variations in gene expression: possible role in cellular diversification and tumor progression. *J. Cell Biochem.*, 46, 227-283, (1991).
- NICOLSON GL. Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites. *Biochim. Biophys. Acta.*, 948, 175-224, (1988).
- NONAKA Y., Iwagaki H., Kimura T., Fuchimoto S., Orita K. Effect of reactive oxygen intermediates on the in vitro invasive capacity of tumor cells and liver metastasis in mice. *Int J Cancer*, 54, 983–6, (1993).
- NORO R., Gemma A., Miyanaga A., Kosaihiro S., Minegishi Y., Nara M. PTEN inactivation in lung cancer cells and the effect of its recovery on treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Int J Oncol.*,31(5), 1157–63, (2007).
- OKAMOTO I., Kenyon CL., et al. Expression of constitutively activated EGFRvIII in non-small cell lung cancer. *Cancer sci.*, 94(1), 50-56. (2003).
- OKUMURA K., Zhao M., et al. Cellular transformation by the MSP58 oncogene is inhibited by its physical interaction with the PTEN tumor suppressor. *Proc. Natl.Acad. Sci.USA*, 102, 2703-2706, (2005).
- ONODA JM., Piechocki MP., Honn KV. Radiation-induced increase in expression of the $\alpha_5\beta_1$ integrin in melanoma cells: effects on metastatic potential. *Radiat Res.*, 130, 281–8, (1992).
- OZES ON., Akca H., Mayo LD., Gustin JA., Maehama T., Dixon JE., Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 10, 98(8), 4640-5, (2001).
- OZES ON., Mayo LD., Gustin JA., Pfeffer SR., Pfeffer LM., Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, 2, 401(6748), 82-5, (1999).

- PAUL A., Doherty K., Plevin R. Differential regulation by protein kinase C isoforms of nitric oxide synthase induction in RAW 264.7 macrophages and rat aortic smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.*, 120, 940–6, (1997).
- PODSYPANINA K., Ellenson L. H., Nemes A., et al. Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96, 1563-1568, (1999).
- RAJAGOPALAN S., Meng XP., Ramasamy S., Harrison DG., Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest.*, 98, 2572–9, (1996).
- SAHA S., Bardelli A., Buckhaults P., et al. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science*, 294,1343-1346, (2001).
- SALH B., Wagey R., Marotta A., Tao JS., Pelech S. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B, and p70 S6 kinases in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 cells: differential effects of rapamycin, Ly294002, and wortmannin on nitric oxide production. *J. Immunol.*, 61, 6947–54, (1998).
- SANTOSH Sinha, Anti-oxidant gene expression imbalance, aging and Down syndrome, *Life Sciences*, 76,1407–1426, (2005).
- SELLAK H., Franzini E., Hakim J., Pasquier C. Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation. *Blood*, 83, 2669–77, (1994).
- SHARMA A., Patrick B., Li J., Sharma R., Jeyabal PV., Reddy PM., Awasthi S., Awasthi YC. Glutathione S-transferases as antioxidant enzymes: small cell lung cancer (H69) cells transfected with hGSTA1 resist doxorubicin-induced apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 15, 452(2), 165-73, (2006).
- SHAUGHNESSY SG., Whaley M., Lafrenie RM., Orr FW. tumor cell degradation of extracellular matrices involves a latent gelatinase activated by reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.*, 304, 314–21, (1993).
- SHUKLA S., Maclennan GT., Hartman DJ., Fu P., Resnick MI., Gupta S. Activation of PI3K-Akt signaling pathway promotes prostate cancer cell invasion. *Int. J. Cancer*, 121, 1424–32, (2007).
- SINHA S., Anti-oxidant gene expression imbalance, aging and Down syndrome, *Life Sciences*, 76, 1407–1426, (2005).
- SORIA CJ., Lee Y., Lee IJ., Wand L., Issa P., et al. Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clinical Cancer Research*, 8, 1178-1184, (2002).

- STAMBOLIC V., Suzuki A., de la Pompa J L., Brother G M., et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*, 95, 29-39,(1998).
- STECK PA., Pershouse MA., Jasser SA., et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat. Genet.*, 15, 356-362, (1997).
- SUH YA., et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, 401, 79–82, (1999).
- SUZUKI A., de la Pompa JL., Stambolic V., Elia AJ., et al. High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr. Biol.*, 8, 1169-1178, (1998).
- TANG JM., He QY., Guo RX., Chang XJ. Phosphorylated AKT overexpression and loss of PTEN expression in non-small lung cancer confers poor prognosis. *Lung Cancer*, 51, 181–91, (2006).
- TOH Y., Pencil SD., Nicolson GL. A noval candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines. *J. Biol. Chem.* , 269, 22958-22963, (1994).
- YAGCI A., Zık B., Sevimli A., Yılmaztepe A., Yılmaz M., Ulukaya E. Akciğer kanserinde dokudaki Akt ve Pten ifadelerinin ve tedaviye yanıtla ilişkilerinin immunohistokimyasal incelenmesi. *II. Klinik Biyokimya ve Kanser Sempozyumu*, S6, 151-152, (2004).
- YANG J.Q., et al. V-Ha-Ras overexpression induces superoxide production and alters levels of primary antioxidant enzymes. *Antioxid. Redox. Signal.*, 3, 697–709, (2001).
- YOSHIZAKI N., Mogi Y., Muramatsu H., Koike K., Kogawa K., Niitsu Y. Suppressive effect of recombinant human Cu, Zn-superoxide dismutase on lung metastasis of murine tumor cells. *Int J Cancer* 57, 287–92, (1994).
- ZHANG JG., Wang JJ., Zhao F., Liu Q., Jiang K., Yang GH. MicroRNA-21 represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin. Chim. Acta.*, 411, 846–52, (2010).

TÜBİTAK

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 108S187
Proje Başlığı: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücre Dizilerinde PTEN Tümör Baskılayıcı Geninin İnvazyonu Baskılayıcı Etkisinin Olası Mekanizmaları İle Araştırılması
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Doç.Dr. HAKAN AKÇA, Doç.Dr. Mutay Aslan, Doç.Dr.İbrahim Açıkbaş
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası Tıbbi Biyoloji AD Kınıklı/DENİZLİ
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK-SBAG, ANKARA
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 15.09.08-15.09.11
Öz NSCLC hücreleri oldukça invaziv hücrelerdir, fakat bu NSCLC hücre invazyon mekanizmaları tam anlamıyla açık değildir. Biz bu çalışmamızda NSCLC hücrelerinin tümör baskılayıcı gen PTEN ifade etmediklerini göstererek, bu hücrelere kalıcı gen transfeksiyonu yöntemi ile yeniden yaratılan PTEN ifadesinin Akt fosforilasyonunu azaltıp NFkB aktivitesini baskıladığını gösterdik. PTEN, NSCLC hücrelerinin invazyonunu lipid fosfataz aktivitesi ile PI3K/Akt/NFkB yolağı baskılayarak inhibe ettiğini bu çalışma ile açıklamış olduk. Çalışmamızda, gen klonlaması "Yönlendirilmiş mutasyon" yöntemi ile PTEN inaktif mutantlarının yaratılması, kalıcı ve geçici gen transfeksiyon yöntemi, gen reporter yöntemi gibi birçok moleküler biyolojik yöntem kullanılmıştır.
Anahtar Kelimeler: PTEN, NSCLC, PI3K, AKT, NFkB, Antioksidant enzimler
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: 1-) Akca H , Demiray A, Tokgun O, Yokota J., Invasiveness and anchorage independent growth ability augmented by PTEN inactivation through the PI3K/AKT/NFkB pathway in lung cancer cells. Lung Cancer, 73:302-309, 2011 2-) Akca H , Demiray A. "PI3K/AKT NFkB yolağının Küçük Hücreli Dışı Akciğer kanserlerinde hücre invazyonuna etkisinin araştırılması", III. Multidisipliner Kanseri Araştırma sempozyumu, S33, 24-27 Şubat 2009, Bursa (Best poster Presentation awards) 3-) Akca H , Demiray A, Tokgun O, Yokota J. "Tumor suppressor PTEN Can Suppress Non Small Cell Lung Cancer Invasion by The Inhibition of Phosphoinositol 3 Kinase Pathway" 36 th FEBS congress 2011, 25-30 Haziran Torino-İtalya