

2008-270



TÜBİTAK

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

Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu
Health Sciences Research Group

95364

Proje No: 106S347 (SBAG-HD-194)

**Tümör Baskılayıcı Gen PTEN Ekspresyonunun Akciğer Kanseri Metastazına Olası
Baskılayıcı Etkisinin Araştırılması**

**Doç.Dr.Hakan AKÇA
Aydın Demiray**

**Şubat 2008
DENİZLİ**

Önsöz

Akciğer kanseri dünya genelinde kanser sebepli ölümlerin başında gelmektedir. Kanserden kaynaklanan ölümlerin sebebi ise bilindiği üzere kanserin metastazıdır. Kanser konusunda yapılan birçok araştırmaya rağmen özellikle kanser metastazının moleküler mekanizmaları üzerine bilgilerimiz oldukça sınırlıdır ve metastazı kontrol eden genlerin bulunması hedefe yönelik tedavi yaklaşımına oldukça fayda getireceği şüphesizdir. Akciğer kanserlerinde PTEN gen inaktivasyonunun oldukça sık gerçekleştiğini saptadığımız için biz bu çalışmada PTEN tümör baskılayıcı genini ökaryotik ekspresyon vektörüne klonlayarak, PTEN ekspresyon kaybı olan küçük hücre dışı akciğer kanseri PC14'e kalıcı transfeksiyon yöntemi ile aktardık ve yeniden yaratılan PTEN ekspresyonunun hücre invazyonunu AKT aktivitesini baskılayarak engellediğini matri jel invazyon odacığı kullanarak gösterdik. Akciğer kanserlerinde PTEN tümör baskılayıcı geninin tümör gelişimini kontrol etmesinin yanında, hücre invazyonunu da kontrol ettiği bu çalışma ile gösterilmektedir. Çalışmamız TÜBİTAK-SBAG tarafından 106S347 proje no su ile desteklenmiştir.

İçindekiler

| | |
|-------------------------------------|----|
| Önsöz..... | 2 |
| İçindekiler..... | 3 |
| Tablo ve Şekil Listesi..... | 4 |
| Özet..... | 5 |
| Abstract..... | 6 |
| Giriş..... | 7 |
| Genel Bilgiler..... | 8 |
| Gereç ve Yöntem..... | 9 |
| Sonuçlar..... | 13 |
| Tartışma..... | 22 |
| Referanslar..... | 24 |
| Tübitak Proje Özet Bilgi Formu..... | 27 |

Tablo ve Şekil Listesi

| | |
|---|----|
| Şekil 1. Çalışmamızda PTEN gen transferinde kullanılan küçük hücre dışı akciğer kanser hücre dizisi PC14'ün genel görünümü..... | 9 |
| Şekil 2 Normal standart besi ortamında küçük hücre dışı akciğer kanserlerinin PTEN ekspresyon düzeyleri..... | 13 |
| Şekil 3. PCR reaksiyonu sonucu cDNA kütüphanesinden amplifiye edilen PTEN cDNA..... | 14 |
| Şekil 4. PTEN cDNA'nın jelden izolasyonu..... | 14 |
| Şekil 5. EcoRI kesimli ardından defosforile edilmiş vektör ve EcoRI kesilmiş PTENcDNA'nın klonlama öncesi görüntüsü..... | 15 |
| Şekil 6. Kolonilerden izole edilen plazmitlerin EcoRI enzimi ile kesimi..... | 16 |
| Şekil 7. PTEN cDNA'sı ve pcDNA3.1 üzerindeki Scal kesim bölgeleri..... | 17 |
| Şekil 8. 1-5 nolu kolonilerden izole edilen plazmitlerin Scal enzimi ile kesimi..... | 18 |
| Şekil 9. PC14, hücrelerinin gen transferi ardından seçimleri ve kolonilerin oluşması..... | 19 |
| Şekil 10. PTEN gen transferinden sonra PC14 hücrelerinin PTEN, Akt ve fosfo-Akt ekspresyon düzeyleri..... | 20 |
| Şekil 11. PTEN ekspres etmeyen PC14 hücrelerinde kalıcı transfeksiyon yöntemi ile yaratılan PTEN ekspresyonunun hücre invazyomuna etkisi..... | 21 |

Özet

İnsan karsinogenezinin çok adımlı bir oluşum olduğu ve kanser gelişimi süresince meydana gelen fenotipik değişikliklerin hücre içindeki genetik değişiklik birikimlerinin yansıması olduğu günümüzde yaygın olarak kabul edilir. Böylece kanser hücrelerindeki metastatik fenotiplerin kazanılma süreçlerini anlamak için kanser hücrelerinin metastatik fenotipleri ile ilişkili olan ve kanser gelişimi süresince değişikliklerinin çoğaldığı gözlenen genlerin tanımlanması zaruridir. Bu sebeple araştırmacılar, metastatik kanser hücrelerinde prenataly değişmiş ve kanser hücrelerinin metastatik potansiyellerini düzenleme aktivitesine sahip genleri araştırmaktadırlar. Akciğer kanserinde PTEN/MMAC1 geni sık olarak inaktiftir. Bununla beraber bu genin akciğer kanser hücrelerinin metastatik potansiyellerinin düzenlenmesine karşılıklı karışmadığı hala açık değildir. Bu literatür bilgilerine rağmen henüz akciğer kanser metastazını kontrol eden bir gen bulunamamıştır. Bu çalışmada PTEN tümör baskılayıcı genini ökaryotik ekspresyon vektörüne klonlayarak, PTEN geni ekspres etmeyen akciğer kanseri hücre dizisi PC14'de PTEN gen ekspresyonu kalıcı gen transfeksiyon yöntemiyle tekrar yaratılmıştır. Yapılan invazyon deneylerine göre tekrar yaratılan PTEN gen ekspresyonu PC14 hücrelerinin invazyonunu kontrole göre %72 ($p<0.001$) engellemiştir. Çalışmamız PTEN tümör baskılayıcı geninin küçük hücre dışı akciğer kanser invazyonunu engellediğini göstermesi bakımından önemlidir.

Anahtar kelimeler: Akciğer kanseri, PTEN, İnvazyon

Abstract

It is now widely accepted that human carcinogenesis is a multi-step process and phenotypic changes during cancer progression reflect the sequential accumulation of genetic alteration in cells. Thus, in order to understand the process of acquisition of metastatic phenotypes in cancer cells, it is indispensable to identify genes whose alterations accumulate during cancer progression and correlate with metastatic phenotypes of cancer cells. For this reason researchers have been searching for genes that are preneoplasially altered in metastatic cancer cells and have activities to regulate their metastatic potentials. In lung cancer PTEN/MMAC1 gene is frequently inactivated. However, it still remains unclear whether this gene is involved in the regulation of metastatic potential in lung cancer cells. In spite of above knowledge we do not know any gene which can control lung cancer metastasis. In this study we examine the effects of PTEN expression on lung cancer cell invasion by recreation of PTEN gene expression in no PTEN expressed lung cancer cell lines PC14 with using stable gene transfection technique. Invasion study show that recreated PTEN gene expression was inhibit PC14 cell invasion at 72 %, when the compare empty vector transfected cells. Our results are so important because of the shown that PTEN tumor suppressor gene inhibit NSCLC invasion.

Key words: Lung Cancer, PTEN, Invasion

Giriş

Geçen son yirmi yıl içerisinde kanser gelişiminin bir çok adımı değişik safhalardaki insan kanserleri kullanılarak moleküler genetik düzeyde çalışılmıştır. Bir çok sayıda tümör baskılayıcı ve onkogen tanımlanmış ve bunların genetik olarak değişik formları bir çok insan kanserinde tespit edilmiştir. Bu genlerin hücrede çoğalma, farklılaşma ve ölüm olaylarına karıştıkları bilinmektedir. 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 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). Bu çalışmada, küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde PTEN tümör baskılayıcı genin ekspresyon kaybının çok sık olduğunu Western blot ile gösterilmiştir. Ardından PTEN cDNA'sı PCR aracılığı ile cDNA kütüphanesinden çekilmiş ve ökaryotik ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. PTEN ökaryotik ekspresyon vektörü, PTEN ekspres etmeyen küçük hücre dışı akciğer kanser hücre dizisi PC14 e kalıcı transfeksiyon yoluyla aktarılarak bu hücrede PTEN ekspresyonu tekrar yaratılmış ve PTEN ekspresyonunun akciğer kanser invazyonunu baskıladığı gösterilmiştir.

Genel Bilgiler

Akciğer kanserinin sebep olduğu ölüm, diğer solid malignansilerde olduğu gibi neredeyse tümüyle neoplastik hücrelerin primer tümörlerden uzak organ bölgelerine metastazları ve invazyonlarının sonuçlarıdır. Bu sebeple akciğer kanser metastazıyla ilişkili genlerin ve 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, angiogenезin indüksiyonu, hostun anti-tümör cevabından kaçma ve metastatik bölgelerde büyüme yer almaktadır (TOH ve ark., 1994; NICOLSON, 1988). Ek olarak çeşitli genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinin de bu süreçte önemli olduğu düşünülmüştür (NICOLSON, 1991; MUSCHEL ve LIOTTA, 1988; CHAMBERS ve TUCK, 1993).

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 (STECK ve ark., 1997; MAIER ve ark., 1998). PTEN geni knockout edilmiş fare fenotiplerinde PTEN'in normal gelişimde gerekli olduğu gösterilmiş ve tümör baskılayıcı rolü doğrulanmıştır (PODSYPANINA ve ark., 1999; SUZUKI ve ark., 1998; DI CRISTOFANO ve ark., 1998). Bir fosfataz olan PTEN inositol lipidleri defosforile eder, bu özelliği PTEN'in PI3-kinaz ve fofinositol 3 fosfat yolağının tersine çalıştığını gösterir (STAMBOLIC ve ark., 1998; MYERS ve ark., 1998; MAEHAMA ve DIXON 1998).

Akciğer kanseri invazyonunu ve metastazını kontrol eden bir gen şuna kadar rapor edilmemiştir. Bizim çalışmamız PTEN ekspresyonunun küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde invazyonu baskıladığını ve bu etkisinin de muhtemelen Akt üzerinden olduğunu gösteren literatürdeki ilk çalışmadır. Biz PTEN'in sadece tümör baskılayıcı bir gen olmayıp, aynı zamanda hücre invazyonu ve dolayısı ile de kanser metastazının kontrolünde de rol alan bir gen olduğunu düşünmekteyiz.

Gereç ve Yöntem

Hücre dizileri: Çalışma boyunca kullanılmış olan PTEN ekspres etmeyen Akciğer kanser hücre dizileri Japon Ulusal Kanser Araştırma Merkezinden sayın Prof.Dr. Jun Yokota tarafından hediye edilmiştir.



Şekil1. Çalışmamızda PTEN gen transferinde kullanılan küçük hücre dışı akciğer kanser hücre dizisi PC14'ün genel görünümü.

PTEN cDNA'sının klonlanması: PTEN proteinini kodlayan cDNA'yı, cDNA library den PCR aracılığıyla klonlamak amacıyla biri başlangıç kodonundan stop kodonuna doğru (PTEN Upper), diğeri stop kodonundan başlangıç kodonuna doğru (PTEN Lower) 2 primer dizayn edilmiştir. Bu primerlerin 5' uçlarına klonlamayı kolaylaştırmak amacıyla EcoR I restriksiyon enziminin kesim bölgeleri de konulmuştur. Buna göre primerler;

PTEN Upper:

5'- CGC GAA TTC GCC ATG GCA GCC ATC ATC AAA GAG
ATC GTT AGC AGA AAC AAA AGG AGA TAT CAA GAG
GAT GGA TTC GAC TTA GAC-3' (Tm:67,6)

PTEN Lower:

5'- CGC GAA TTC TCA GAC TTT TGT AAT TTG TGT ATG
CTG ATC TTC ATC AAA AGG TTC ATT CTC TGG ATC
AGA GTC AGT GGA GGT GTC AGA-3' (Tm:67,5)

PCR şartları:

| Segment | Döngü Sayısı | Sıcaklık | Süre |
|---------|--------------|----------------------|----------------------------|
| 1 | 1 | 95 C | 2 dakika |
| 2 | 30 | 95 C 62 C 72 C | 30 sn 30 sn 1 dakika |
| 3 | 1 | 72 C | 10 dakika |

Jelden DNA izolasyonu: PCR reaksiyonundan elde edilen ürün (PTENcDNA) agoroz jel elektroforezi ile gözlenmiş ve PTEN cDNA (1200bp) UV ışığı altında jelden bisturi yardımı ile kesilerek ependorf tüpe aktarılmıştır (şekil 2). Daha sonra jelden alınan PTEN cDNA promega jel ekstraksiyon kiti kullanılarak izole edilmiştir.

Alkalen fosfataz reaksiyonu: Vektör EcoRI enzimi ile kesildikten sonra insört almadan kapanmasını engellenmek için alkalen fosfataz enzimi ile aşağıda belirtilen reaksiyon koşullarında defosforile edilmiştir.

| | |
|-----------------------------|---------------|
| Vektör DNA | 20 mikrolitre |
| 30 unit CIAP | 1 mikrolitre |
| 10x Alkalen fosfataz buffer | 5 mikrolitre |
| Steril distile su | 24 mikrolitre |

toplam 50 mikrolitre reaksiyon ortamı 50 C de 30 dak inkübe edildi. Ardından 1:1 hacimde fenol/kloroform ekstraksiyonu yapıldı (2 kez) ve son konsantrasyon 150 mM olacak şekilde NaCl ilave edilerek etanol presipitasyonu ile defosforile vektör izole edilmiştir.

Ligasyon reaksiyonu: PTEN cDNA'sının pcDNA3.1'e klonlanması aşağıda belirtilen reaksiyon şartlarında T4 DNA ligaz enzimi ile gerçekleştirilmiştir.

| | |
|------------------------------|-----------|
| Vektör DNA 200ng/mikroL | 1 mikroL |
| PTENcDNA 200 ng/mikroL | 3 mikroL |
| T4 DNA Ligaz 350 unit/mikroL | 1 mikroL |
| 10x T4 ligaz Buffer | 2 mikroL |
| Steril distile su..... | 13 mikroL |

Toplam 20 mikrolitre reaksiyon ortamı 16°C de 18 saat inkübe edilmiştir.

Transformasyon reaksiyonu: Transformasyonda kompetent JM109 bakterileri kullanılmıştır. Kompetent JM109'lar ligation ürünleri ile karıştırılıp, buz içerisinde 30 dakika inkübe edildikten sonra 42 °C de 90 saniye tutulmuş ve hemen tekrar buz içerisinde 2 dakika bekletilerek transformasyon gerçekleştirilmiştir. Ardından tüp içerisine LB besi ortamı ilave edilerek bakteriler 1 saat 37 °C de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda bakteriler 100 mikrogram/ml amfisilin içeren katı besi ortamına yayma tekniği ile ekilerek 37 °C de inkübe edilmiştir.

Plazmit izolasyonu: Plazmit izolasyonu için QIA gen plazmid izolasyon kiti kullanılmıştır. Amfisilinli ortamda 37 °C de 18 saat inkübe edilen pcDNA3.1-PTEN transfekte edilen

JM109'lar, 4500 rpm de +4 °C de 10 dakika santirfuj edilmiştir. Ardından kit kullanılarak plazmid izole edilmiştir.

Kalıcı transfeksiyon: Kalıcı transfeksiyon küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre dizisi PC14 'e (şekil1) FugenHD (Roche) transfeksiyon reagent kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler kontrol olarak boş vektör ve PTEN geni içeren vektör kullanılarak transfekte edilecekler ve stable klonlar geneticin kullanılarak seçileceklerdir. Stable klonların PTEN ekspres ettiği Western blot ile gösterilmiştir.

SDS-PAGE ve Western Blot: Hücre protein özütleri TRX-100 tamponu içerisinde toplanacak, örnekler 12000 x g de 4 °C'de 1 dakika santirfuj edilerek istenmeyen hücre artıklarının ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Toplanan örneklerden 1'er mikrolitre farklı ependorf tüplere alınacak ve protein miktarı tayin kiti kullanılarak bu örneklerin protein miktarları saptanmıştır. Daha sonra örneklerden, mikrolitre de 100 mikrogram protein olacak şekilde alınarak bunların üzerlerine protein yükleme boyasından da (1/1 oranda) eklenmiş ve 3.5 dakika su banyosunda kaynatılmıştır. Kaynatma işleminin hemen ardından ependorf tüp içindeki örnekler 10 mikrolitre'lik otomatik pipet kullanılarak %10'luk SDS jele uygulanarak ve elektroforeze tabii tutulmuşlardır. Elektroforez işleminin ardından proteinler transfer tamponu içinde 4 °C de 75 mAmp akım şiddetinde bir gece boyunca immünobolin membran üzerine transfer edilmişlerdir. Bu işlemden sonra membran, %5'lik kuru süt içeren PBST çözeltisi içinde oda sıcaklığında 2 saat bloklanmıştır. Ardından aynı membran %5 kuru süt içinde 1:10000 (Akt, p-Akt ve PTEN için) ve 1:50.000 (GAPDH için) oranlarında bulunan primer antikolarla oda sıcaklığında 1 saat işaretlenmişlerdir. Membran üzerindeki spesifik proteinlerin fare kaynaklı primer antikolarla işaretlenmesinin ardından, membran 1 saat PBST ile oda sıcaklığında yıkanmıştır. Yıkama işleminin bitmesiyle membran fare immüoglobulinlerine karşı spesifik olarak keçi üzerinde geliştirilmiş, 1:10000 oranında HRP (Horseradish Peroksidaz) bağlı sekonder antikor (goat anti-mouse sekonder antikor) bulunduran %5 kuru sütlü PBST çözeltisi içerisinde tekrar işaretlenmiştir. İşaretleme oda sıcaklığında 1 saat yapıldıktan sonra, blot PBST ile yıkanmış ve ECL çözeltisi kullanılarak spesifik protein bantları kemilüminesansa duyarlı film kullanılarak belirlenmiştir.

Hücre migrasyonunun belirlenmesi: Planlanan çalışmada PTEN'in hücre invazyonuna etkisinin saptanması için growth faktörü azaltılmış BioCoat Matrigel Invazyon Chamber-

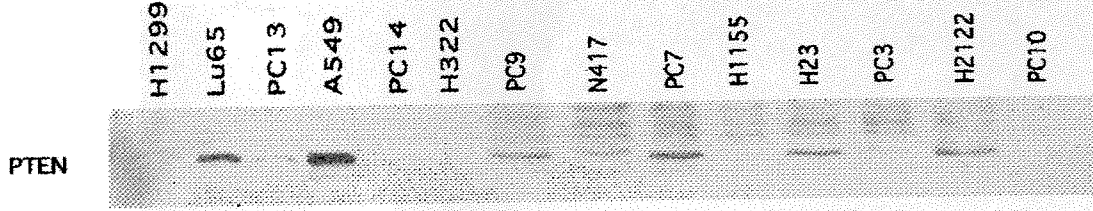
invazyon odaları (BD Biosciences, Clontech) kullanılmıştır. Bu invazyon odacıklarının hücrelere sağladıkları özel şartlar sayesinde biz *in vitro* koşullar altında hücrelerin invaziv özelliklerini saptayabilmekteyiz. Bu invazyon odacıkları 8 mikron çaplı porlar içeren bir membran ile örtülüdür ve bu porlu membran ayrıca hücreler arası matrikse karşılık gelen 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 (pcDNA3.1) ve Stable PTEN ekspres eden (PTENwt (pcDNA3.1-PTEN) PC14 hücreleri her invazyon odasında 2.5×10^4 olacak şekilde invazyon odalarına ekilecek üzerlerine 0.5ml RPMI1640 (serum içermeyen %0.1 BSA'lı) konulurken invazyon odacığının dışına kemoatraktan olarak 0.75 ml %10 FBS içeren RPMI1640 konulmuş ve hücreler 24 saat 37°C de CO_2 'li inkübatörde inkübe edilmişlerdir. Inkübasyon saatinin sonunda invaziv özellikte olan hücreler invazyon odacığının porlu olan membranının dış yüzeyine geçeceklerinden invazyon odacığının içindeki besi yeri uzaklaştırmış ve ardından spatülle içyüzeyindeki hücreler kazıyıp uzaklaştırılmışlardır. Ardından dış yüzeydeki hücreler önce metanol ile fixe edilmiş, ardından da toludine mavisi (%1) ile boyanıp, kurutularak mikroskop altında invaziv hücreler sayılmışlardır.

İstatik analizi : Çalışmalarımız sonucu elde ettiğimiz veriler (üç bağımsız deney sonucu) SPSS 10.0 programı student t testi kullanılarak istatistiksel olarak anlamlı olup olmadıkları yönünde analiz edilmişlerdir.

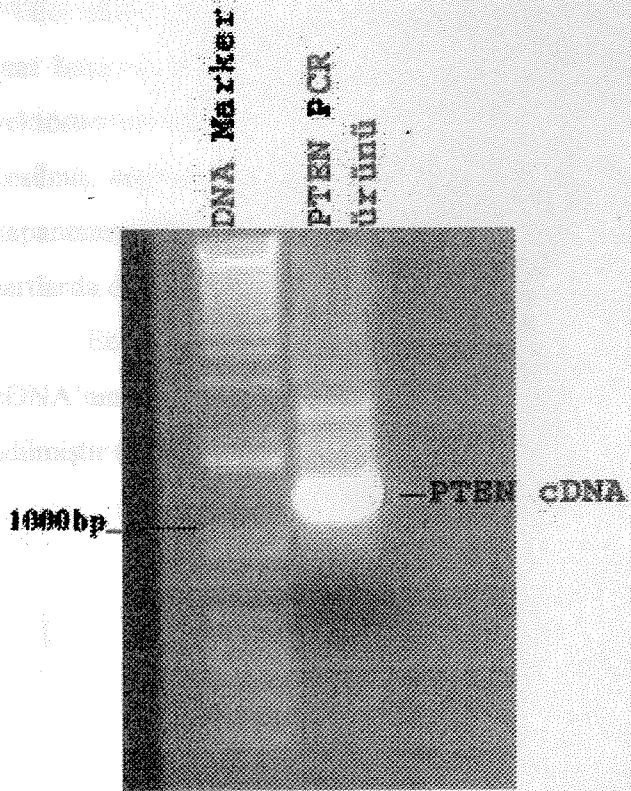
Sonuçlar

PTEN tümör baskılayıcı gen kaybı sıklıkla akciğer kanserlerinde rapor edilmektedir, biz de 14 farklı küçük hücre dışı akciğer kanserinde yaptığımız Western blot analizi sonucu PTEN ekspresyonunun bir çok hücrede ya azaldığı yada kaybolmuş olduğunu saptadık (şekil 2).

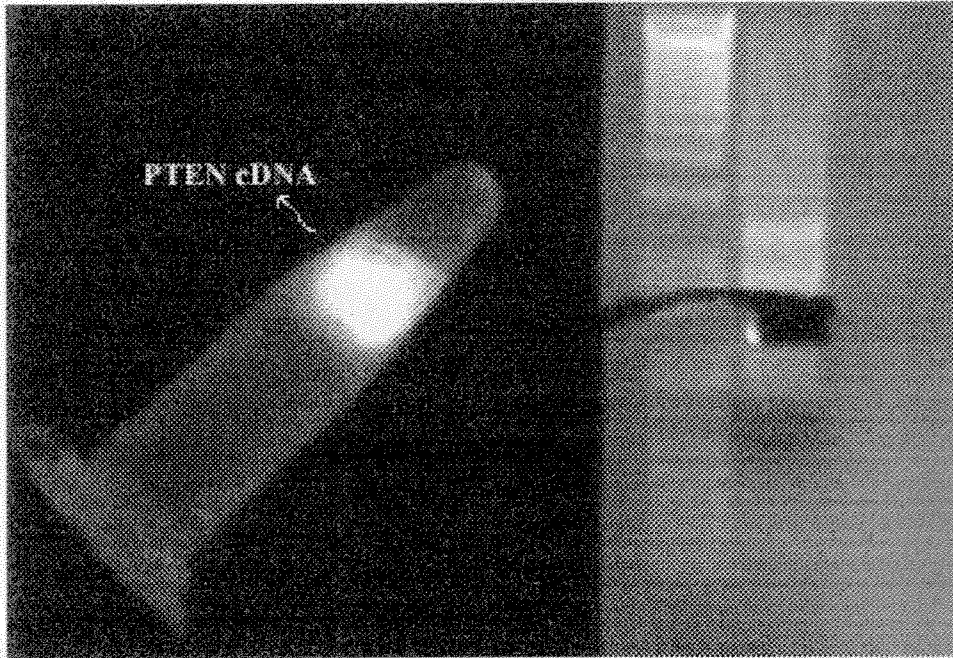


Şekil 2 Normal standart besi ortamında küçük hücre dışı akciğer kanserlerinin PTEN ekspresyon düzeyleri.

National Cancer Research Center/Tokyo/Japan'dan Prof.Dr. Jun YOKOTA'nın hediye ettiği cDNA library PTEN klonlama deneylerimiz için kaynak kalıp olarak kullanılmıştır. Dizayn ettiğimiz primerler yardımı ile wtPTEN cDNA, metot bölümünde verdiğimiz PCR şartları altında library'den çekilmiştir (şekil 3). Primerlerin 5' uçlarına konulan EcoR I enzimi kesim bölgeleri sayesinde izole edilen cDNA'nın 5' ve 3' uçlarında EcoR I kesim bölgeleri yaratılmış ve klonlamada bu bölgeler kullanılmıştır. Projemizin teklifinde klonlamada kullanılacak enzim olarak BamH I verilmişti fakat labımızda EcoRI enzimi şuanda olduğundan dolayı klonlamada bu enzim kullanılmasına Dr.Akça karar vermiş ve primerlerin BamHI bölgelerini EcoRI bölgelerine değiştirerek sentez ettirmiştir.



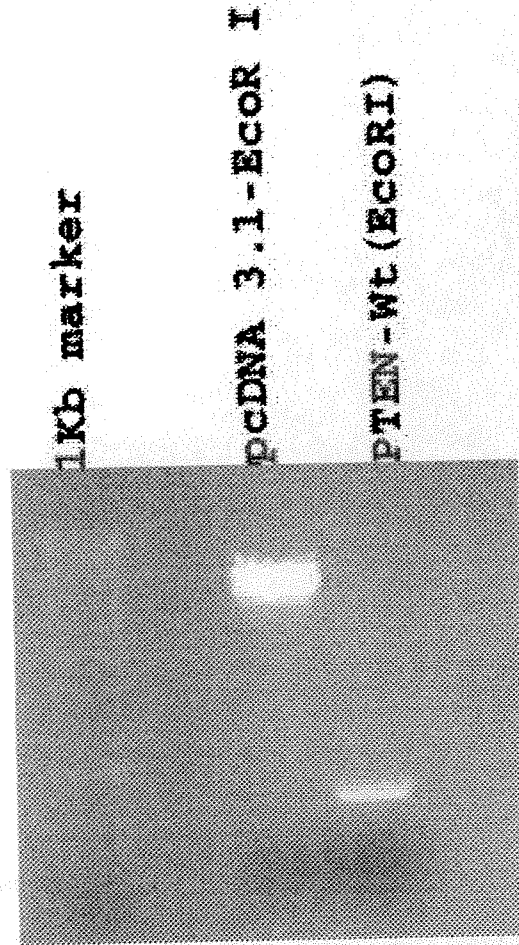
Şekil 3. PCR reaksiyonu sonucu cDNA kütüphanesinden amplifiye edilen PTEN cDNA daha sonra jeldeki PTEN cDNA jelden bir bistrü kullanılarak kesilmiş (şekil 4) ve metot bölümünde açıklandığı gibi jel ekstraksiyon kiti kullanılarak izole edilmiştir.



Şekil 4. PTEN cDNA'nın jelden izolasyonu

PTEN cDNA izole edildikten sonra klonlamaya hazır olması amacı ile EcoR I ile 37 °C de 16 saat boyunca kesilmiş böylece klonlamada kullanılacak sarkık uçlar yaratılmıştır. Ardından vektörümüzü (pcDNA3.1) klonlamaya hazırlamak amacı ile EcoRI enzimi ile 37 °C de 16 saat kesilmiş böylece vektör lineer hale getirilmiştir. Ardından, insert almadan kendi kendine kapanmasını engellemek amacı ile vektör Alkalen fosfataz enzimi ile metot bölümünde verilen şartlarda defosforile edilmiştir.

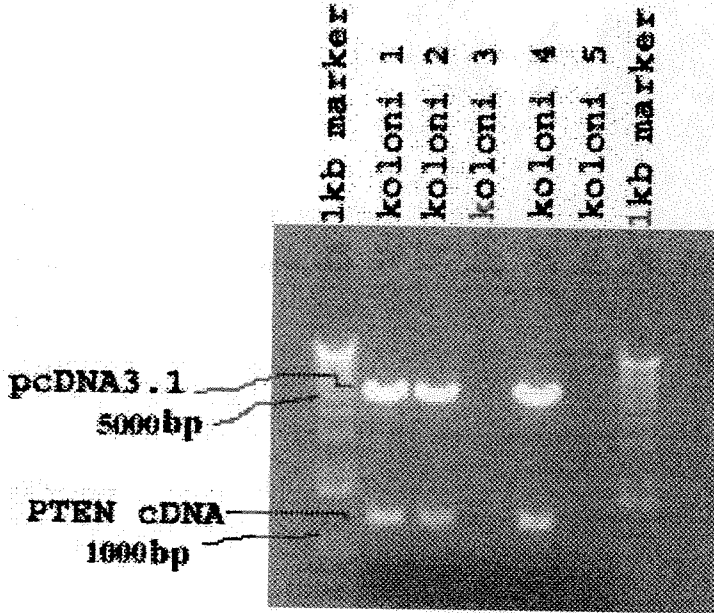
EcoR I ile kesilen, ardından defosforile edilen vektör ve EcoR I ile kesilen PTEN cDNA'nın klonlama öncesi kalitesinin tespiti için agaroz jel elektroforezi yapılarak kontrol edilmiştir (şekil 5)



Şekil 5. EcoRI kesimli ardından defosforile edilmiş vektör ve EcoRI kesilmiş PTENcDNA'nın klonlama öncesi görüntüsü

Vektor ile insert 1 e 3 oranında karıştırılarak metot bölümünde verilen ligation koşullarında 16 °C de 18 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon süresinin sonunda tüm ligasyon reaksiyon ortamı JM109 Ecoli suşuna CaCl₂ transformasyon tekniği ile aktarılmıştır.

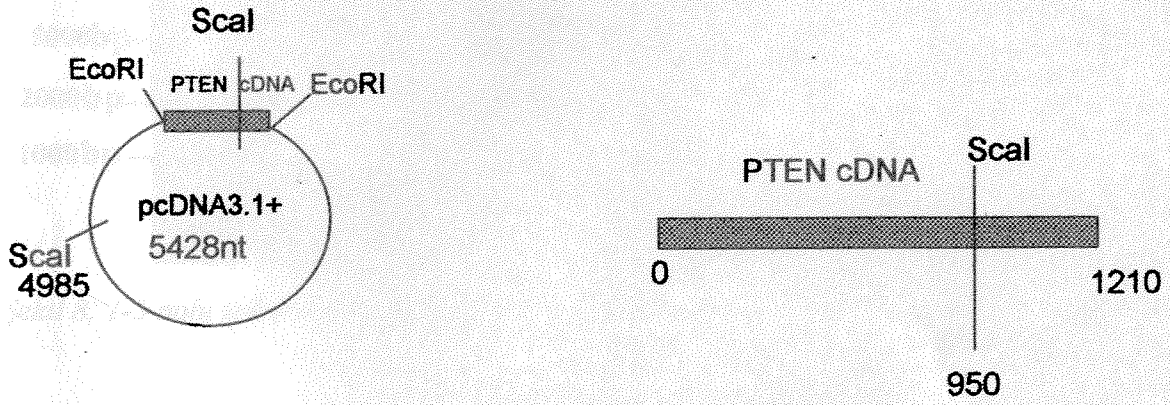
Transformasyonun ardından 300 mikrolitre transformat bakteri örneği 100 mikro gram/ml amfisilin içeren katı LB palte ortamına yayma yoluyla ekilerek 18 saat 37 °C de inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda kolonilerden rasgele 5 örnek alınmış ve bu örnekler 100 mikrogram/ml amfisilin içeren sıvı LB besi ortamında 37 °C de 24 saat inkübe edilmiş ardından da bu bakterilerden metot bölümünde ayrıntılı olarak açıklanan plazmit izolasyonu yöntemiyle plazmitler izole edilmiştir. Bu kolonilerden hangilerinin PTEN cDNA taşıyan koloniler olduklarını anlamak amacıyla, kolonilerden ayrı ayrı izole edilen plazmitler klonlamada kullanılan EcoRI enzimi ile 37 °C de 16 saat kesilerek agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir (şekil 6).



Şekil 6. Kolonilerden izole edilen plazmitlerin EcoRI enzimi ile kesimi.

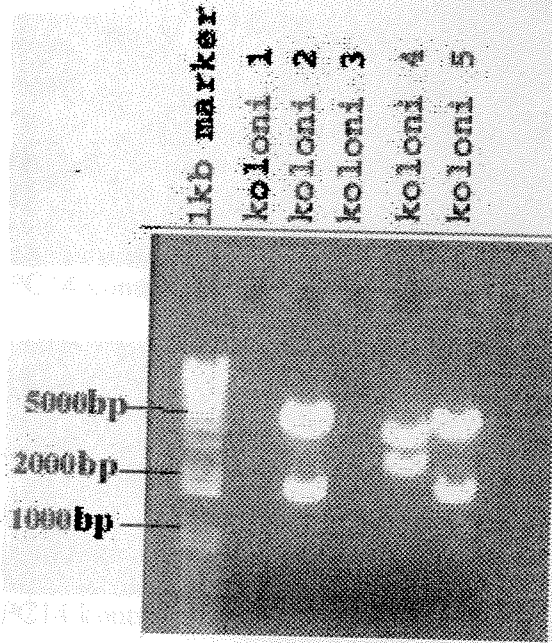
Şekil 6' de görüldüğü gibi 2, 4 ve 5 nolu koloniler PTEN cDNA barındıran kolonilerdir. Dolayısı ile bu kolonilerden (2, 4 ve 5 nolu) izole ettiğimiz pcDNA3.1 ekspresyon vektörleri PTEN cDNA içermektedirler. Biz klonlama stratejimizi tek enzim kullanarak geliştirdiğimiz için bundan sonra sormamız gereken soru bu PTEN cDNAlarının sens mi? anti sens oryantasyonunda mı? Klonlandığı olması gerekmektedir. Dolayısı ile PTEN cDNA'sının

oryantasyonunu (sens mi? Anti sens mi? olarak klonlandığını) saptayabilmek için klonlamanın olduğunu saptadığımız 2, 4 ve 5 nolu kolonilerden izole edilen plazmiti ScaI enzimi ile oryantasyon belirleme amaçlı olarak kesmeye karar verdik. Sca I enzimini seçmemizin nedeni bu enzimin PTEN cDNA üzerinde bir kesim bölgesi (950 inci nükleotitten) ve pcDNA ekspresyon vektörü üzerinde bir kesim bölgesi (4985 inci nükleotitten) içermesidir (Şekil 5), PTEN cDNA ve pcDNA3.1 DNA dizileri üzerindeki ScaI ve EcoRI restriksiyon enzim kesim bölgelerinin saptanması için Genetyx programı kullanılmıştır.



Şekil 7. PTEN cDNA'sı ve pcDNA3.1 üzerindeki ScaI kesim bölgeleri.

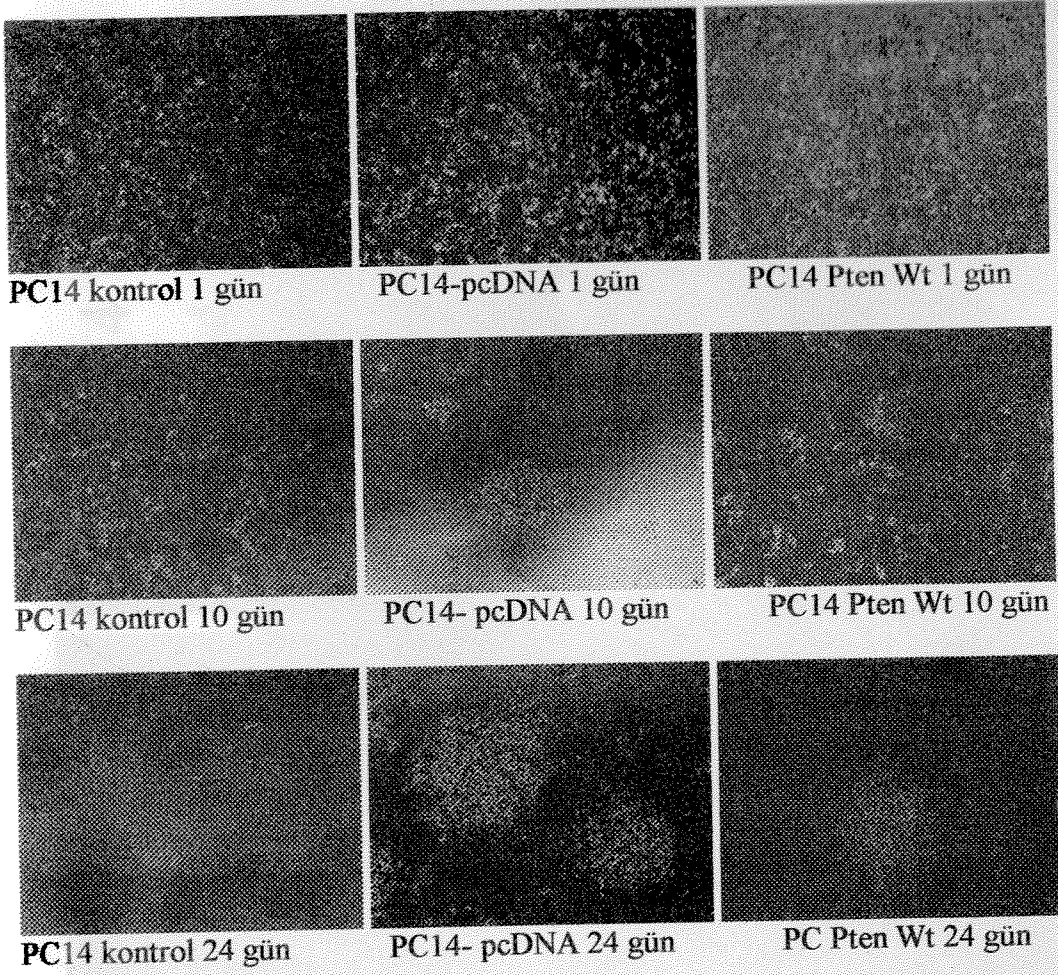
PTEN cDNA'nın ekspresyon vektörü pcDNA3.1'e giriş yönüne göre Sca I enzimi kesim ürünlerinin değişeceğinden yola çıkarak PTEN cDNA'sının pcDNA vektörüne hangi oryantasyonda klonlandığını saptayabildik. Dolayısı ile sens oryantasyonunda klonlama olduysa kesim sonucunda gözleyeceğimiz DNA fragmentlerinin büyüklükleri: 3400 bp ve 2400 bp olarak beklenirken, anti sens oryantasyonunda klonlama olduysa DNA fragmentlerinin uzunlukları: 4600bp & ~1600bp olarak beklenmektedir (Şekil 7) (fragment büyüklükleri Genetyx programı kullanılarak saptanmıştır).



Şekil 8. 1-5 nolu kolonilerden izole edilen plazmitlerin ScaI enzimi ile kesimi.

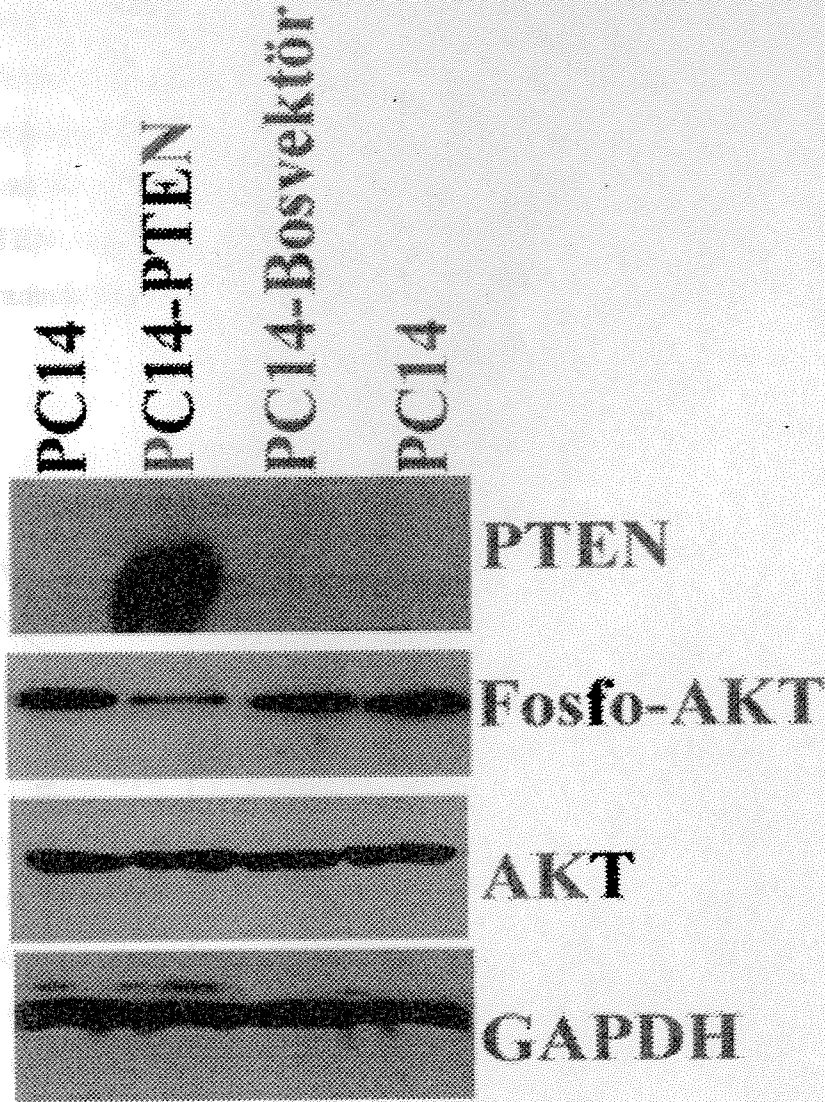
Buna göre 2, 4 ve 5 nolu kolonilerden izole ettiğimiz plazmitler 37 °C de 16 saat ScaI ile kesilmiştir. Bu kesim sonucu yapılan jel elektroforezi bize 4 nolu koloninin sens oryantasyonunda olduğunu dolayısı ile klonlamanın doğru olarak 4 nolu kolonide gerçekleştiğini göstermektedir (şekil 8).

Ekspresyon vektörünün hazırlanmasının ardından PTEN ekspres etmeyen PC14 hücrelerine lipozomal transfeksiyon kiti olan FugenHD kullanılarak PTEN cDNA taşıyan ekspresyon vektörü ve kontrol amaçlı boş vektör kalıcı transfeksiyon yöntemi ile aktarılmıştır. Transfeksiyondan 24 saat sonra plazmiti alan hücrelerin seleksiyonuna zeocin (400 mikrogram/ml) ile başlanmıştır. Transfeksiyondan 30 gün sonra PTEN ve boş vektör transfekte edilen hücrelerde kolonilerin oluşmaya başladığı transfeksiyon yapılmayan PC14 hücrelerinin ise ortamdan yok olduğu şekil 9'da görülmektedir.



Şekil 9. PC14, hücrelerinin gen transferi ardından seçimleri ve kolonilerin oluşması.

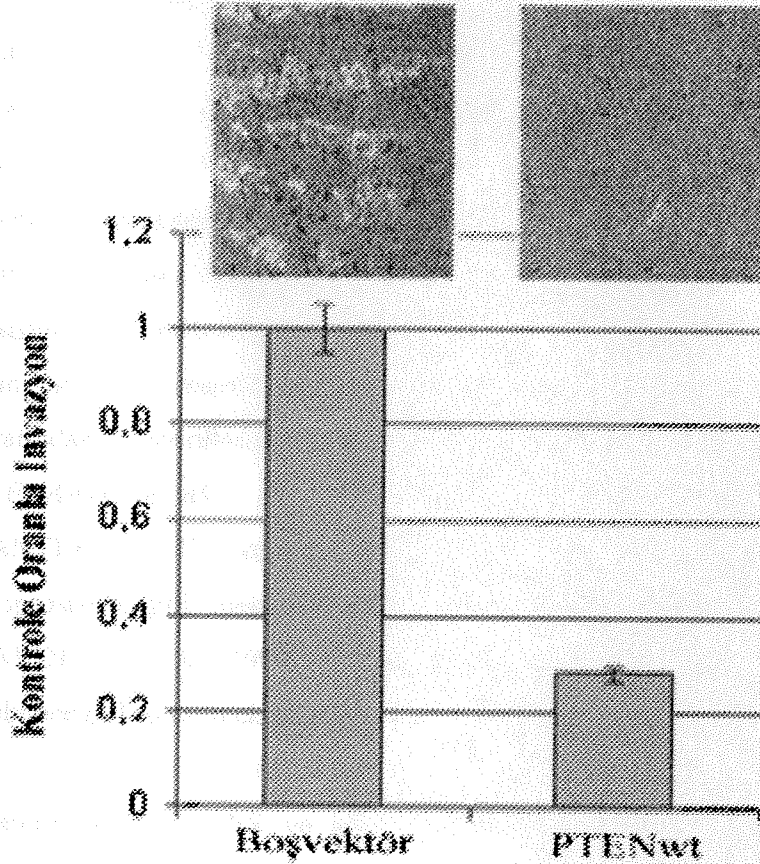
Koloniler yeteri kadar büyüyünce tripsin edilerek 6 well playtlere aktarılmış, ardından bu hücrelerin materyal ve metot bölümünde ayrıntılı olarak belirtildiği gibi protein örnekleri toplanmış ve PTEN eksprese edip etmedikleri Western blot yöntemi ile test edilmiştir. PTEN ekspresyonu doğrulanmış hücrelerin ayrıca fosfo-Akt ve Akt düzeyleride Western blot yöntemi ile araştırılmıştır. Şekil 10'da PC14 ve boş vektör transfekte edilen PC14 hücrelerinde PTEN ekspresyonu gözlenmezken PTEN cDNA'sı taşıyan ekspresyon vektörü ile transfekte edilen PC14 hücrelerinin PTEN ekspresyonu görülmektedir. Ayrıca sadece PTEN transfekte edilen hücrelerde PTEN ekspresyonunun fosfo-Akt seviyesini oldukça azalttığı da aynı şekilde görülmektedir (şekil 10).



Şekil 10. PTEN gen transferinden sonra PC14 hücrelerinin PTEN, Akt ve fosfo-Akt ekspresyon düzeyleri.

PTEN ekspresyonu gözlemlendikten sonra yeniden yaratılan PTEN ekspresyonunun hücre invazyonuna etkisi BD matrijel invazyon odacıkları kullanılarak gösterilmiştir. Çalışmamızda "growth faktör" azaltılmış invazyon odaları kullanılmıştır. Metot bölümünde ayrıntılı olarak anlatıldığı gibi PC14, boş vektör transfekte edilmiş PC14 ve kalıcı PTEN transfekte edilmiş PC14 hücreleri her invazyon odacığında $2,5 \times 10^4$ olacak şekilde % 0.1 BSA içeren serumsuz besi ortamı içerisinde ekilmiş, invazyon odacıklarının dışına ise kemoatraktan olarak %10 FCS içeren besi ortamı konulmuştur. Hücreler 24 saat CO₂ inkübatörde 37C de inkübe edildikten sonra invazyon odacığı içinde kalan (non-invaziv) hücreler cell scaper kullanılarak kazınarak uzaklaştırılmış, böylece invazyon odacığında sadece dış yüzeye geçmiş (invaziv) hücreler kalmıştır. Ardından invazyon odacığının dışına geçmiş hücreler metanol ile fiske edildikten

sonra toluidien blue ile boyanmış ve invaziv hücreler mikroskop altında görüntülenmiştir. İnvazyon yapan hücrelerin sayıları kontrol hücresi PC14'lerin invazyon sayılarına bölünerek kontrole oranla % invazyon değerleri bulunmuştur (şekil 11). Şekil 11'de görüldüğü gibi kontrole oranla, boş vektör transfekte edilmiş PC14'lerin invazyonu hemen hemen aynı iken PTEN kalıcı transfekte edilmiş hücrelerin invazyonları PTEN ekspresyonu sebebiyle %75 oranında baskılanmaktadır ($p < 0.001$).



Şekil 11. PTEN ekspres etmeyen PC14 hücrelerinde kalıcı transfeksiyon yöntemi ile yaratılan PTEN ekspresyonunun hücre invazyonuna etkisi ve invazyon odaklarındaki hücrelerin mikroskop altında görünümü.

Tartışma

Bu çalışmada, ilk olarak 14 farklı küçük hücre dışı akciğer kanseri (NSCLC) hücre dizilerinin standart kültür ortamında PTEN ekspresyonları western blot yöntemi ile araştırılmıştır (şekil 2). Buna göre, hücre dizilerinin yarısında PTEN ekspresyonunun ya çok fazla azaldığını ya da tamamen kaybolduğunu gördük. Bu sonucumuz literatür ile uyumludur, akciğer kanserlerinde PTEN ekspresyonunun yaklaşık %40 ila %50'sinde kaybolduğu bu kaybın ise kromozomal delesyon ile ya da PTEN promotör metillenmesi ile olduğu rapor edilmektedir (KOHNO ve ark. 1998; WIGLER ve ark. 1997). PTEN tümör baskılayıcı geni dual etkili bir fosfatazdır ve hem lipidleri hem de proteinleri defosforile edebilir (WENG ve ark., 2001). Bizim sonuçlarımıza göre yeniden yaratılan PTEN ekspresyonu invazyonu %75 oranında baskılamaktadır. Biz ayrıca yeniden yaratılan PTEN ekspresyonunun AKT fosforilasyonunu da oldukça azalttığını saptadık. Dolayısı ile PTEN'in invazyonu baskılayıcı etkisinin Akt inaktivasyonu üzerinden olması kuvvetle muhtemeldir. Bir Serin/Treonin kinaz olan Akt, PI3 kinazın downstream efektörüdür. Akt Treonin 308 ve Serin 473 den PI3-kinaz tarafından fosforillenerek tamamen aktifleşir (RODRIGUEZ-VICIANA ve ark., 1994; PLEIMAN ve ark., 1994; FRANKE ve ark., 1995; DUEK ve ark., 1997; TOKER ve CANTLEY 1997). Aktifleşmiş Akt anti-apoptotik molekül olarak bilinir ve PI3K/Akt yolunun apoptosisi çeşitli mekanizmalarla inhibe ettiği rapor edilmiştir (DATTA ve ark., 1999; KANDEL ve HAY 1999). Üstelik Akt aktivasyonunun metastatik davranışla doğrudan ilişkili olabileceği düşünülmektedir (NAKANISHI ve ark., 2002). Ozes ve ark. fosforillenmiş Akt'nin bir transkripsiyon faktörü olan NFkB'nin transkripsiyonel aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir (OZES ve ark., 1999). NFkB hücrelerin yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli bir faktördür ve çeşitli hedef genlerin ekspresyonunu indükleyerek invazyonu ve metastazı ilerletmesi mümkün olabilir. Örneğin, NFkB'nin kemokin reseptörünün ekspresyonunu indükleyerek kanser hücrelerinin migrasyonunu ve metastazını ilerlettiği rapor edilmiştir (SU ve ark., 1998). Ayrıca, PTEN'in malignant gliomalarda thrombospondin I ekspresyonunu ve angiogenezi düzenlediği de rapor edilmiştir (HELBIG ve ark., 2003). Angienez ve metastaz arasında bir ilişki olduğu bilindiğine göre PTEN'in angiogenezi düzenleyerek metastazı kontrol etmesi muhtemeldir. PTEN, Akt aktivitesini engelleyerek NFkB aktivitesini de inhibe edebilmektedir (GUSTIN ve ark., 2001). NFkB hücre yaşamı için gerekli bir transkripsiyonel faktördür, kanser hücreleri metastaz yapmak için çeşitli genlerin ekspresyonuna ihtiyaç duyarlar bu sebeple ihtiyaç duyulan genlerin transkripsiyonlarını aktifleştirecek bir transkripsiyon faktörüne ihtiyaç olması muhtemeldir, literatürde PI3K-Akt-

NFkB yoluğı ve bu yoluğı kontrol eden PTEN'in metastazdaki rolü üzerinde bir çalışmaya rastlanmamıştır. PTEN'in NFkB aktivasyonunda önemli bir yolak olan PI3K-Akt-NFkB yolunu PI3-kinazi inaktifleştirmek yoluyla inhibe etmesi muhtemeldir.

Bizim bulgularımıza göre PTEN ekspresyonu hücre için önemli bir yolak olan Akt yoluğını inaktive ederek hücre invazyonunu baskılamaktadır. Nakanishi ve ark. Akt aktivitesinin inhibe edilmesiyle kanser hücrelerinin soft agarda koloni oluşturma yeteneklerinde azalma olduğunu rapor etmişlerdir (NAKANISHI ve ark. 2002), bu sonuç bizim bulgularımızı destekler niteliktedir çünkü, soft agarda koloni oluşturma yeteneğinin baskılanması kanser hücre malignant özelliğinin baskılandığına işaret eder. Bu sebeple, yukarıda yer alan tüm gözlemlerin ışığında PTEN, PI3K, Akt, NFkB ve metastaz arasında bir ilişki olabileceği kuvvetle muhtemeldir.

PTEN'in lipid fosfataz aktivitesine ek olarak bir de protein fosfataz aktivitesi mevcuttur (TANURA ve ark., 1998). PTEN'in lipid fosfataz aktivitesini için nasıl inositol lipidler (PtdIns-3,4,5-P₃ ve PtdIns-3,4-P₂) PTEN için ana hedef ise protein fosfataz aktivitesi için ana hedef FAK (Fokal Adezyon Kinaz) dır (TANURA ve ark., 1998). Bizim alışmamızda yeniden yaratılan PTEN ekspresyonunun FAK fosforilasyonuna etkisinin de araştırılması gerekmektedir. Çünkü, PTEN in hücre invazyonunu baskılayabileceği iki potansiyel hedefi bulunmaktadır. Bunlardan birisi PI3K-Akt-NFkB yoluğı diğerisi FAK yoluğıdır. Dolayısı ile, FAK kinaz fosforilasyonuna PTEN ekspresyonunun etkisinin de araştırılmasının önemli olduğunu düşünmekteyiz, ayrıca Akt aktivasyon kaybının NFkB aktivitesini engellediği düşünöldüğünde araştırmalara NFkB aktivitesi ve bu nüklear faktörün hedeflerinin de eklenmesi gerekmektedir. En son adım olarakta yarattığımız PTEN ekspres eden hücrelerin nude micelerin akciğer loblarından birine enjekte edilerek *in vivo* koşuşlarda PTEN'in metastaza etkisinin araştırılması da bu çalışmayı takiben araştırılması gerekli konulardan birisidir.

Bu değindiğimiz noktaları hedefleyen ve çalışmamızın devamı niteliğindeki proje teklifimizin yazımı başlamıştır ve Mayıs 2008 döneminde TÜBİTAK'a destek için başvuru yapması planlanmaktadır.

Referanslar

- CHAMBERS A.F., Tuck A.B., Ras-responsive genes and tumor metastasis, *Crit Rev Oncog*, 4, 95-114, (1993).
- DATTA S.R., Brunet A., and Greenberg M.E., Cellular survival a play in three Akts, *Genes Dev.*, 13 2905-2927, (1999).
- DÌ CRÌSTOFANO A., Pesce B., Cordon Cardo C., and Pandolfi P.P., Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat. Genet.*, 19, 348-355, (1998).
- DUEK H., Datta S.R., Franke T.F., Birnbaum M.J., Yao R., Cooper G.M., Segal R.A., Kaplan D.R., and Greenberg M.E., Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt, *Science*, 275, 661-665 (1997).
- FEARON E.R., Vogelstein B., A genetic model for colorectal tumorigenesis, *Cell*, 61: 759-767, (1990).
- FRANKE T.F., Yang S.I., Chan T.O., Datta K., Kazlauskas A., Morrison D.K., Kaplan D.R., and Tschlis P.N., The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase, *Cell*, 81: 727-736 (1995).
- HELBIG G., CHRISTOPHERSON K.W., et al., NF- κ B Promotes Breast Cancer Cell Migration and Metastasis by Inducing the Expression of the Chemokine Receptor CXCR4, *J. Biol. Chem.*, 278, 21631 – 21638 (2003).
- GUSTIN J.A., Maehama T., Dixon J.E., Donner D.B., The PTEN tumor suppressor protein inhibits tumor necrosis factor-induced nuclear factor kappa B activity, *J Biol Chem.*, 276(29), 27740-4 (2001).
- KANDEL E.S., and Hay N., The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB, *Exp. Cell Res.*, 253, 210-229, (1999).
- KOHNO T., Takahashi M., Manda R., Yokota J., Inactivation of the PTEN/MMAC1/TEPI gene in human lung cancers, *Gnes, Chromosomes & Cancer*, 22, 152-156, (1998).
- LIAW D., Marsh D.J., Dahia P.L., Wang S.I., et al., Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome, *Nat. Genet.*, 16, 64-67, (1997).
- MAEHAMA T., and Dixon J.E., The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, *J. Biol. Chem.*, 273, 13375-13378 (1998).
- MAIER D., Zhang Z., Taylor E., Hamou M.F., Gratzl O., Van Meir E.G., Scott R. J., and Merlo A., Somatic deletion mapping on chromosome 10 and sequence analysis of

- PTEN/MMAC1 point to the 10q25-26 region as the primary target in low-grade and high-grade gliomas, *Oncogene*, 16, 3331-3335 (1998).
- MUSCHEL R, Liotta L.A., Role of oncogenes in metastases. *Carcinogenesis*, 9, 715-710 (1988).
- MYERS M. P., Pass I., Batty I. H., Van der Kaay J., Stolarov J. P., Hemmings B. A., Wigler M.H., Downes C.P., and Tonks N.P., The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13513-13518 (1998).
- NAKANISHI K., Sakamoto M., Yasuda J., Takamura M., Fujita N., Tsuruo T., Todo S., and Hirohashi S., Critical Involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in anchorage-independent growth and hematogeneous intrahepatic metastasis of liver cancer, *Cancer Research*, 62: 2971-2975 (2002).
- NICOLSON G.L., Quantitative variations in gene expression: possible role in cellular diversification and tumor progression, *J Cell Biochem*, 46, 227-283 (1991).
- NICOLSON G.L., Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites, *Biochim. Biophys. Acta*, 948, 175-224 (1988).
- OZES O.N., Mayo L.D., Gustin J.A., Pfeffer S.R., Pfeffer L.M., Donner D.B., NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase, *Nature*, 401(6748), 82-5 (1999).
- PLEIMAN C.M., Hertz W.M., and Cambier J.C., Activation of phosphatidylinositol-3' kinase by Src-family kinase SH3 binding to the p85 subunit, *Science*, 263, 1609-1612, (1994).
- PODSYPANINA K., Ellenson L.H., Nemes A., Gu J., Tamura M., Yamada K.M., Cordon-Cardo C., Cattoretti G., Fisher P.E., and Parsons R., Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96, 1563-1568, (1999).
- RODRIGUEZ-VICIANA P., Warne P.H., Dhand R., Vanhaesebroeck B., Gout I., Fry M.J., Waterfield M.D., and Downward J., Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras, *Nature*, 370, 527-532 (1994).
- SAHA S., Bardelli A., Buckhaults P., et al., A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer, *Science*, 294, 1343-1346, (2001).
- STAMBOLIC V., Suzuki A., de la Pompa J.L., Brother G. M., Mirtsos C., Sasaki T., Ruland J., Penninger J.M., Siderovski D.P., and Mak T.W., Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN, *Cell*, 95, 29-39 (1998).

- STECK P. A., Pershouse M. A., Jasser S. A., Yng W. K., Lin H., Ligon A.H., Langford L.A., Baumgard M.L., Hattier T., Davis T., Frye C., Hu R., Swedlund B., Teng D.H., and Tavtigian S.V., 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).
- SU JD, Mayo LD, Donner DB, Durden DL., PTEN and phosphatidylinositol 3'-kinase inhibitors up-regulate p53 and block tumor-induced angiogenesis: evidence for an effect on the tumor and endothelial compartment, *Cancer Res*, 63(13), 3585-92 (1998).
- SUZUKI A., de la Pompa J. L., Stambolic V., Elia A. J., Sasaki T., Del Barco Barrantes I., Ho A., Wakeham A., Itie A., Khoo W., Fukumoto M., and Mak T. W., High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice, *Curr. Biol.*, 8, 1169-1178 (1998).
- TANURA M., Matsumoto K., Aota S., Parsons R., and Yamada K.M., Inhibition of cell migration, spreading and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science*, 280,1614-1617, (1998).
- TOH Y., Pencil S.D., Nicolson G.L., A noval candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines, *J. Biol. Chem.*, 269, 22958-22963(1994).
- TOKER A., and Cantley L.C., Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3iOH kinase, *Nature*, 387, 673-676 (1997).
- WENG L.P., Brown J.L., Eng C., PTEN coordinates G(1) arrest by down-regulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model, *Hum Mol Genet.*,10(6):599-604, (2001).
- WIGLER M.H., and Parsons R., PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer, *Science*, 275, 1943-1947, (1997).

TÜBİTAK

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

| |
|--|
| Proje No: 106S347 |
| Proje Başlığı: Tümör Baskılayıcı Gen PTEN Ekspresyonunun Akciğer Kanseri Metastazına Olası Baskılayıcı Etkisinin Araştırılması |
| Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Doç.Dr.Hakan AKÇA Aydın DEMİRAY |
| Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD, Kınıklı kampüsü/Denizli |
| Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu Atatürk Bulvarı No: 221, 06100 Kavaklıdere / ANKARA |
| Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01/03/2007—01/03/2008 |
| Öz (en çok 70 kelime) Akciğer kanseri dünya genelinde kanser sebepli ölümlerin başında gelmektedir. Kanserden kaynaklanan ölümlerin sebebi ise bilindiği üzere kanserin metastazıdır. Kanser konusunda yapılan birçok araştırmaya rağmen özellikle kanser metastazının moleküler mekanizmaları üzerine bilgilerimiz oldukça sınırlıdır ve metastazı kontrol eden genlerin bulunması hedefe yönelik tedavi yaklaşımına oldukça fayda getireceği şüphesizdir. Akciğer kanserlerinde PTEN gen inaktivasyonunun oldukça sık gerçekleştiğini saptadığımız için biz bu çalışmada PTEN tümör baskılayıcı genini ökaryotik ekspresyon vektörüne klonlayarak, PTEN ekspresyon kaybı olan küçük hücre dışı akciğer kanseri PC14'e kalıcı transfeksiyon yöntemi ile aktarıldı ve yeniden yaratılan PTEN ekspresyonunun hücre invazyonu engellediği matri jel invazyon odacığı kullanılarak gösterildi. Dolayısı ile bir tümör baskılayıcı gen olan PTEN'in hücre invazyonunu da kontrol ettiği bu çalışma ile gösterilmektedir. |
| Anahtar Kelimeler: Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri, PTEN, İnvazyon |
| Projeden Yapılan Yayınlar: Sonuçlarımız II. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumunda Poster Bildirisi olarak sunulmuş ve "En iyi poster bildiri ödülü almıştır" II. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu, 24-27 Şubat 2008 Uludağ, Bursa |