



T.C.
ORTA DOĞU TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

**Hekzokinaz II proteininin prostat kanseri hücre hatlarındaki ekspresyonunun
antidiyabet ve antikanser ilaç kombinasyonlarına bağlı değişimi**

Proje No:
GAP-108-2018-2754

Proje Türü
G. Araştırma

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Orhan ADALI
Fen Edebiyat Fakültesi/Biyolojik Bilimler Bölümü

Araştırmacıların Adı Soyadı
Birimi/Bölümü
Prof. Dr. Nülüfer Tülün Güray/ Biyolojik Bilimler Bölümü
Arş. Gör. Emre Evin/ Biyolojik Bilimler Bölümü
Arş. Gör. Merve Akkulak/ Biyolojik Bilimler Bölümü
Doktora Öğrencisi Özlem Durukan/FBE Biyokimya ABD

Mayıs/2019

ANKARA

ÖNSÖZ

Prostat kanseri, erkeklerde en sık görülen kanser olup, yine erkeklerde akciğer kanserinden sonra en sık ölüme neden olan kanserdir. Birçok olgunun tedavisi cerrahi müdahale, radyoterapi, hormon tedavisi ya da kemoterapinin bir kombinasyonunu içerebilir. Ancak bu tedaviler, hastaların yaşam kalitesini düşürecek ciddi yan etkilere veya dirençli prostat kanseri vakalarının oluşumuna neden olmaktadır. Bu durum prostat kanseri tedavisinde yeni ve daha etkil tedavi metodlarının araştırılması ile ilgili çalışmaları önemli kılmaktadır. Son yıllarda prostat kanseri insidansı artarken, ölüm oranı azalmaktadır. Bunun nedeni de, erken tanı olanaklarının artmasının yanısıra yeni bulunan tedavi ajanları ile sağkalımın uzamasıdır. Bu bilgiler doğrultusunda, tasarlanan çalışmada antidiyabetik ilaç metforminin yeni anlaşılan antikanserojen etkisi göz önünde bulundurularak, sıklıkla kullanılan cisplatin kemoterapötik ilacının kombine tedavisinin kanser hücrelerinin proliferasyonu ve temel enerji kaynağı glikoliz yolağını düzenleyen hız kesici enzim olan Hekzokinaz II enziminin protein ekspresyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Yüzyılımızın korkutucu hastalığı olan kanserin tedavisinde, diyabet temelli ilaçların, kemoterapötik ilaçlar ile kombine kullanımı ilaç toksisitesini indirmek ve kemoterapötik tedavinin maliyetini düşürmek açısından faydalı olacağını düşündürmektedir . Bu çalışma Orta Doğu Teknik Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından, GAP-108-2018-2754 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir. Bu çalışmaya desteklerinden dolayı Orta Doğu Teknik Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimizi iletiriz.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
ŞEKİL LİSTESİ.....	iii
TABLO LİSTESİ.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. Giriş ve Genel Bilgiler.....	1
2. Gereç ve Yöntem.....	3
2.1 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	3
2.1.1 Hücrelerin Büyütülmesi.....	3
2.1.2 İlaç Uygulamaları.....	3
2.1.3 Hücrelerden Protein Ekstraksiyonu.....	3
2.2 Hekzokinaz II enziminin Protein Ekspresyonunun Western Blot Tekniği ile incelenmesi.....	4
2.3 İstatistiksel Analizler.....	6
3. Bulgular ve Tartışma/Sonuç.....	6
3.1 İlaç kombinasyonunun Proliferasyonu Üzerine Etkileri.....	7
3.2 İlaç Kombinasyonunun HK II Protein ekspresyonu Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	10
3.2.1 Protein Extraksiyonu.....	10
3.2.2 Protein Miktar Tayini.....	11
3.2.3 Hekzokinaz II enziminin Protein Düzeyinde Ekspresyon Tayini	12
4. Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	14
5. Referanslar.....	15

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Western blot transfer sandviçi.....	5
Şekil 3.1. Cisplatin ile muamele edilen PC3 hücre hatlarının proliferasyon grafiği.....	8
Şekil 3.2. Cisplatin ile muamele edilen PC3 hücre hatlarının sağ kalım grafiği.....	8
Şekil 3.3. Cisplatin metformin kombinasyonunun PC3 hücre hattı proliferasyonu üzerine etkisi.....	10
Şekil 3.4: Kontrol ve ilaç kombinasyonu kullanılmış PC3 hücre hattında Hekzokinaz II protein ekspresyonunu gösteren immünoreaktif protein bant fotoğrafları.....	13
Şekil 3.5: Kontrol ve ilaç kombinasyonu kullanılmış PC3 hücre hattında Hekzokinaz II protein ekspresyonunun istatistiki olarak incelenmesi.....	13

TABLO LİSTESİ

Tablo. 2.1 SDS-PAJE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları.....	5
Tablo 3.1. PC3 hücre hattında hesaplanan Alamar Blue indirgenme yüzdesi ve hücrelerin sağ kalım yüzde değerleri.....	7
Tablo 3.2. PC3 hücre hattında hesaplanan Alamar Blue indirgenme yüzdesi ve hücrelerin sağ kalım yüzde değerleri.....	9
Tablo 3.3: PC3 hücre halarından elde edilen ortalama protein konsantrasyonları.....	12

ÖZET

Prostat kanseri, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde en sık görülen kanser türlerinden biri olup günümüzde prostat kanseri tedavisindeki yaklaşımlar metastaz gelişimine, ilaç direnci oluşmasına ve sağlıklı dokularda toksik etkilere sebep olabilmektedir. Bu nedenle tedavide daha etkili ancak daha az yan etkiye sahip kanser önleyici molekülleri tespit etmek kanser araştırmalarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır.

Cisplatin prostat kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan antineoplastik bir ajandır. Ancak, cisplatinin yüksek etki derecesine karşın yan etkileri ilacın kullanımını kısıtlamaktadır. Bu yan etkilerini azaltmak amacıyla başka ajanlar ile kombine terapiler son yıllarda bilim insanlarının ilgi odağı olmuştur. Antidiyabetik ilaç metforminin anti-proliferatif etkisi göz önünde bulundurulduğunda, antineoplastik ajan cisplatin ile tamamlayıcı bir tedavi sunabileceği açıktır. Bilindiği üzere, kanser hücreleri, hücre içerisine bol miktarda glikoz almaları ve kullanmaları sayesinde nükleozidlerin ve aminoasitlerin üretimine katkıda bulunmakta ve enerji üretimi ve hücre bölünmesi için çok hızlı bir yol oluşturmaktadırlar. Bu doğrultuda, kanser tedavisi sırasında hücresel glikoz metabolizmasını hedefleyen tedavilerin kullanılması kanser hücrelerinin geliştirdikleri bu mekanizmayı alt ederek hücre büyümesini azaltabilecek niteliktedir.

Yukarıda belirtilen bilgiler göz önüne alındığında, tasarlanan çalışma kanser tedavisinde kullanılan cisplatin ilacına kombine olarak antidiyabetik bir ilaç olan metforminin kullanımının prostat ücre hatlarının proliferasyonu üzerine etkilerinin incelenerek, bu etkilerin glikoliz metabolizmasının en önemli regülatörü olarak bilinen Hekzokinaz II enziminin hücre içi total protein ekspresyonunun değişimi ile ilişkilendirildiği bir çalışmadır.

Yapılan çalışmada, insan prostat kanseri hücre hattı kullanılmıştır. İlaçların hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri "alamar blue" analizi ile ölçülmüş olup, ilaç kombinasyonunun Hekzokinaz enziminin protein ekspresyonu üzerine etkisi Western-blot tekniği ile tespit edilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, cisplatin-metformin ilaç kombinasyonunun kullanılan metformin dozuna bağlı olarak prostat hücre hatlarının proliferasyonunu anlamlı bir şekilde düşürdüğü ve bu durumla paralel olarak Hekzokinaz II enziminin protein ekspresyonunu düşürdüğü saptanmıştır. Tasarlanan çalışmanın sonuçları proje başlangıcında kurduğumuz hipotezi doğrular niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Metformin, cisplatin, Hekzokinaz II, prostat kanseri

ABSTRACT

Prostate cancer is the most commonly seen cancer type both in developed and developing countries. Current therapeutic approaches for prostate cancer generally have variable side effects. Hence, the searching for more effective strategies remains one of the important issues in cancer research.

Cisplatin, an antineoplastic agent, is widely used in the treatment of prostate cancer. Despite the high efficiency of cisplatin on prostate cancer treatment side effects restricts the use of cisplatin. In order to reduce the side effects of cisplatin, combination therapy with other agents has been the focus of scientists in recent years. Considering the inducer effect of antidiabetic drug metformin with antineoplastic agent cisplatin can provide a complementary treatment. According to usual knowledge, cancer cells uptake and utilize high amount of glucose. By this manner, cancer cells quickly synthesize energy, vital nucleotides and aminoacids. This situation gives them a good survival mechanism, therefore enhance their rapid growth. By this manner, using agents that directly targets glycolysis metabolism of cancer cells can be a good drug candidates which alters this mechanism and reduce proliferation of cancer cells.

According to informations mentioned above, this study investigates the adjuvant role of antidiabetic drug metformin in combination with antitumor drug cisplatin on prostate cancer cell proliferation and comparison of these antiproliferating effect with protein expressions of major regulatory enzyme of glycolysis, Hexokinase II. For this study, human prostate cancer cell line was used. Dose response and cytotoxic effect of combination treatment were measured by Alamar Blue assay. Also, effects of drugs on Hexokinase II protein expressions were investigated by using Western-Blot technique. As a result of this study, Cisplatin-metformin drug combinations shows significant decline on prostate cancer cell proliferation in a dose dependent manner. In parallel with this finding, Hexokinase II protein expressions were significantly downregulated. According to these results, it can be suggested that, this projects results directly fit with our prediction at the beginning of this study.

Keywords: Metformin, cisplatin, Hexokinase II, prostate cancer

1. Giriş ve Genel Bilgiler

Prostat kanseri erkekler arasında en sık görülen kötü huylu tümör olup gelişmiş ülkelerde ölümle sonuçlanan hastalıklar arasında 3. sırada yer almaktadır (Waltering ve ark., 2009). Normal bir prostat dokusunda sinyal yolağı androjen tarafından düzenlenmekte olup salgı bezindeki hücrelerde büyüme ve apoptoz arasında bir denge bulunmaktadır (Heinlein ve Chang, 2004). Kanserli dokuda ise bu denge kaybolmuş olup androjen ekspresyonundaki artıştan dolayı salgı bezlerindeki hücrelerde hızlı bir artış meydana gelmekte ve prostatta büyüme meydana gelerek sonuçta prostat kanserine neden olmaktadır (Rittmaster, 2008). Prostat kanserinin ilk dönemlerinde tedavi amacıyla uygulanan androjen çıkartma işlemleri androjen bağımlı kanser türlerinde etkili olmakla beraber hastalarda infertilite gibi hayat standardını düşüren birtakım komplikasyonlara neden olmaktadır. Bu yüzden hastalık seyrini değiştirecek az yan etkiye sahip ilaç analoglarının bulunması gerekmektedir. Bu sebepler doğrultusunda tasarlanan çalışmada prostat hücre hatlarından androjen reseptörüne bağımlı olan PC-3 hücre hattı kullanılacaktır.

Erkeklerde abdominal obezite ve bel/kalça oranı artışının prostat kanseri için bir risk faktörü olduğu bildirilmektedir. Özellikle yayılmaya (metastaz) meyilli prostat tümörlerinde obezite daha da risk taşımaktadır. Obezite; vücutta depolanan yağ miktarının artmasına, uzun süreli enerji dengesizliğine (alınan enerjinin harcanan enerjiden fazla olması) ve kanda dolaşan serbest yağ asidi miktarının artmasına neden olmaktadır. Bu da insülin rezistansının gelişmesine neden olur. İnsülin resistansı ise diyabet, kalp hastalıkları ve çeşitli kanser türleri ile yakından ilişkilidir. Kandaki insülin seviyesinin çeşitli kanser türleri ile bir bağlantısının olduğu bilinmektedir (Schernhammer, E.S., ve ark, 2005). Bu çalışmalar, anti-diabetik ilaçların kanser tedavilerinde kullanılabildiğini mümkün kılmaktadır.

Cisplatin hücresel bölünmeyi ve gelişmeyi engelleyen (antineoplastik) bir ilaçtır. Cisplatin gibi kemoterapötik ajanlar kanser hücrelerinin çoğalmasına engel olarak, vücuttaki gelişimlerini ve yayılımlarını yavaşlatarak çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Bunların toksisiteleri ve taşıdıkları minör riskler tedavide gösterdikleri potansiyel yararlılık düşünüldüğünde sıklıkla göz ardı edilir (Esra A. ve ark., 1999). Cisplatin testis, over, mesane karsinomaları gibi karsinomaların tedavilerinde kullanılan bir kemoterapötiktir. Yüksek seviyede antitümörük özelliğine karşın nefrotoksisite, nörotoksisite ve gastrointestinal irritabilite gibi etkilerinin yanında cisplatin tedavisi alan üreme çağındaki

erkeklerde oligospermi, azospermi ve infertilite gelişmesi önemli bir yan etkidir (Pogach L.M. ve ark., 1989). Cisplatinin yan etkileri göz önünde bulundurulduğunda hastanın sosyolojik ve psikolojik olarak tedaviden minimum seviyede zarar görmesini sağlayacak yeni yöntemlerin keşfedilmesi önemli bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Bu proje kapsamında yapılması tasarlanan çalışmada Tip2 diyabet ilacı olan metformin ve kanser tedavilerinde sıklıkla kullanılan cisplatin ilacının kombine tedavisinin, hücre proliferasyonunu azaltması planlanmaktadır.

Tasarlanan çalışmada bu iki ilacın kombine kullanımının glikoliz yolağının en önemli modülatörlerinden biri olan heksokinaz II enzimi üzerine etkileri incelenecektir. Bu doğrultuda androjen reseptörü bağımlı prostat kanseri hücre hattı kullanılacak olup, metformin ve cisplatin ilaçlarının kanser hücre proliferasyonu üzerine etkileri Alamar Blue tekniği ile incelenecektir. Hücre hattından elde edilecek total hücre lizatları ile ilaçların heksokinaz II protein ekspresyonu üzerine etkileri tayin edilecektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Hücre Kültürü Çalışmaları

2.1.1 Hücrelerin Büyütülmesi

Proje kapsamında çalışmaların ilk bölümünü hücre kültürü çalışmaları oluşturacaktır. Prostat kanser hücrelerinden androjen reseptörüne bağımlı PC3 hücre hattı ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD) firmasından satın alınacaktır. PC-3 hücre hattı 10% FBS (fetal sıgır serumu) ve 1% glutamin içeren Ham's F-32 büyüme ortamında 37 °C ve 5 % CO₂ büyütülecektir. Büyüme ortamları aynı zamanda bu ilaçların seyreltilmesinde de kullanılacaktır. T-75 büyüme kaplarında çoğalan hücreler 10 mM fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra hücreler tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak büyüme kaplarından ayrılacak ve ilaç muamelesi için 6 veya 24 kuyucuklu büyüme plakalarına aktarılacaktır.

2.1.2 İlaç Uygulamaları

Hücre hatları uygun büyüme ortamları içersinde büyütüldükten sonra hücre proliferasyonunu gözlemlemek amacı ile tripsin-EDTA solüsyonu yardımıyla T-75 büyüme kaplarından alınarak 24 kuyucuklu büyüme plaklarına her kuyucukta 3×10^4 hücre olacak şekilde aktarılacak ve 24 saatlik bir inkübasyondan sonra hücrelerin bulunduğu kuyucuklara farklı konsantrasyonlarda cisplatin eklenecek ve bu ilacın hücre büyümesi üzerine olan etkisi saplanarak % 50 hücre büyümesini engelleyen ilaç konsantrasyonu (IC₅₀) hesaplanacaktır. Cisplatin'in IC₅₀ değerleri belirlendikten sonra hücrelere farklı konsantrasyonlarda metformin uygulaması yapılacaktır. Böylece ilaçların birlikte ve ayrı ayrı hücreler üzerine etkisi saptanmış olacaktır. İlaçların hücreler üzerine genotoksik etkisi Alamar blue kiti kullanarak saptanacaktır.

2.1.3 Hücrelerden Protein Ekstraksiyonu

Hücre hatları, 100 x 20 mm'lik doku kültürü petri kaplarına, petri kabı başına 2.000.000 hücre kaplama yoğunluğunda ekilecek, hücreler %80 yoğunluğa ulaşınca büyüme ortamları aspire edilecek ve cisplatin ve metforminin belirlenen konsantrasyonlarında muamele edilecektir. 2 gün sonunda hücreler soğuk fosfat tamponu ile 3 defa yıkanacaktır. Daha sonra hücreleri plakalardan kaldırmak için 2ml fosfat tamponu eklenecek ve petriler buz üzerinde 5dk inkübe edilecektir. Kazıyıcı yardımı ile kalkan hücreler toplanarak eppendorf tüplere aktarılacaktır. Hücreler 14000 x g'de 10 dakika süreyle santrifüje tabi tutulacak ve pelletlerle devam edilecektir. Piyasada bulunan 10X RIPA tamponunun (Cell Signaling Technology) su yardımı ile 1x RIPA tamponu oluşturacak şekilde dilüe edilecektir ve 1 mM fenilmetansülfonil fluorür (PMSF) proteaz etkinliğinin önlenmesi için ilave edilecektir. Her bir gruba 400 uL seyreltilmiş RIPA tamponu ilave edilecek ve hücrelerin lizisi için pipetle iyice karıştırılacaktır. Elde edilen hücre lizatları, 5 dakika buz üzerinde inkübe edilecek ve 4 dakika süreyle sonike edilecektir. Sonikasyona uğramış hücre lizatları 14000 x g'de 10 dakika süreyle soğuk bir mikrofüjde tekrar santrifüje tabi tutulacak, süpernatantlar yeni eppendorf tüplere aktarılacak ve -80°C dondurucuda saklanacaktır.

Hücre kültürü lizatlarının protein konsantrasyonları, standart olarak kristalize sıgır serum albüminini kullanarak BCA (Bicinchoninic Acid) yöntemi ile belirlenecektir (P.K. Smith,

1985). Bu yöntem alkalik koşullar altında peptid bağlarıyla Cu^{2+} iyonlarının indirgenmesine ve her iki Cu^{+} iyonu ile iki moleküllü bichinchoninik asitin şelasyonuna bağlı olarak oluşan mor rengin 562 nm'lik bir dalga boyunda verdiği absorbansın ölçülmesi esasına dayanmaktadır. BCA solüsyonu aşağıda verilen direktifler doğrultusunda hazırlanacaktır.

Solüsyon A:

0.4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 mL dH_2O içinde çözülecektir.

Solüsyon B:

8 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ve 1.6 g $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$, dH_2O ile çözünecek ve pH 11.25 olan NaHCO_3 ile titre edilecektir. Toplam hacim dH_2O ile 100 mL'ye tamamlanacaktır. Çözeltinin pH değeri sonunda kontrol edilecek.

Solüsyon C:

4g Bichinchoninic Acid 100ml suda çözünecektir.

BCA Solüsyonunun hazırlanması:

Solüsyon A, B ve C 1:25:25 oranında verilen sıra ile karıştırılacaktır. Protein konsantrasyonunun tayini için standart eğri oluşturulacaktır. Bu amaçla bovine albumin serum (BSA) kullanılarak, 0.02, 0.05, 0.075, 0.1, 0.15, 0.2 mg/mL olacak şekilde seyreltilmiş standartlar hazırlanacaktır.

Protein lizatları 40 kat dilüe edilecektir. Daha sonra sırasıyla, standartlar ve protein konsantrasyonunu ölçmek istediğimiz örnekler 96 kuyucuklu büyüme kaplarına 100 µl hacimlerde ekleneceklerdir. Hazırlanan örneklerin üzerine 100 µl hazırlanan BCA karışımı ilave edilecek ve 60°C'de 15dk inkübe edilecektir. Örneklerin absorbansı 562nm'de Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer kullanılarak ölçülecektir. Protein konsantrasyonu aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanacaktır.

Protein Konsantrasyonu (mg/ml) = [[OD560nm] / standartların eğimi] x seyreltme faktörü

2.2 Hekzokinaz II protein ekspresyonunun Western Blot tekniği ile incelenmesi

Hücre hatlarından elde edilen proteinlerin Hexokinaz II ekspresyonları Laemmli (1970) tarafından belirlenen metoda göre dikey elektroforez tekniği uygulanarak SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforez (SDS-PAJE) yöntemi ile ayrıştırılacak ve protein profilleri elde edilecektir. Hekzokinaz II protein ekspresyonunun tayini için Hekzokinaz II monoklonal primer antikor ve anti-mouse sekonder antikor kullanılarak Western Blot tekniği ile protein düzeyleri immunolojik olarak tayin edilecektir.

Poliakrilamit jel elektroforezi (PAJE) iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS), varlığında Laemmli (1970) tarafından tanımlanmış olan kesintili bir tampon sisteminde %8,5 ayırma ve %4 sıkıştırma jellerinde yapılacaktır. Ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonları Tablo 2.1'de belirtildiği gibi verilen miktarların karıştırılması ile verilen sırayla kullanımdan hemen önce hazırlanacaktır.

Tablo. 2.1 SDS-PAJE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları.

Stok Çözeltiler	Ayrıştırıcı Jel (%8,5)	Sıkıştırıcı Jel (%4)
Jel Çözeltisi(ml)	8.5	1.5
Distile Su (ml)	13.55	5.88
Ayrıştırıcı Jel Tamponu	7.5	-
Sıkıştırıcı Jel Tamponu	-	2.5
%10 SDS (ml)	0.4	0.16
%10 APS (ml)	0.15	0.065
TEMED (ml)	0.015	0.012

Poliakrilamit slab jelleri, jel sandviçinin hazırlanması ile Mini-PROTEAN tetra cell mini trans blot module (Bio-Rad, Richmond, CA) elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilecektir. Elektroforetik ayrıştırma sistemi güç kaynağına bağlanacak (sıkıştırıcı jelde 20mA' lik akım, ayrıştırıcı jelde 30 mA'lik akım uygulanır) ve yol gösterici boya tabana ulaşacağı zaman güç kaynağı kapatılacaktır. Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel bloğu aparattan alınır ve jel sandviçten çıkarılarak oda sıcaklığında transfer tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin ve % 10 metanol) içerisinde 10 dakika süreyle sabit hızlı bir çalkalayıcıda inkübasyona bırakılacaktır. Elektroforetik transfer BioRad Mini-PROTEAN® Tetra System ile transfer yöntemi uygulanarak yapılacaktır. Bu aşamada, PVDF membran, whatman filtre kağıtları, jel ve fiber pedler şekil 2.1'de belirtildiği gibi transfer sandviğine yerleştirileceklerdir. PVDF membran jelin üzerine konulmadan önce 45 saniye methanolde inkübasyona bırakılacaktır. Hava kabarcıklarının tamamen uzaklaştırılmasını sağlamak için membranı kendi pozisyonunda sabit tutarken bir deney tüpü nazikçe üzerinde yuvarlanacaktır. Sandviç hazırlandıktan sonra aparat dikkatlice kapatılacaktır. Bu aparat transfer tamponu ile birlikte transfer sistemine yerleştirilecektir. Elektroforetik transfer sistemi BioRad PowerPac Basic güç kaynağına bağlanacak ve 90 volt sabit voltajda 90 dakika süresince proteinler elektroforetik olarak transfer edilecektir. Süre sonunda güç kaynağı kapatılacak ve transfer aparatı açılacaktır. Sonuç olarak üzerinde transfer edilmiş proteinleri barındıran membran, 'Blot', elde edilecektir.



Şekil 2.1: Western blot transfer sandviçi.

Transfer tamamlandıktan sonra transferin ne derecede gerçekleştiğinden ve her bir kuyucuğa eşit miktarda yükleme yapıldığından emin olmak için membran (blot) 5 dakika süreyle Ponceau S boyası ile plastik bir kaptaki çalkalayıcıda inkübasyona bırakılacak ve membran görüntülenecektir. İnkübasyondan sonra, 0.1M NaOH ile 1 dakika süreyle yıkanarak boya membrandan uzaklaştırılacaktır. Daha sonra, blot 1 saat süreyle bloke çözeltisi ile [TBST (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 500 mM NaCl, 0.05% Tween 20) içinde yağsız % 5'lik süt tozu] çalkalayıcıda inkübe edilecektir. Süre sonunda blot Tween içermeyen bloke çözeltisi içinde hazırlanan primer antikor ile +4 °C'de bir gece süreyle inkübasyona bırakılacaktır. Ertesi gün, blot Tween içermeyen bloke çözeltisi içinde hazırlanan HRP-sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübasyona bırakılacaktır. Primer ve sekonder antikor inkübasyonları arasında ve sonrasında blot TBST solüsyonunda her biri 5 dakika olmak üzere 3 defa yıkanacaktır. Son olarak membran, antikor bağlanan proteinlerin tespiti için ECL solüsyonu ile karanlıkta inkübe edilecektir. Protein ekspresyon seviyelerini normalize etmek, jelden jele oluşabilecek farklılıkları minimum düzeye indirebilmek için β -Actin kontrol olarak kullanılacaktır.

2.3 İstatistiksel Analizler

Western Blot tekniği ile elde edilen spesifik bant görüntüleri jel görüntüleme cihazı (BioRad ChemiDoc®MP sistemi) aracılığıyla fotoğraflanacak ve Image J yazılım programı kullanılarak elde edilen protein bantlarının densitometrik tarama metodu ile ölçümü yapılacaktır. Deneysel çalışmalar sonucu elde edilen bütün ölçümlerde grup ortalamalarının $\pm$ standart hataları hesaplanacaktır. Verilerin istatistik değerlendirmeleri Graph Pad istatistik paket programı kullanılarak yapılacaktır.

3. Bulgular ve Tartışma/Sonuç

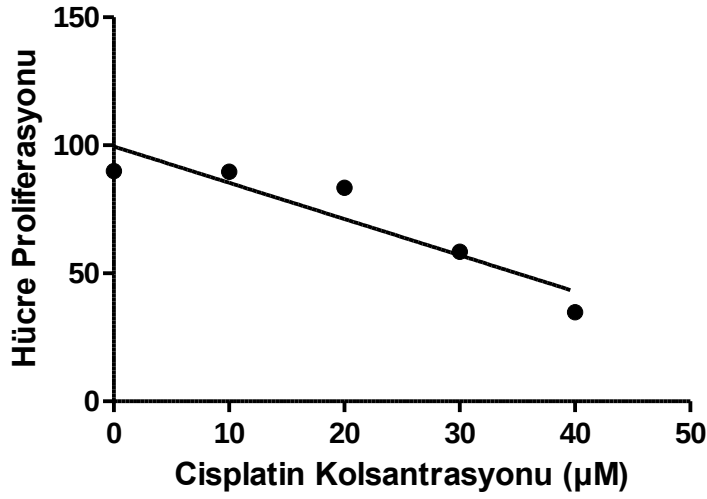
Ciplatin-metformin ilaç kombinasyonunun prostat hücrelerinin proliferasyonunu glikoliz yolağını regüle ettiği bilinen hekzokinaz II enziminin protein ekspresyonunu düşürerek engellediği düşünülmektedir. ODTÜ BAP Koordinatörlüğü tarafından desteklenmekte olan bu projenin ilk basamağı olan ilaç kombinasyonunun hücrenin sağ kalımı üzerine etkileri, proje ara raporunda belirtilmişti. Bilinindiği üzere, kanser hücreleri, hücre içerisine bol miktarda glikoz almaları ve kullanmaları sayesinde nükleozidlerin ve aminoasitlerin üretimine katkıda bulunmakta ve enerji üretimi ve hücre bölünmesi için çok hızlı bir yol oluşturmaktadırlar. Tasarlanan çalışmanın ikinci basamağında, antidiabetik ilaç metformin ve antineoplastik ajan cisplatin kullanımının, glikoliz yolağının en önemli modülatörü olarak bilinen Hekzokinaz II enziminin protein ekspresyonu üzerine etkisi incelenmiştir.

3.1 Cisplatin-Metformin ilaç kombinasyonunun prostat hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkilerinin incelenmesi:

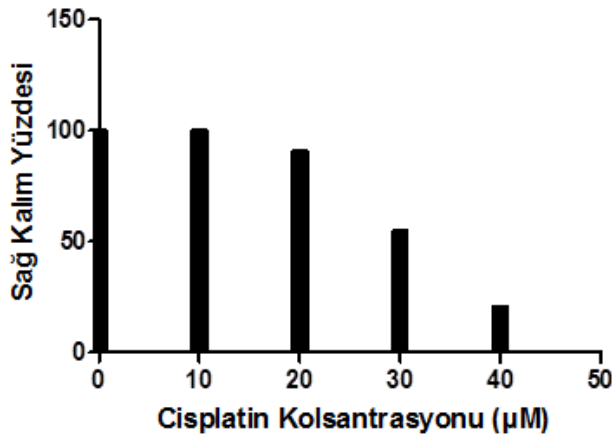
Projenin ara rapor kısmında da belirtildiği gibi, Cisplatin-Metformin kombinasyonunun prostat kanseri hücre hatlarının proliferasyonu üzerine etkilerinin incelenebilmesi için öncelikle Cisplatin ilacının PC3 hücre hatlarında IC50 değerleri Alamar Blue Blue indirgenme yüzdesi ve hücrelerin sağ kalım yüzde değerleri kullanılarak hesaplanmıştır (Tablo 3.1). Sonuç olarak, bu değerler kullanılmış ve hücrelerin sağ kalım /ölüm grafikleri oluşturulmuş ve Cisplatin ilacının IC50 değeri PC3 hücre hattı için 30 μ M olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.1).

Tablo 3.1. PC3 hücre hattında hesaplanan Alamar Blue indirgenme yüzdesi ve hücrelerin sağ kalım yüzde değerleri.

Cisplatin Konsantrasyonu (μ M)	% Indirgenme	% Sağ Kalım
0	69,20491	100
10	68,94814	99,62897
20	62,76469	90,69398
30	37,72169	54,50725
40	14,0595	20,31575



Şekil 3.1. Cisplatin ile muamele edilen PC3 hücre hatlarının proliferasyon grafiği.



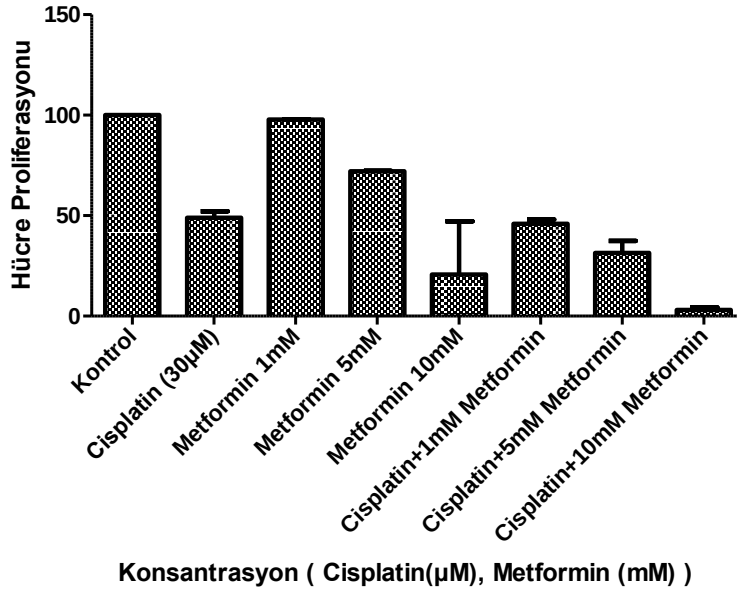
Şekil 3.2. Cisplatin ile muamele edilen PC3 hücre hatlarının sağ kalım grafiği.

Daha sonra, bu ilacın metformin ile kombinasyonunun prostat hücre hatlarının proliferasyonu üzerine etkilerini saptamak amacıyla hücreler Cisplatin IC50 değerlerinin yanısıra konsantrasyonları 1mM ile 10mM arasında değişen metformin ilacı ile muamele edilerek hücre sağ kalım/ ölüm grafikleri çizilmiş (Şekil 3.2) ve cisplatin ilacının metforminle kombinasyonu durumunda hücre proliferasyonu üzerine olası sağ kalım yüzdeleri Tablo 3.2’de hesaplanmıştır.

Tablo 3.2. PC3 hücre hattında hesaplanan Alamar Blue indirgenme yüzdesi ve hücrelerin sağ kalım yüzde değerleri.

Cisplatin Conc. (μM) Metformin Conc. (mM)	indirgenme yüzdesi	sağ kalım yüzdesi
Kontrol	48,47224	100
Cisplatin (30 μM)	25,29033	52,17487
1mM Metformin	47,39134	97,77007
5mM Metformin	34,8476	71,89186
10mM Metformin	22,88033	47,20295
Cisplatin (30μM) + 1mM Metformin	23,286	48,03986
Cisplatin (30μM) + 5mM Metformin	18,17242	37,49036
Cisplatin (30μM) + 10mM Metformin)	2,116424	4,366259

Tablo 3.2 de belirtilen değerler doğrultusunda, hücrelerin sağ kalım grafiği çizilmiş ve sonuç olarak cisplatin metformin ilaç kombinasyonunun prostat hücre proliferasyonunu yalnız cisplatin veya yalnız metformin kullanılan gruplara kıyasla daha fazla düşürdüğü saptanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Cisplatin metformin kombinasyonunun PC3 hücre hattı proliferasyonu üzerine etkisi.

Projenin ilk raporunda önceden de belirtildiği gibi ilaç kombinasyonunun hücre proliferasyonu üzerine olası etkileri incelenmiştir. Daha sonra, bu ilaç kombinasyonunun Hekzokinaz II enziminin ekspresyonu üzerine etkilerinin incelenmesi projenin ikinci basamağını oluşturmaktadır.

3.2 Cisplatin-Metformin ilaç kombinasyonunun Hekzokinaz II enzim ekspresyonu üzerine etkilerinin incelenmesi:

Projenin bu basamağında, ilaç kombinasyonunun glikoliz yolağının önemli bir regülatörü olarak bilinen Hekzokinaz II enziminin protein ekspresyonu üzerine etkisinin araştırılması için ilk olarak hücre kültürü çalışmaları sırasında hesaplanan değerler doğrultusunda hücrelerden protein izolasyonu yapılmış, daha sonra bu proteinler kullanılarak Hekzokinaz II protein ekspresyonu Western blot tekniği kullanılarak incelenmiştir.

3.2.1 Protein Ekstraksiyonu

PC3 hücre hatları, 100 x 20 mm'lik doku kültürü petri kaplarına, petri kabı başına 2.000.000 hücre kaplama yoğunluğunda ekilmiş ve %80 yoğunluğa ulaşınca büyüme ortamları aspire

edilerek pojenin ilk kısmı kapsamında hesaplanan cisplatin ve metforminin konsantrasyonlarında muamele edilmiştir. 2 gün sonunda hücreler soğuk fosfat tamponu ile 3 defa yıkanıp, 2ml fosfat tamponu eklenerek petri kaplarından kazıyıcı yardımı ile toplanarak eppendorf tüplere aktarılmıştır. Hücreler 14000 x g'de 10 dakika süreyle santrifüje tabi tutularak pelletleri alınmıştır. Piyasada bulunan 10X RIPA tamponunun (Cell Signaling Technology) su yardımı ile 1x RIPA tamponu oluşturacak şekilde dilüe edilmiş ve 1 mM fenilmetansülfonil fluorür (PMSF) proteaz etkinliğinin önlenmesi için ilave edilmiştir. Her bir gruba 200 uL seyreltilmiş RIPA tamponu ilave edilerek hücrelerin lizizi sağlanmıştır. Elde edilen hücre lizatları, 5 dakika buz üzerinde inkübe edilmiş ve takiben 4 dakika süreyle sonike edilmiştir. Sonikasyona uğramış hücre lizatları 14000 x g'de 10 dakika süreyle soğuk bir mikrofüjde tekrar santrifüje tabi tutulmuş, süpernatantlar yeni eppendorf tüplere aktararak -80°C dondurucuda sonraki deneyler için saklanmıştır.

3.2.2 Protein Miktar Tayini

Hücrelerden elde edilen proteinlerin konsantrasyon tayini, BSA (sığır serum albümin) standart olarak kullanılarak Lowry ve ark. (1951)'nin metoduyla yapılmıştır. 1:100 oranında seyreltilmiş olan örnekler test tüplerine 0,1 ml'den 0,5 ml'ye değişen hacimlerde alınıp ve son hacim deiyonize distile su ile 0,5 ml'ye tamamlanmıştır. Sonra % 2'lik bakır sülfat, %2'lik sodyum potasyum tartarat ve % 2'lik sodyum karbonat içeren 0,1 N NaOH'in karıştırılmasıyla oluşturulan alkali bakır reaktifi ile karıştırılıp ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, deiyonize distile su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin reaktifinden her bir tüpe ilave edilip ve 50 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Oluşan rengin şiddeti her bir tüp için 660 nm'de köre karşı ölçülmüştür. Protein miktarları elde edilen eğim değeri kullanılarak hesaplanmıştır. Tablo 3.3, PC3 hücre hatlarından elde edilen ortalama protein konsantrasyonlarını göstermektedir.

Tablo 3.3: PC3 hücre halarından elde edilen ortalama protein konsantrasyonları.

PC3 Hücre hattından elde edilen Protein Miktarı (mg/mL)	
Kontrol	6,9
Cisplatin*	1,99
1mM Metformin	6,74
5mM Metformin	4,05
10mM Metformin	1,2
Cisplatin* + 1mM Metformin	2,05
Cisplatin* + 5mM Metformin	3,46
Cisplatin* + 10mM Metformin	1,34

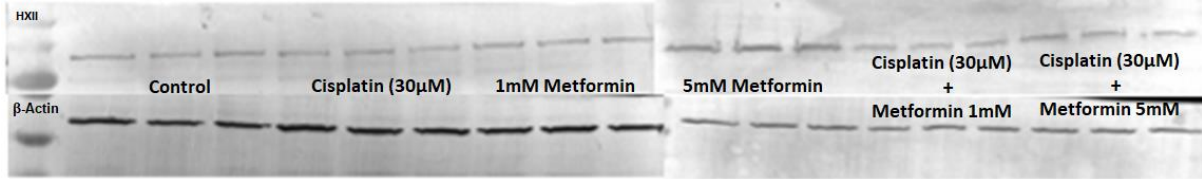
*Cisplatin değerleri hücre kültürü kısmında hesaplandığı gibi, PC3 hücre hattı için 30 μ M olarak kullanılmıştır.

3.2.3 Hekzokinaz II enziminin Protein Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi

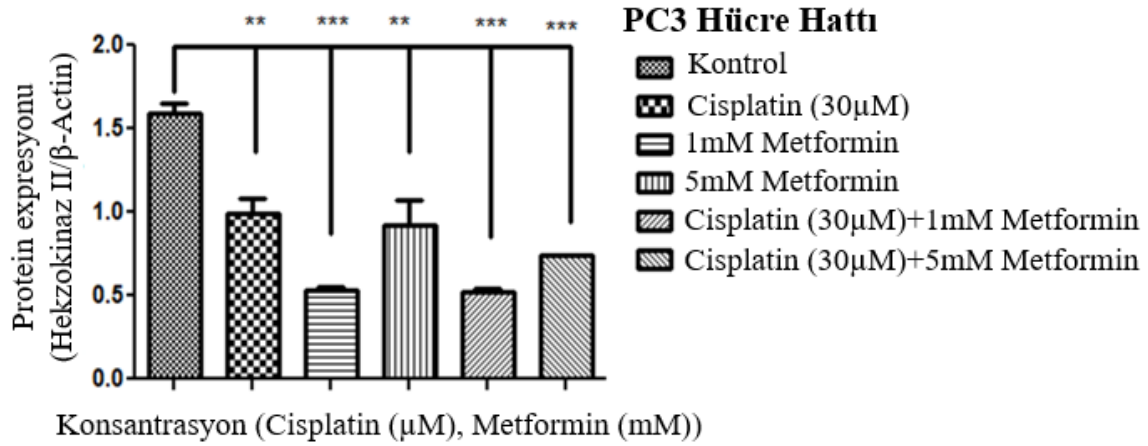
Proteinler metod kısmında da belirtildiği gibi dikey elektroforez tekniği uygulanarak SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi ile ayrıştırılarak ve protein profilleri elde edilmiştir. Hekzokinaz II enzimi için spesifik antikorlar kullanılarak Western Blot tekniği ile protein ekspresyonu taini çalışmaları yürütülmüştür.

Spesifik bant görüntüleri jel görüntüleme cihazı (BioRad ChemiDoc®MP sistemi) aracılığıyla fotoğraflanmış ve Image J yazılım programı kullanılarak elde edilen protein bantlarının densitometrik tarama metodu ile ölçümü yapılmıştır (Şekil 3.4). Protein ekspresyon seviyelerini normalize etmek, jelden jele oluşabilecek farklılıkları minimum düzeye indirebilmek için kontrol olarak β -Actin kullanılmıştır.

Deneyisel çalışmalar sonucu elde edilen bütün ölçümlerde grup ortalamalarının $\pm$ standart sapmaları hesaplanmış olup, verilerin istatistik değerlendirmeleri GraphPad istatistik paket programı kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.4: Kontrol ve ilaç kombinasyonu kullanılmış PC3 hücre hattında Hekzokinaz II protein ekspresyonunu gösteren immünoreaktif protein bant fotoğrafları. Hekzokinaz II (110 kDa), β-Actin (42 kDa) protein büyüklüğünde gözlemlenmiştir. Şerit 1-3: Kontrol, Şerit 4-6: Cisplatin (30 μM), Şerit 7-9: Metformin 1 mM, Şerit 10-12: Metformin 5 mM, Şerit 13-15: Cisplatin+1mM Metformin, Şerit 16-18: Cisplatin+5mM Metformin. Her kuyucuk için 30 μg protein yüklenmiştir.



Şekil 3.5: Kontrol ve ilaç kombinasyonu kullanılmış PC3 hücre hattında Hekzokinaz II protein ekspresyonunun istatistiki olarak incelenmesi.

Yapılan çalışmalar sonucunda, cisplatin antikanser ilacının antidiyabetik bir ilaç olan metformin ile kombine kullanımının, prostat hücrelerinin proliferasyonunu istatistiki olarak düşürdüğü gözlemlenmiş olup, kanser hücre büyümesi üzerindeki bu durdurucu etkisini, glikoliz yolağında önemli rol oynayan heksokinaz II enziminin hücre içi total protein ekspresyonunu düşürerek gösterdiği gözlemlenmiştir.

4. Proje Sonuçlarının Değerlendirilmesi

ODTÜ BAP Koordinatörlüğü tarafından tasarlanan projenin desteklenmesi, son zamanlarda birçok bilim insanının ilgisini çeken bir konu olan kanser ilaçları ve diyabetik ilaçların birlikte kullanımının kanser büyümesine etkilerinin incelenmesini içeren bu projenin yürütülmesini mümkün kılmıştır. Proje kapsamında tasarlanan çalışmalar 1 yıllık süreç içinde hiçbir aksaklık yaşanmadan sonlandırılmıştır. Proje sonucunda oluşturulan çıktılar literatüre yeni bir bakış açısı sunma açısından önem arz etmekte olup bu doğrultuda yapılması tasarlanan yeni çalışmalar için ön sonuçlar oluşturması bakımından proje ekibine yardım edebilecek niteliktedir. Bu doğrultuda tasarlanan çalışmanın sonuçları alanında lider kişilerin katılımı ile gerçekleştirilen 43. FEBS kongresinde (43rd Federation of European Biochemical Societies, FEBS 2018 Congress, July 7-12, 2018, Prague, Czech Republic (P.11-014). FEBS Letters, Vol. 592 (No: 12), pp. 352, John Wiley and Sons Ltd., June 2018. FEBS OPEN BIO, 8 (Suppl. 1), pp.352-352, P.11-014-T, (DOI: 10.1002/2211-5463.12453) sunulmuş olmakla birlikte yine çalışmanın sonuçlarını içeren bir makalenin yayınlanması için çalışmalarımız devam etmektedir.

5. Referans

Schernhammer, E.S., Holly, J.M., Pollak, M.N., Hankinson, S.E. 2005. "Circulating Levels of Insulin-Like Growth Factors, Their Binding Proteins and Breast Cancer Risk", *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14 (3),699-704.

Esra, A., Deniz, E., Şafak, A., Levent, I. 1999. "Cisplatinin Sıçan Böbrek ve Testisleri Üzerine Etkileri", *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 52(3), 139-145.

Pogach, L.M., Lee, Y., Gould, S., Giglio, W., Meyenhofer, M., Huang, H.F.S. 1989. "Characterization of Cis-Platinum-Induced Sertoli Cell Dysfunction in Rodents", *Tox App Pharm*, 98,350-361.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B. J., Klenk, D.C. 1985. "Measurement of protein using bicinchoninic acid", *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85.

Laemmli, U.K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 227(5259), 680–685.

Kati K. W., Merja A. H., Biswajyoti S., Visa M., Marika J. L., Olli A. J., Tapio V., 2009 'Increased Expression of Androgen Receptor Sensitizes Prostate Cancer Cells to Low Levels of Androgens'. *Molecular Biology, Pathobiology, and Genetics*, 10.1158/00085472.CAN-09-0919

Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev* 2004; 25: 276–308

