

TÜMÖR HÜCRELERİNDE WESTERN BLOTLAMA UYGULAMALARI

Dr. Derya ÜSTÜNER*

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Meşelik / ESKİŞEHİR

Özet

Kanser, hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasdır. Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşümünde, hücre büyümesi ve farklılaşmasında değişiklikler olur. Bu değişiklikler, DNA ve dolayısıyla gen seviyesinde mutasyona neden olabilir. Bu değişikliklerden etkilenen genler onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olarak sınıflandırılmaktadır. Onkogenler normal genlerin yüksek seviyede eksprese olması ile oluşur. Tümör baskılayıcı genler ise; hücre bölünmesi, hayatta kalma yada kanser hücrelerinin diğer özelliklerini engelleyen genlerdir. Tümör baskılayıcı genler genellikle genetik değişiklikleri indüklemek için kanserli hücreler tarafından devre dışı bırakılır. Bu genlerin, transkripsiyonları sonucu oluşan proteinlerle etkilerini ortaya koyarlar. Proteinlerin özelliklerini ortaya konması da proteomik çalışmalarla sağlanmaktadır. Proteinler canlıların en önemli yaşamsal kısımlarıdır ve onlar hücrenin fizyolojik metabolik yolların ana unsurlarıdır. Marc Wilkins tarafından protein ve genom kelimeleri birleştirilerek proteomik kelimesi ortaya konmuştur. Western blotlama ise, proteinlerin spesifik antikor bağlanma özellikleri baz alınarak bazı proteinleri tanımlamak amacıyla kullanılan bir tekniktir. Bu teknik ile çok sayıda protein karışımından ilgilendiğimiz proteinin büyüklüğü ve ekspresyonu hakkında bilgi alabiliriz. Kanserde erken evredeki proteinleri tanımlamak için Western Blotlama tekniği kullanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Western Blotlama, Proteomik

1.Giriş

Moleküler biyolojide santral dogma olarak bilinen süreçte DNA da depolanmış genetik bilginin ekspresyonu için genel bir yol tanımlanmıştır. DNA'daki bilgi mRNA ya transkripsiyon ifadesi ile aktarılmakta, buradan da tRNA yardımıyla ribozomlar üzerinden hücrenin tüm yapısal ve enzimatik fonksiyonları için gerekli olan proteinler sentezlenmektedir [1]. Western blotlama tekniği, santral doğma görüşüne göre; DNA dan proteine doğru gerçekleşen genetik bilgi akışının son durağı olan proteinlerin tespit edilmesine dayanan bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır [2].

İnsan genom projesiyle birlikte ortaya çıkarılan gen dizilerinden sonra, yeni amaç; bu genlerin nasıl ifade gösterdiklerini bulmak yani mRNA profillerini çıkarmak diğer genlerle beraber nasıl bir ilişki içinde olduklarını göstermek ve böylece belirli hastalıklarda hangi genlerin rol oynadığını ortaya çıkarmak olmuştur. Bir hücrenin tipi veya içinde bulunduğu evre o hücrenin mRNA ifadesi ile ilgilidir. Daha önceden tanımlanmamış genlerin ifade düzeyleri incelenerek ve diğer bilinen genlerin mRNA ifadeleri ile karşılaştırılarak o genlerin işlevleri hakkında bilgiler edinilmeye çalışılmaktadır [2]. mRNA ölçümü real time polimeraz zincir reaksiyonu ile gerçekleştirilir. Homojenize edilmiş dokuda mRNA kopya sayısı belirlenebilir. Buna ek daha yeni metotlar ise pek çok genin ekspresyon profilini ölçen, transkript seviyesini belirleyen DNA mikroarray teknolojisidir. Gen ekspresyonu transkripsiyon, translasyon ve proteinin post translasyonel modifikasyonlarını içermektedir. Gen ekspresyonunun epigenetik regülasyonu için değişik mekanizmaları vardır. Bunlar arasında DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve genomik imprinting sayılabilir. Bu epigenetik kontroldeki bozukluklar sonucunda kanser ve kromozomal instabilite sendromları oluşmaktadır [3, 4].

*E-posta: dustuner5@gmail.com; dustuner@ogu.edu.tr

2. Proteomik

Son yıllarda yapılan araştırmalar göstermektedir ki; genom çalışmalarından sonraki basamak protein çalışmalarıdır. Protein çalışmaları komplike çalışmalardır. Proteomik çalışmalar da ise doğrudan protein miktarı ölçülebilmektedir [5].

Proteom kelimesi ilk kez 1994 yılında Siena'da iki yönlü elektroforez toplantısında Marc Wilkins tarafından önerilmiş ve kabul görmüştür. Genom bir organizmada bulunan genlerin tamamı olarak tanımlanır. Genomik terimi ise genom incelemek için kullanılan yöntemlerin hepsini kapsar. Proteom genom tarafından ifade edilen proteinlerin tümünü kapsamaktadır (**PROTein genOME**). Proteomik ise farklı koşullarda hücre, doku veya vücut sıvılarındaki proteinlerin miktarsal analizi olarak tanımlanır ve belli bir organizmada bulunan proteinlerin toplamını incelemek için kullanılan yöntemlerdir (**PROTein genOMICS**). Protein analizi DNA analizine göre çok daha zordur. Çünkü DNA da sadece dört yapı taşı varken, proteinler 20 farklı amino asitten oluşur ve üç boyutlu yapıları işlevlerini etkiler [2]. Genomik çalışmalarda hastalık ilgili genler tanımlanır. Hastalığın farklı aşamalarında bazı genlerin ifade oranının artacağı yada azalacağı ve bu genlerden oluşan mRNA miktarlarıyla hastalığın ilerleyişi hakkında bir ilişki kurulmaya çalışılmaktadır. Ancak her zaman insan dokularında mRNA'ların ifade düzeyleriyle bu mRNA'lardan kodlanan proteinlerin miktarları arasında ilişki olmayabilir. Bunun yanı sıra bir gen, farklı proteinler kodlamakta ve bu proteinler translasyon sonrası değişimlere uğrayabilmektedir. Translasyon sonrası da değişimler gen işlevinden bağımsız olabilmektedir. Bundan dolayı, genomik tanımın her hastalıkta kullanımı kısıtlı olmaktadır.

2.1 Proteom ve genom

Proteom ve genom arasındaki karşılaştırmayı yaparsak, bir organizmanın bir genomu ama birçok proteomu vardır. Bu nedenle proteom analizi genom analizine göre daha karmaşıktır ve çok daha güçlü analitik tekniklere gereksinim duyar. Genom ve proteom arasındaki önemli fark genomun sabit olması oysa proteinlerin sürekli değişim halinde olmasıdır. Proteinler diğer proteinlerle etkileşime girebilirler ve değişebilirler. Proteinler hücre tipine yada farklı hastalık aşamalarına göre de değişebilmektedir. Genomun sabit yapısının aksine proteomun değişken yapısı proteomu organizmada gerçekleşen olayların belirteci haline getirmiştir. Dolayısıyla bir organizmanın proteomunu tanımlamak genomu tanımlamaktan çok daha yararlıdır.

Proteom analizi hücre yada dokuda ifade edilen proteinleri belirleyen ekspresyon proteomik, proteinlerin üç boyutlu tayiniyle ilgilenen yapısal proteomik, proteinlerin işlevlerini inceleyen işlevsel proteomik, hücrelerle hangi küçük moleküllerin etkileştiğini inceleyen bir yaklaşım olan kemoproteomik, protein-protein etkileşimi ve proteinlerin hücre içindeki yerleşiminin belirlenmesini kapsayan hücre haritası proteomik en temel olanlarıdır. Bu uygulamalarla hastalıklara özgü proteinler belirlenmekte ve hastalığın ilerleyişi hakkında ilişki kurulmaktadır [6, 7]

3. Western Blotlama Tanımı

Western Blotlamayı ilk tanımlayan H. T. Towbin, 1979 yılında ve 1981 yılında W. N. Burnettedir. Elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin destek membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immunolojik metotlarla gösterilmesi temeline dayanmaktadır. Proteinler, membran, sitoplazmik ve nükleer kaynaklı olabilmektedirler [8, 9]. Bu nedenle, farklı kanser türlerinden hazırlanan örneklerdeki protein ekspresyonları bu metotla belirlenebilmektedir.

Western blotlama tekniği, denatüre edilen DNA'nın nitroselüloz membrana transfer edildikten sonra hibridizasyonla tespit edildiği southern blot tekniğinin modifikasyonudur. Bahsedilen teknik ile western blotlamanın farkı transferi gerçekleşen moleküllerin belirlenmesinde kullanılan işaretli probun yapısıdır. Western blottamada işaretli antikorlar kullanılırken diğer metotta işaretli oligonükleotitler kullanılmaktadır.

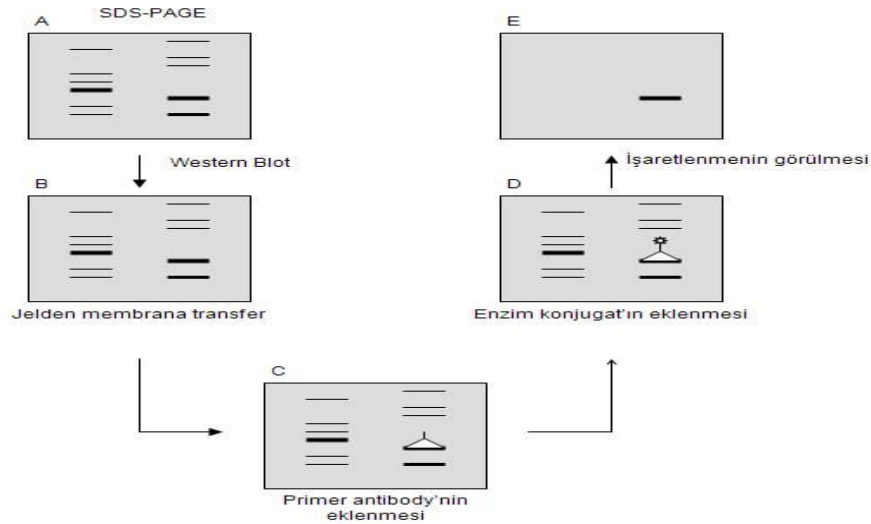
3.1. Western blotlama yöntemi

Tümör hücrelerinde western blotlama ile hedef proteinin belirlenmesinde ilk işlem homojenizasyondur. Bu işlemde, hücrelerin zar yapıları parçalanır ve elde edilen karışım homojenattır. Hücre yapısı ortadan kalkmış olan bu homojenatta, serbest ya da organeller içerisindeki hücre bileşenleri membran parçaları ve bir miktarda parçalanmamış hücrelerle birlikte süspansiyon halinde bulunurlar. Hücre elemanlarının işlevlerini kaybettirmeden parçalama sağlayabilen teknikler geliştirilmiştir. Bunun için insanın duyma sınırının üzerindeki frekanslarda, (18 khz üstü) ses dalgaları, sıvı bir ortamda hücrelere uygulandığında proteinlerin açığa çıkması sağlanır. Bu uygulama,

süspansiyondaki su moleküllerinin kinetik enerjisini artırarak ses enerjisinin mekanik enerjiye dönüşümüyle, ortamdaki hücreler parçalanır. Bu sırada açığa çıkan ısı nedeniyle proteinlerin zarar görmemesi için bu işlemler buz içerisinde gerçekleştirilir [10].

Bu işlemden sonra süspansiyonda berraklaşma sağlanana kadar santrifüj işlemi yapılır. Daha sonra supernatant kısım alınır ve protein konsantrasyonunun ölçülmesi işlemi yapılır. Blotlamadan önce çalışılan örnekteki proteinler elektriksel ortamda jel üzerinde göç ettirilmektedir. Proteinlerin elektroforezleri SDS-PAGE ile gerçekleştirilmektedir. SDS-PAGE proteinlerin ayrıştırılması için kullanılmaktadır. Proteinler SDS-PAGE de molekül ağırlıkları ile orantılı olarak artı kutba (anot) göç etmekte ve jelde buldukları yerde bantlar halinde yığılım göstermektedir. Western blotlama tekniği elektroforez işlemi takiben dört adımda gerçekleştirilir: Bunlar;

1. Jeldeki proteinlerin nitro selüloz membrana aktarımı (**Blotlama- Western Emdirimi**) Kompleks bir karışım içinde hedeflenen protein özgün şekilde saptamak için Western emdirimi yapılır. Membrana aktarım mini blotter cihazı içinde (transfer aparatı) gerçekleştirilir. Aktarım tamponu ile doldurulmuş tanka, sandviç tarzı hazırlanmış jel +membran kompleksi dikey olarak yerleştirilir.
2. Spesifik reaksiyonları engellemek için protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması işlemi yapılır (**Bloklama**),
3. Jelden membrana aktarım yapıldıktan sonra saptama işlemine hazır hale getirilmiş membran önce hedeflenen proteine özgü birincil antikor ile reaksiyona sokulur. Sonra bu antikor da renkli bir ürün ortaya koyabilen enzim horseradish peroxidase bağlı antikor ile işleme sokulur (**Özgül antikorlarla işaretleme**).
4. En son adım ise proteinlerin görüntülenmesi aşamasıdır. İkincil antikor fotoğraf filmi üzerinde ışık sinyali kemilüminesens oluşturacak şekilde proteinler belirlenir. Syngene Kemilüminesans görüntüleme cihazına alınarak proteinlerin görüntüleri bilgisayara aktarılır ve syngene software programı aracılığıyla **protein miktarları** interpolasyon mantığıyla belirlenir [10, 11]. Şekil 1. de Western blotlama ve proteinin belirlenmesi işlemi gösterilmiştir [11].



Şekil 1. Western blotlama yönteminin şematik gösterimi.

(A) Western Blotlama öncesindeki boyanmamış SDS-PAGE jeli. (Gösterilen bantlar varsayımdır). (B) Western transfer sonrasındaki SDS-PAGE jeli (C) Antikoron belirli bir gruba bağlanması. (D) İkincil antikoron (alkalin fosfataz veya peroksidaz ile) birinci antikora bağlanması. (E) Belirli banta özgü renk gelişimi [11].

Not: Kurien B.T., Scofield R.H. , ‘‘Western Blotting’’ dan modifiye edilerek alınmıştır [11].

Son yıllarda geliştirilmiş protein görüntüleme işlemleri sayesinde duyarlılık 1000 kat kadar artmıştır. Western blot tekniği sıklıkla HIV pozitif çıkan bireylerde doğrulayıcı test olarak kullanılmaktadır. Bu tekniğin dezavantajı ise uygulamanın uzun süre alması ve ticari olarak satın alınan antikorların da oldukça pahalı olmasıdır [11]. Bunun yanında protein miktarlarını kendi başına belirleyen metotlar bulunmaktadır. Bunlar; ELISA (Enzyme Linked

Immünosorbent Assay), Mass Spektrofotometri (MS) gibi tekniklerdir [12]. Protein mikroarray ise en yeni tekniklerdendir. Protein mikroarrayler bir seferde çok sayıdaki proteinleri belirlemede hızlı ve etkindir. Gelecekte, DNA mikroçip testlerinin blotlama tekniklerinin bir versiyonu olarak geniş kullanım alanı bulması beklenmektedir. Mikroarray teknolojisi, binlerce gen ve ürünleri (RNA ve proteinler gibi) arasındaki ilişkiyi bir çip üzerinde eş zamanlı olarak araştırma imkanı sağlar. Protein arraylerin uygulamaları da; protein ekspresyonu profilinin çıkarılması, teşhis ve protein fonksiyonlarının belirlenmesi olarak sınıflandırılabilir. Analiz süresinin kısalmasının yanı sıra çok sayıdaki analizin aynı anda sonuçlandırılması mümkün olacaktır.

4. Western Blotlama İle Yapılan Kanser Çalışmaları

Yapılan çalışmalarda Cathepsin D, kanserli meme dokusunda tanımlanmıştır [13]. Yine meme kanserinde PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) adlı 25 kDa büyüklüğündeki protein Western Blotlamala ile gösterilmiştir [14]. CFI (Complement Factor I) adlı proteinin gastrit kanserli hastaların serumunda tanı koydurucu olabileceği ve CA125 (Combined Antibody 125) proteininin de % 91 hassaslık ve % 95 özgüllükle over kanserli hastalarda önemli bir protein olduğu belirtilmiştir [15, 16]. Yapılan yeni çalışmalar ile aday proteinler belirlenmiştir (Çizelge 1) [17]. Proteomik çalışmalar kanserin erken evresinde kanser biyomarkerların keşfi konusunda hassas ve özgüldür (Çizelge 2) [17]. Bununla beraber günümüzde tek biyomarker erken evredeki kanser tanısında yeterli değildir. Bunun için çoklu biyomarkerlar kullanılarak yüksek özgüllük ve hassaslıkta erken dönemde kanser tanısı mümkün olabilmektedir [18].

Farklı kanser dokuları	Aday proteinler
Mesane	Anneksin V, ısı şok proteini 27 (Hsp), Lactat dehidrogenaz (proteinde artış var).
Meme	Alfa2- HS –glikoprotein (proteinde azalma var), Lipophilin B, Beta-globin, hemopeksin, vitamin-D bağlı protein (proteinde artış var).
Kolorektal	ANXA3, BMP4, LCN2, SRARC, MMP7, MMP11
Özefagus	Periplakin
Gastrit	Anneksin V, C13orf2, glutamat dehidrogenaz 1, fibrinogen beta zinciri (proteinde artış var), RoXaN (proteinde azalış var).
Over	Hsp 60 ve CA125
Böbrek	Serum amiloid alfa
Baş boyun	CK8 (Citokeratin)
Hepatosellüler Karsinom	Prapolipoprotein, alfa2-HS glikoprotein, apolipoprotein A-IV öncüsü, PRO1708/PRO2044
Akciğer Kanser	Immünglobulin lamda zinciri, transtiretin monomer, haptogloblin-alfa2, serum amiloid protein.
Pankreas Kanser	UHRF1, ATP7A, aldehid oksidaz 1
Prostat Kanser	Anneksin I

Çizelge 1. Proteomik çalışmalar ile farklı tipteki kanser dokularındaki aday proteinler [17].

Kanser Tipleri	Proteomik Biyomarker		Tümör Biyomarker		
	Hassaslık	Özgüllük	Biyomarker	Hassaslık	Özgüllük
Mesane	%80	%90-97	NMP22	%31	% 95
Meme	%93	%91	CA 15-3	%63	% 80-88
Koleraktal	%91	%93	CEA	%43	-
Gastrit	%83	%95	CEA	%49	-
Karaciğer	%94	%86	AFP	%50	%90
Akciğer	%87	%80	Cyfra21-1	%63	%94
Over	%83	%94	CA-125	%57	-
Pankreas	%78	%97	CA-19-9	%72	-
Prostat	%83	%97	PSA	%86	%20-34

Çizelge 2. Proteomik çalışmalardaki kanser biyomarkerlarının hassaslık ve özgüllük değerleri [17].

5. Sonuç

Onkoproteomik analizler ile kanser hastalarında doğrudan sonuca ulaşmak mümkün olabilmektedir. Gelecekte onkoproteomikler terapide önemli rol oynayacaktır [16, 18]. Onkoproteomikler sayesinde, tümörögenез boyunca metastaz, invazyon ve terapiye direnç açıklanabilecektir [16]. Şu an tanımlı 18000 kadar protein bulunmakta ve her yıl da bu sayıya 1000 aday protein daha eklenmektedir [2]. Proteomik çalışmalar, kanserde erken tanı koydurucu proteinlerin, keşfinde önemlidir. Western Blotlama yöntemi bu yoldaki adımlardan biridir. Genomiksin başlangıcından bugüne kadar olan süre ve yaşanan sıkıntılar düşünülürse proteomik çalışmalarda da pek çok problemle karşılaşılacaktır. Bununla beraber bu problemlerin günümüzde hızla çözülebileceği inancındayız.

Kaynaklar

- [1] Cooper M., "The Cell", *A Molecular Approach*, Press Washington DC, (1997)
- [2] Lüleyap, H.Ü., "Moleküler Genetiğin Esasları", *Nobel Kitabevi*, (2008).
- [3] Burton H., Steward A., "Nutrigenomics", Report of a workshop hosted by The Nuffield Trust and organized by the Public Health Genetics Unit London. *The Nuffield Trust*, 1-26, (2005).
- [4] Kauwell GPA., "Emerging concepts in nutrigenomics: a preview of what is to come", *Nutr. Clin Prac.*, 20 : 75-87, (2005).
- [5] Ratchada C., Onusa W., Nirush L., Usanee V., "Alteration of protein expression pattern of vascular endothelial growth factor (VEGF) from soluble to cell-associated isoform of tumorigenesis", *BMC Cancer*, 5: 128, (2005).
- [6] Nedelkov D., "Population proteomics investigation of protein diversity in human populations", *Proteomics*, 8: 779-786, (2008).
- [7] Nedelkov D., Kiernan UA, Niederkofler EE., Tubbs KA., Nelson RW., "Population proteomics: the concept, attributes and potential for cancer biomarker research", *Mol Cell Proteomics*, 5: 1811-1818, (2006).
- [8] De Vita Jr, Hellman S, Rosenberg S.A., "Cancer, principles and practice of Oncology", 4th Edition, *JB.Lippincott Co*, Philadelphia, (1993).
- [9] Doğan A.L., Güç D., "Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser", *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35 : 34-42, (2004).
- [10] Güler Temizkan, Nazlı Arda., "Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler", *Nobel Tıp Kitapçevleri*, (2004).
- [11] Kurien B.T., Scofield R.H., "Western Blotting", *Science Direct*, 38(4) :283-293, (2006)
- [12] Bın Y., Daniel W. C., Steven J.S., Steven P. G., "Haptoglobin- α Subunit As Potential Serum Biomarker in Ovarian Cancer: Identification and Characterization Using Proteomik Profiling and Mass Spectrometry", *Clinical Cancer Research*, 9 : 2904-2911, (2003)
- [13] Schultz D. C., Bazel S., Wright L. M., Tucker S., Lange M. K., Tachovsky S. L., Niedbala S., Alhadeff J., "Western blotting and enzymatic activity Analysis of Cathepsin D in Breast Tissue and Seara of Patients with Breast Cancer and Bening Breast Disease and Normal Controls", *Cancer Research*, 54: 48-54, (1994)
- [14] Linda H. M., Brittney S.H., Waleed A. A., Lacey E. D "A cancer associated PCNA expressed in breast cancer has implications as a potential biomarker", *The National Academy of Science*, 103: 51, 19472-19477, (2006)
- [15] Wentao L., Binga L., Lin X., Yi Z., Xuehua C., "Down-regulated expression of complement factor I : A potential suppressive protein for gastric cancer identified by serum proteome analysis", *Clinica Chimica Acta*, 377 : 119-126, (2007)
- [16] György Makro-Varga, "Proteomiks principles and Challenges", *Pure Appl.Chem.* 76 (4): 829-837. (2004).
- [17] William C., "Contribution of OncoProteomiks to cancer biomarker discovery", *Molecular Cancer*, 6 :25 , 1-13, (2007).
- [18] Wulfkuhle J.D., Liotta L.A., Petricoin E F., "Proteomic applications for the early detection of cancer", *Nat Rev Cancer* 3:267-275, (2003).