

# Gen Transferi-Transfeksiyon

## Prostat Kanseri STAMP2 Stabil Hücre Hattının Oluşturulması

GENE TRANSFER- TRANSFECTION

ESTABLISHMENT OF PROSTATE CANCER STAMP2 STABLE CELL LINE

**Ceren GÖNEN KORKMAZ**

Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı

### ÖZET

**Amaç:** DNA- gen transferi, kanserde yapılan gen ekspresyon araştırmalarında anahtar rol oynamaktadır. Prostat kanserinin erken döneminde eksprese olan prostat spesifik genleri aradığımız bir projede altı transmembran domaini bulunan bir gen ailesini (six transmembrane protein of prostate- STAMP1 ve 2'yi) tanımladık.

**Gereç ve yöntem:** PC3 hücre kültüründe (prostat kanseri kemik metastazı- STAMP gen ekspresyonları negatif), ektopik ekspresyon vektörleri kullanılarak STAMP üyelerinin ekspresyonu yerine konulmuş ve hücrelerdeki lokalizasyonları immünofloresan tekniği ile takip edilmiş ve doğrulanmıştır.

**Bulgular:** HisMax-STAMP2'nin stabil hücre hatları oluşturulmuş ve stabilitesi doğrulanmıştır.

**Sonuç:** Projenin belirtilen dizaynı ile ilgilenilen olası yolları, çeşitli indüksiyonlar ve takip eden RT-PCR deneyleri ile incelemek mümkün olabilecektir.

**Anahtar sözcükler:** Transfeksiyon, immünofloresan, stabil hücre hattı, antibiyotik seleksiyonu, prostat kanseri

### SUMMARY

**Objective:** DNA- gene transfer plays key role at gene expression studies of cancer. In a project that prostate-specific genes expressed in early term of prostate carcinoma is searched, a gene family with six transmembrane domain protein (six transmembrane protein of prostate- STAMP1 and 2) is identified.

**Material and method:** In PC3 cell line (prostate cancer bone metastasis- STAMP gene expressions negative) ectopic expression vectors of STAMP members are placed in and localization is followed by immunofluorescence and confirmed.

**Results:** Stable cell line of HisMax-STAMP2 is established and stability is confirmed.

**Conclusion:** With the given design of the project, it will be available to search the interested pathways by the various inductions and following RT-PCR assays.

**Key words:** Transfection, immunofluorescence, stable cell line, antibiotic selection, prostate cancer

**Ceren GÖNEN KORKMAZ**

Ege Üniversitesi

Eczacılık Fakültesi

Farmakoloji AD

Tel: (232) 388 5266

e-posta:

[korkmaz\\_ceren@yahoo.com](mailto:korkmaz_ceren@yahoo.com)

Genler (DNA) ve biyolojik hücre yüzeyleri aynı negatif şarja sahiptirler. Bu nedenle genlerin vücut hücrelerine girişi kendiliğinden ve etkili olmaz. Gen tedavisinin klinik başarısı güvenli, etkili ve serum ile uyumlu gen transfer re-ajanlarının varlığına kritik olarak bağımlıdır. Kullanımda olan gen transfer re-ajanları geniş anlamda non-viral ve viral olarak iki ana grupta toplanır. Transfeksiyon tekniğinin oturtulmasında ilk basamakta yer alan non-viral sistem

olarak başarıyla kullanılan presipitasyon oluşturan tuzlar halen çalışmalarda kullanılmaktadır. Non-viral gen -taşıyıcı sistemlerin diğer iki ana grubu: Katyonik polimerler ve katyonik lipitlerdir. Çalışmalarda kullanılan viral sistemler: Adenoviral, retroviral ve lentiviral sistemler olarak şu an için üç model olarak sıralanabilir (1-3).

Transfeksiyonun deneysel kullanım alanları, ilgilenilen söz konusu genin bu geni eksprese etmeyen hücre hatlarına transferi sonrasında aktivite, lokasyon takibinin immüno Floresan, western ve rapörtör gen deneyleri ile yapılması olarak özetlenebilir (4). Rapörtör gen deneylerinin başarılı örnekleri olarak Lusiferaz (örneğin: PB-LUC, 2XARE-LUC), CAT (kloramfenikol asetiltransferaz), SEAP (secreted alkaline fosfatase), hGH (secreted human growth factor) sayılabilir ve B-Gal (B-Galaktosidaz)-transfeksiyonu, transfeksiyon verimliliğinin takibini sağlayan ve transfekte hücrelerde renk değişimi oluşturma özelliği ile tercih edilen bir yöntemdir.

Transfeksiyon sonrasında uygulanan antibiyotik seleksiyonu ile kazandırılmış kararlı ekspresyon (stabil) hücre hatları ile yapılan çalışmalar ile örneğin koloni formasyon deneyleri ile incelenmekte olan genlerin neoplastik karakteri ön görülebilir.

Son on yılda yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ile **gen terapisi** kavramı yerleşmiştir ve klinik uygulamada yer almaya başlamıştır. Ocak 2005 itibarıyla onaylanmış 1020 adet klinik gen terapisi uygulaması rapor edilmiştir. Bu terapilerin %66'si kanser tedavisini amaçlamışlardır. Bu kanser tedavisi için yapılan uygulamaların 58'inde tümör baskılayıcı bir gen olan p53'u kodlayan rekombinant adenoviral vektörler (rAd-p53) kullanılmıştır. Baş ve boyun tümörleri, akciğer, meme ve karaciğer kanserinde dahil olduğu 20 tip kanser indikasyonunda uygulama yeri bulunmuştur. Bu çalışmalar tek basına rAd-p53 ya da sisplatin ve vinorelbin kombine tedavisi şeklinde Faz I, Faz II aşamalarındaki uygulamalardır. Çin'de 1998 yılında başlayan çalışmalar sonunda 2004 yılında rAd-p53 preparatı Gendicine baş ve boyun tümörlerinde kullanılmak üzere Çin Devleti-FDA den onay almış ve bu anlamda bir ilki teşkil etmiştir (5).

Prostat kanserinin anlaşılması ve sağaltımında prostat kanseri gen terapisini amaçlayan çalışmalar bildirilmektedir (6,7).

Hastalığın başlangıç döneminde tümör büyümesi androjene bağımlı olarak ortaya çıkar ve halen kullanılmakta olan androjen ablasyon terapisinin temelini oluşturur (8). Bununla birlikte, birçok vakada prostat kanseri androjene bağımsız bir fenotiple geri döner ve şu an itibarıyla başarılı

olan bir tedavisi yoktur ve mortalite ile sonuçlanır (9). Bu nedenle yapılan gen terapisi klinik denemeleri hormon-refrakter metastatik hastalığı da önleme yönünde gelişim göstermektedir (10).

Metastatik prostat kanser örneklerinde yüksek oranda eksprese olan STEAP (six transmembrane epithelial antigen of prostate) bu C-terminalinde altı transmembran domain içeren ailenin ilk örneği olarak literatüre girdi ve daha sonra tanımlanan genler de NCBI tarafından STEAP olarak adlandırıldılar (11). Bu nedenle STAMP1 ve STAMP2 sırasıyla NCBI tarafından STEAP2 ve STEAP4 olarak numaralandırılmışlardır (12,13). Bu ailenin diğer üyeleri olarak adiposit farklılaşmasında rol alan bir fare proteini olan TIARP (tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced adipose-related protein); ekspresyonunun artışıyla prostat kanser hücrelerinde apoptoza yol açan bir sıçan proteini olan pHyde ve onun insan homoloğu olan TSAP6/STEAP3 sıralanabilir (14-16). Gösterdiği androjen regülasyonu nedeniyle STAMP2'nin hedef olarak seçilmesi üzerine stabil ekspresyonunu gösteren hücreler ile çalışılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Hücre Kültürü

Çalışmamızda kullanılan PC-3 hücre hattı %5 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penicillin/streptomycin içeren DMEM Ham's F12 (PAA) ortamda büyütülmektedir.

### Transfeksiyon

PC3 hücreleri, HisMax-STAMP1 ve de ayrıca HisMax-STAMP2 plazmid vektörü ile transfekte edildi.

%50-80 yoğunlukta 60x15 mm hücre kültür kaplarına pasajlanan PC-3 hücreleri transfeksiyondan 2 saat önce serum içermeyen besi ortamına (1,5 ml) alındı. 3 ul FuGENE HD transfeksiyon reaktifi (Roche) (FuGENE: DNA=3:1) serum içermeyen ortam içerisine eklendi ve hafifçe karıştırıldıktan sonra 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. FuGENE-ortam solüsyonunun içerisine 1,5 µg miktarda plazmid DNA eklendi ve hafifçe karıştırılarak 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Toplam 300 µl hacimde hazırlanan transfeksiyon solüsyonu hücreler üzerine uygulandı. Transfeksiyondan 4-5 saat sonra hücreler üzerine %5 FBS içeren ortam (1,5 ml) ilave edildi. Ektopik eks-

presyonunun gerçekleşmesi için hücreler 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 24saat inkübasyona bırakıldı.

### İmmünofloresan

İmmünofloresan yönteminde araştırılan proteinler HisMax-STAMP1 ve HisMax-STAMP2, HisMax'e karşı geliştirilmiş özgül antikor- Anti-XPress antikor (Invitrogen P/N 46-0528) ile işaretlenerek floresan mikroskobu ile incelenmektedir (17).

### RNA İzolasyonu

PC-3 hücrelerinden RNA izolasyonu Qiagen RNeasy Mini Kit'inin protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi.

### cDNA Sentezi

PC-3 hücrelerinden izole edilen RNA'lar First Strand cDNA Synthesis Kit'inin (Roche) protokolüne uygun şekilde cDNA'ya çevrildi.

### Konvansiyonel PCR

Transfeksiyonun kontrolü için HisMax-STAMP1 ve HisMax-STAMP2 plazmid vektörü ile transfekte edilen PC-3 hücrelerinden elde edilen cDNA'lar PCR ile amplifiye edilerek (Qiagen 2XMaster Mix) STAMP1 ve STAMP2 ekspresyonu araştırıldı.

### Stabil Hücre Hatlarının Oluşturulması

Stabil hücre hatlarının oluşturulmasında HisMax-STAMP1 ve HisMax-STAMP2 konstraktlarının transfeksiyonlarını takip eden 24 saat sonunda HisMax vektöründe bulunan Zeosin antibiyotik dirençliliği gen parçacığı aracılığı ile antibiyotik seleksiyonu başlatılmıştır. Bu amaçla; transfeksiyon esnasında hücreler üzerinde bulunan besleme ortamı uzaklaştırılıp, PBS yıkaması ve yeni besleme ortam ilavesini takiben Zeosin ilave edildi. Kullanılan antibiyotik konsantrasyonları hücre tipine bağlı olarak değişmektedir. Yapılmış olan deneylerde hücrelerin stabil hale geldiği transfekte edilmeyen hücrelerin tümünün ölümüyle ve bir ileri pasaja geçildiğinde yapılan protein ve RNA izolasyonunu takip eden cDNA sentezi ve konvansiyonel PCR ile doğrulanmaktadır.

### BULGULAR

#### Stamp Gen Dizilerinin Transferleri-

### Transfeksiyonları

Transfeksiyon verimliliği göz önüne alınarak aynı transfeksiyon re-ajanı bütün çalışma boyunca kullanıldı. Transfeksiyonlarda HisMax vektörüne yerleştirilmiş STAMP gen dizileri, FuGENE HD reajanı ile 24 saat süre ile transfeksiyona alındı.

### İmmünofloresan

STAMP ekspresyonları HisMax antijenine karşı geliştirilmiş antikorların kullanımı ile immünofloresan yöntemi ile gösterildi. PC3 hücre hatlarında yapılan immünofloresan çalışmalarında tanımlanmış yerleşimler floresan mikroskobisi ile alındı (Şekil 1,2).

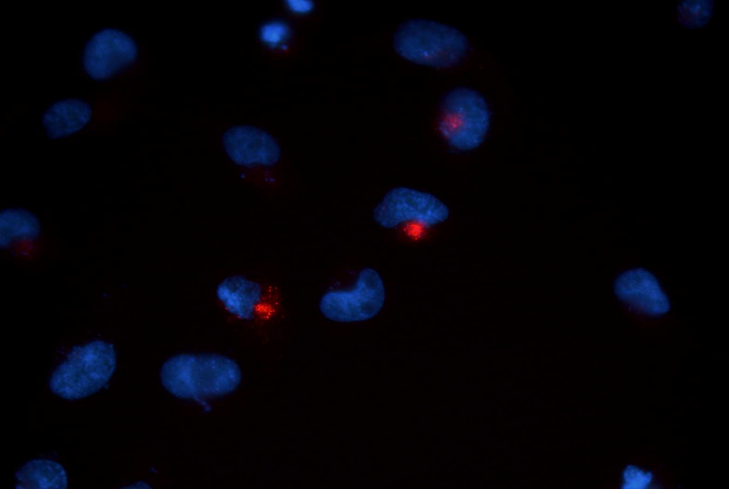
### Stabil Hücre Hatlarının Oluşturulması

Stabil hücre hatlarının oluşturulmasında HisMax-STAMP1 ve HisMax-STAMP2 konstraktlarının transfeksiyonlarını takip eden 24 saat sonunda HisMax vektöründe bulunan Zeosin antibiyotik dirençliliği gen parçacığı aracılığı ile antibiyotik seleksiyonu başlatılmıştır.

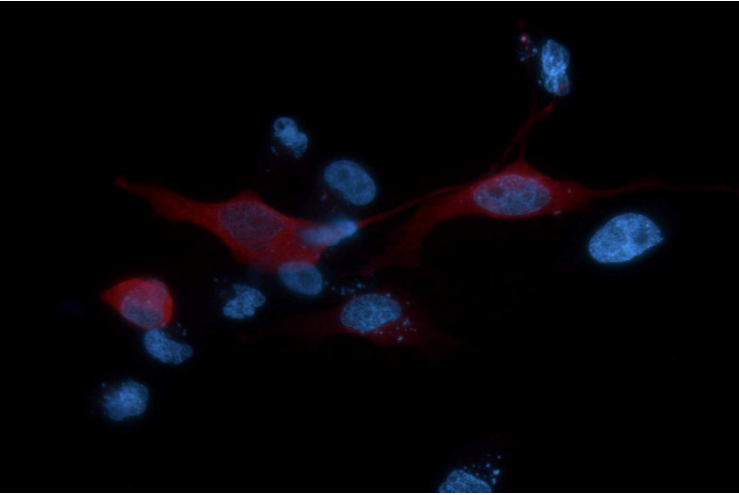
Bu amaçla; transfeksiyon esnasında hücreler üzerinde bulunan besleme ortamı uzaklaştırılıp, PBS yıkaması ve yeni besleme ortam ilavesini takiben Zeosin ilave edildi. Kullanılan antibiyotik konsantrasyonları hücre tipine bağlı olarak farklı uygulanmıştır. DU145 hücreleri için kullanılan miktar 100 mikrogram/ml iken PC3 hücreleri için seleksiyon 50 mikrogram/ml ile başlatılmış ve hücre ölümü olmadığından bir hafta sonra 100 mikrogram/ml'a çıkartılmıştır. Yapılmış olan deneylerde hücrelerin stabil hale geldiği transfekte edilmeyen hücrelerin tümünün ölümüyle ve bir ileri pasaja geçildiğinde yapılan protein ve RNA izolasyonunu takip eden cDNA sentezi ve konvansiyonel PCR ile doğrulanmaktadır.

PC3 hücrelerinin stabil hale getirilme çalışmasında konvansiyonel PCR'da kullanılan eşleşme ısısı 68°C'dir. PC3 hücrelerinde başlatılan çalışmada daha düşük antibiyotik düzeyi kullanıldığı için transfekte olmayan hücre grubunun ölümü yavaş olmaktadır ve yukarıda belirtildiği gibi antibiyotik dozu arttırılmıştır ve HisMax-STAMP2'nin PC3 hücrelerinde stabil hücre hattı oluşturulabilmiştir. STAMP1'e göre STAMP2 transfekte hücrelerin daha çabuk stabil hale gelmesinde STAMP2 varlığının hücre çoğalması üzerinde pozitif etki oluşturması rol oynuyor olabi-

lir. HisMax-STAMP1 ve HisMax-STAMP3 seleksiyonları mektedir (Şekil 3).  
PC3 ve diğer prostat kanser hücre hatlarında devam et-

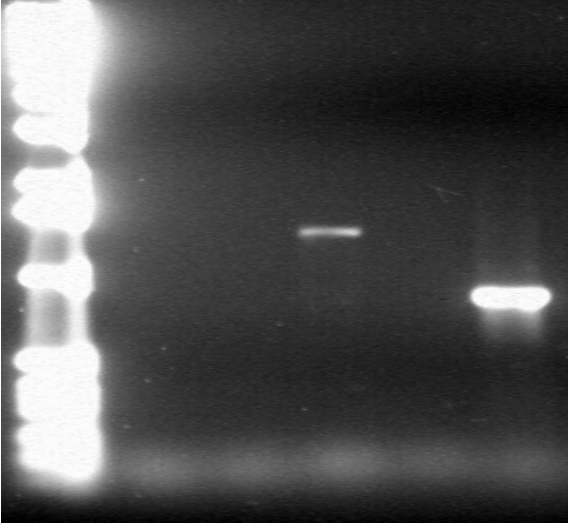


**Şekil 1.** HisMax-STAMP1-transfekte PC3 hücreleri



**Şekil 2.** HisMax-STAMP2-transfekte PC3 hücreleri

PC3



**Şekil 3.** HisMax-STAMP1 ve HisMax-STAMP2 stabil hücre kontrolü için yapılan konvansiyonel PCR ile STAMP gen amplifikasyonlarını gösteren agaroz jel

## TARTIŞMA

Transfeksiyon için seçilen yöntemin non-viral ya da viral olması da dikkat edilmesi gereken noktaları değiştirmektedir. Viral vektörler ile elde edilen yüksek transfer verimliliğine rağmen klinik kullanımında ciddi biyogüvenlik sorunları yaratma potansiyeli endişe yaratmaktadır. Viral yapısal komponentlere karşı iltahabi immünite gelişebilir ve host genom ile oluşabilecek rekombinasyon olayları istenmez. Örnek olarak sunulan Gendicine de kullanılan adenoviral vektör, E1 bölgesinde delesyon bulunan replikasyon-incompetent serotip5 (Ad5)'tir ve oluşturduğu infeksiyon bir defaya mahsustur ve adenoviral genom, host genom DNA'sına integre olmaz. Viral vektörler, terapötik genlerin taşınması sırasında ancak küçük moleküllerin taşınmasına olanak verir.

Non-viral sistemlerde ise gen transferinde kullanılan çözelti, serum varlığı ya da yokluğu, lipid –DNA oranları gibi etkenler transfeksiyon verimliliğini değiştirmekte ve kullanılan in vitro sistem yani hücre tipine göre optimizas-

yonlarını zorunlu kılmaktadır.

Non-viral katyonik polimerler: polilizinler ve polietileniminler, yoğunlaşma yetenekleri ve dolayısıyla DNA'yı DNaz yıkımına karşı korudukları için hücrelerde transfeksiyonda başarıyla kullanılmaktadırlar. Daha az immünojenik doğaları ve büyük DNA parçaları taşıyabilmeleri, hazırlanmalarının kolaylığı nedeniyle vücut hücrelerine yapılacak gen transferinde non-viral transfeksiyon seçeneği olarak tercih edilirler. Olumsuz yönleri olarak ise belirgin düzeyde sitotoksikite göstermeleri ve tam olarak biyoyıkılıma uğramamaları verilebilir.

Non-viral katyonik lipidler aracılıklı gen transferinde yer aldığı düşünülen evreler:

1. lipid-DNA kompleksinin hücresel endositotik yolakla alımı,
2. DNA'nın endozomlardan hücre sitoplazmasına salınımı ve
3. DNA'nın hücre çekirdeğine transportunu takiben transkripsiyon ve gen ekspresyonu olarak verilebilir.

İlk non-viral yöntem olarak verilen presipitasyon oluşturan tuzlar- Kalsiyum fosfat metodu, Gliserol şoku ilavesi ile ya da şok uygulanmadan hücreler üzerinde DNA dizilerinin çöktürülmesi ile yapılan son derece etkili ve ekonomik bir transfeksiyon metodudur. Gliserol şoku, hücre membranında delikler oluşturarak DNA girişini kolaylaştırır.

Normal fonksiyon gösteren gen kopyaları ile yapılan gen tedavileri ile kalıtsal hastalıklar, viral enfeksiyonlar ve kanser gibi hastalıklarla mücadelede ilerlemeler gerçekleşmektedir. Kanser tedavisi dışında transfeksiyonun yer aldığı araştırmalar da mevcuttur. Hemofili A ve B tipine karşı yapılan adenoviral gen terapisi uygulamaları henüz sadece hayvan deneyleri aşamasındadır. Duchenne Muskuler Distrofi (DMD) tedavisinde yapılması onaylanan Distrofin adenoviral gen terapisi, Amerika Birleşik Devletleri'nde onay almış ilk örnek klinik incelemedir (17). Bu çalışmaların önderliğinde yapılan adenoviral gen transfer çalışmaları ile kardiyovasküler sistem ve bunun gibi sinyal transdüksiyonun incelendiği araştırmalarda ko-transfeksiyon uygulaması ile dominant- pozitif ve dominant-negatif konstraktların etkileri, gen susturma- siRNA tekniklerinin karşılaştırılması uygulanması mümkün olmaktadır (18).

Laboratuvarımızda çalışılmakta olan prostat kanseri ve prostata spesifik genler arasında androjen regülasyonu gösteren STAMP2, trans-golgi ağında gösterdiğimiz yerleşimi ile transfeksiyon ve immüno Floresan için çok ideal bir örnektir. STAMP gen ailesi olarak tanımladığımız prostata özgül genlerin prostat kanserinin ileri fazındaki bazı örneklerde ekspresyonunda artış ve STAMP2'nin ektopik ekspresyonu ile hücre büyümesi ve koloni formasyonunda artış gösterilmiştir fakat prostat kanser hücrelerindeki apoptoz aracılıklı yollar, moleküler dinamiklerin çalışılmamış olması grubumuzu bu konuda çalışma yapmaya yöneltmiştir (13).

**TEŞEKKÜR:** Bu çalışma Ceren Gönen Korkmaz'ın TÜBİTAK SBAG 3504 no'lu projesi tarafından desteklenmiştir.

#### KAYNAKLAR

1. Zhou J, Wu Y, Henderson F et al. Adenoviral gene transfer of a mutant surfactant enzyme ameliorates pseudomonas-induced lung injury. Gene ther 2006;13: 974-985.
2. Indraccolo S, Moserle L, Tisato V et al. Gene therapy of ovarian cancer with ifn-alpha-producing fibroblasts: comparison of constitutive and inducible vectors. Gene ther 2006;13:953-965.
3. Jakobsson J, Nielsen Tt, Staffin K, Georgievska B, Lundberg C. Efficient transduction of neurons using ross river glycoprotein-pseudotyped lentiviral vectors. Gene ther 2006;13:966-973.
4. Misteli, T, Spector DL. RNA polymerase II targets pre-mrna splicing factors to transcription sites in vivo Mol Cell 1999;3, 697-705.
5. Peng Z, Yu Q, Bao L. The application of gene therapy in china. Idrugs 2008;11:346-350.
6. Figueiredo MÍ, Kao C, Wu L. Advances in preclinical investigation of prostate cancer gene therapy. Molecular Therapy 2007; 15: 1053–1064.
7. Freytag SO, Stricker H, Movsas B, Kim JO. Prostate cancer gene therapy clinical trials. Molecular Therapy 2007; 15: 1042–1052.
8. Huggins C, Hodges, CV. Studies on prostatic cancer. I. the effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. J Urol 2002;1941;167: 948-951; discussion 952.
9. Crawford ED, Rosenblum M, Ziada AM, Lange PH. Hormone refractory prostate cancer. Urology, 1999;54: 1-7.
10. Freytag SO, Movsas B, Aref I, et al. Phase i trial of replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy combined with imrt for prostate cancer. Molecular Therapy, 2007;15:1016-1023.
11. Hubert RS, Vivanco I, Chen E et al. Steap: a prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors. Proc Natl Acad Sci USA 1999;7; 96: 14523-14528.
12. Korkmaz KS, Elbi C, Korkmaz CG et al. Molecular cloning and characterization of stamp1, a highly prostate-specific six transmembrane protein that is overexpressed in prostate cancer. J Biol Chem 2002; 277: 36689-36696.
13. Korkmaz CG, Korkmaz KS, Kurys P et al. molecular cloning and characterization of stamp2, an androgen regulated six-transmembrane protein that is overexp-

- ressed in a subset of prostate cancers. *Oncogene* 2005;21; 24:4934-4945.
14. Moldes M, Lasnier F, Gauthereau X et al. Tumor necrosis factor-alpha-induced adipose-related protein (tiarp), a cell-surface protein that is highly induced by tumor necrosis factor-alpha and adipose conversion. *J Biol Chem* 2001;276: 33938-33946.
  15. Steiner MS, Zhang X, Wang Y, Lu Y. Growth inhibition of prostate cancer by an adenovirus expressing a novel tumor suppressor gene, phyde. *Cancer Res* 2000;15; 60:4419-4425.
  16. Passer Bj, Nancy-Portebois V, Amzallag N et al. The p53-inducible tsap6 gene product regulates apoptosis and the cell cycle and interacts with nix and the myt1 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2284-2289.
  17. Xiao X, Li J, Samulski RJ. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol* 1996;70:8098-8108.
  18. Yao Y, Yin H, Shen B et al. Tissue kallikrein promotes neovascularization and improves cardiac function by the akt-glycogen synthase kinase-3b pathway cardiovascular research. 2008; 80: 354-364.