

**Hormona Dirençli Prostat Kanseri Hücrelerinde Doksetaksel'in
Tetiklediği Apoptozisde Seramid Genlerinin Ve Ürünlerinin
Rolleri**

Proje No: 109S215

Doç. Dr. Yusuf BARAN

OCAK 2011
ANKARA

ÖNSÖZ

Prostat kanseri günümüzde erkeklerde görülen en sık malignite ve ikinci en sık ölüm nedenidir. Prostat kanserinde standart tedavi gören olguların önemli bir bölümünde zamanla tedaviye direnç gelişmektedir. Bu hastalarda etkin bir tedavi yöntemi ise bulunmamaktadır. Androjenden bağımsız hale gelmiş prostat kanseri hücreleri için kullanılan etkili tedavi yöntemlerinden biri kemoterapidir. Günümüzde tekli ve kombinasyon kemoterapi tedavisi kullanılarak yapılan birçok klinik araştırma devam etmektedir.

Metastatik prostat kanser hastalarında dosetaksel kullanımı, FDA tarafından onaylanmış ve bu ilacın kullanımının hastanın yaşam kalitesini ve süresini uzattığı gözlenmiştir. Bir sfingolipid olan seramid, hücrede ikinci haberci olup, hücrelerin büyümesinden çoğalmasına, yaşlamasından apoptoza kadar önemli hayati olayları yönetir. Seramid birçok farklı biyokimyasal yolla oluşabilir. Glukozilseramid sentaz (GCS), apoptotik seramidi antiapoptotik glukozilseramide dönüştürürken sfingozin kinaz-1 (SK-1) enzimi ise apoptotik seramidi antiapoptotik sfingozin-1-fosfata (S1F) dönüştürür. Dirençli hücre hatlarında ve dirençli hastaların kanserli doku örneklerinde GSS ve SK-1 enzimlerinin aşırı eksprese edildiği belirlenmiştir. Son dönemlerde yapılan çalışmalar, hücrede *de novo* seramid üretiminin arttırılması, hücrelere dışarıdan seramid uygulanmasının veya seramidi diğer antiapoptotik ürünlere dönüştüren enzimlerin inhibisyonunun hücrelerin büyüme ve çoğalmasını engellediğini ve hücrelerde apoptozu indüklediğini göstermiştir.

Gerçekleştirdiğimiz bu çalışma ile ilk defa bioaktif sfingolipid metabolizmasının apoptotik seramidlerin sentezlenmesi veya birikiminin arttırılması yönünde hedeflenmesi ile dosetakselin apoptotik ve antiproliferatif etkilerinin önemli derecede arttırıldığı gösterilmiştir.

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından 109S215 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	2
İÇİNDEKİLER.....	3
TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ.....	5
ÖZET.....	7
ABSTRACT.....	8
GİRİŞ.....	9
GENEL BİLGİLER	10
GEREÇ VE YÖNTEM.....	12
Hücre Hatları.....	12
PC-3 ve DU145 Hücreleri.....	12
Dosetaksel.....	12
İnsan PC-3 ve DU-145 Prostat Kanseri Hücrelerinin Besi Yerleri ve Üreme Koşulları.....	12
İnsan PC-3 ve DU-145 Prostat Kanseri Hücrelerinin Pasajlanması.....	12
Dosetaksel ve PDMP veya SK-1 İnhibitörü veya C8:Seramid Kombinasyonunun PC-3 ve DU-145 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin XTT Yöntemi ile Belirlenmesi.....	12
Kombinasyon Uygulamalarının İzoblogram Analizleri.....	13
Kaspaz-3 enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	13
Mitokondri zar potansiyelinin belirlenmesi.....	14
Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Yöntemi ile Seramid Metabolizması Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi.....	15
BULGULAR.....	16
Dosetakselin PC-3 ve DU-145 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri.....	16
C8:seramidin PC-3 ve DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	17
PDMP'nin PC-3 ve DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	17
SK-1 inhibitörünün PC-3 ve DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	18
Dosetaksel/C8:seramid kombinasyonunun PC-3 ve DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	19
Dosetaksel/PDMP kombinasyonunun PC-3 ve DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	20
Dosetaksel/SK-1 inhibitörü kombinasyonunun PC-3 ve DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	21

Kombinasyonların İzobologram Analizleri.....	22
Dosetaksin Yalnız ve C8:seramid, PDMP ve SK-1 inhibitörü ile kombine uygulandığı PC-3 hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler.....	24
Dosetaksin Yalnız ve C8:seramid, PDMP ve SK-1 inhibitörü ile kombine uygulandığı DU-145 hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler.....	25
Dosetaksin Yalnız ve C8:seramid, PDMP ve SK-1 inhibitörü ile kombine uygulandığı PC-3 hücrelerinde mitokondri zar potansiyelinde meydana gelen değişimler.....	26
Dosetaksin Yalnız ve C8:seramid, PDMP ve SK-1 inhibitörü ile kombine uygulandığı DU-145 hücrelerinde mitokondri zar potansiyelinde meydana gelen değişimler.....	27
Dosetaksiel Uygulaması ile Seramid Metabolize Eden Genlerin Ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler.....	29
TARTIŞMA/SONUÇ.....	31
REFERANSLAR.....	34
TÜBİTAK PROJE ÖZET BİLGİ FORMU.....	37

TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

Tablo 1 . Çalışmamızda kullanılan primerler.....	15
Şekil 1. Dosekselin PC-3 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	16
Şekil 2. Dosekselin DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	16
Şekil 3. C8:seramidin PC-3 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	17
Şekil 4. C8:seramidin DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	17
Şekil 5. PDMP'nin PC-3 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	18
Şekil 6. PDMP'nin DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	18
Şekil 7. SK-1 inhibitörünün PC-3 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	19
Şekil 8. SK-1 inhibitörünün DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	19
Şekil 9. Doseksel/C8:seramid kombinasyonunun PC-3 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	20
Şekil 10. Doseksel/C8:seramid kombinasyonunun DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	20
Şekil 11. Doseksel/PDMP kombinasyonunun PC-3 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	21
Şekil 12. Doseksel/PDMP kombinasyonunun DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	21
Şekil 13. Doseksel/SK-1 inhibitörü kombinasyonunun PC-3 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	22
Şekil 14. Doseksel/SK-1 inhibitörü kombinasyonunun DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	22
Şekil 15. PC-3 hücrelerin üzerine dosekselin C8:seramid, PDMP ve SK-1 inhibitörü ile kombinasyonunun sinerjistik etkileri.....	23
Şekil 16. DU-145 hücrelerin üzerine dosekselin C8:seramid, PDMP ve SK-1 inhibitörü ile kombinasyonunun sinerjistik etkileri.....	24
Şekil 17. PC-3 hücrelerinde hücre içi seramid konsantrasyonunun biyokimyasal yöntemlerle artırılması ile dosekselin apoptotik etkisinin artırılması.....	25
Şekil 18. DU-145 hücrelerinde hücre içi seramid konsantrasyonunun biyokimyasal yöntemlerle artırılması ile dosekselin apoptotik etkisinin artırılması.....	26
Şekil 19. PC-3 hücrelerinde hücre içi seramid konsantrasyonunun biyokimyasal yöntemlerle artırılması ile dosekselin apoptotik etkisinin artırılması.....	27

Şekil 20. DU-145 hücrelerinde hücre içi seramid konsantrasyonunun biyokimyasal yöntemlerle artırılması ile dosetakselin apoptotik etkisinin artırılması.....	29
Şekil 21. 0,1-, 1- ve 10 nM dosetaksel uygulanan PC-3 hücrelerinde seramid metabolize eden genlerin ekspresyon analizleri.....	30
Şekil 22. 0,1-, 1- ve 10 nM dosetaksel uygulanan DU-145 hücrelerinde seramid metabolize eden genlerin ekspresyon analizleri.....	30

ÖZET

Bu araştırmada, androjenden bağımsız prostat kanser hücrelerinin durdurulması yönünde önemli rol oynayan LASS geni ve glukosilseramid sentaz (GSS), sfingozin kinaz-1 (SK-1) genlerinin ekspresyon düzeyleri tespit edilerek, seramid/sfingozin-1-fosfat ve seramid/glukosilseramid'in muhtemel rolleri incelendi. Dosetaksel, C8:seramid, GSS ve SK-1 inhibitörünün sitotoksik etkileri XTT hücre proliferasyon tekniği kullanılarak araştırıldı. Mitokondri zar potansiyeli (MZP) ve kaspaz-3 enzim aktivitesindeki değişiklikler kaspaz-3 ve JC-1 MMP kiti kullanılarak ölçüldü. Seramid metabolize eden genlerin ekspresyon düzeyleri RT-PCR kullanılarak incelendi.

Bulunan sonuçların birbirini doğruladığı üzere, DU-145 ve PC-3 prostat kanser hücrelerinde, C8:seramid ve GSS, SK-1 inhibitörleri ile dosetaksel kombinasyonlarının, sitotoksik ve kaspaz-3 enzim aktivitesini arttırarak ve mitokondri zar potansiyelini bozarak önemli ölçüde sinerjistik etki ortaya çıkardıkları tespit edilmiştir. Bulunan sonuçlar, izobalogram analizleri ile de doğrulanmıştır. Daha da önemlisi, RT-PCR sonuçları dosetaksel ile muamele edilen hücrelerde, GSS ve SK-1 genlerinin ekspresyonlarında azalma ve LASS genlerinin ekspresyonlarında ise artış olduğunu göstermiştir.

Elde edilen bu veriler, androjenden bağımsız prostat kanser hücrelerinde dosetakselin indüklediği apoptozda, seramid metabolize eden genlerin ve gen ürünlerinin önemli rolleri olduğunu anlamamıza yardım etmiştir.

Anahtar Kelimeler: Prostat Kanseri, Bioaktif Sfingolipidler, Seramidler, Dosetaksel.

ABSTRACT

In this study, we examined the possible roles of the ceramide/sphingosine-1-phosphate and ceramide/glucosyleceramide by examining expression levels of glucosyleceramide synthase (GCS), sphingosine kinase-1 (SK-1) and LASS gene family which can play important roles to overcome androgen independent prostate cancer.

Cytotoxic effects of docetaxel, C8:ceramide, GCS and SK-1 inhibitor were determined by XTT cell proliferation assay. Changes in caspase-3 enzyme activity and mitochondrial membrane potential (MMP) were measured using caspase-3 colorimetric assay kit and JC-1 MMP detection kit, respectively. Expression levels of ceramide metabolising genes were examined by RT-PCR.

The results, confirming each other, showed that the combinations of C8:ceramide or GCS and SK-1 inhibitors with docetaxel have considerable synergistic effects, as confirmed by isobalogram analysis, on cytotoxicity and apoptosis through increase in caspase-3 enzyme activity and decrease in mitochondrial membrane potential in human DU-145 and PC-3 prostate cancer cells. More importantly, RT-PCR results revealed that there were downregulation in expression levels of GCS, SK-1 genes and upregulation in expression levels of LASS genes in response to docetaxel.

These data pioneered to understanding of underlying mechanisms which showed involvement of ceramide metabolizing genes and their products in docetaxel induced apoptosis in androgen independent prostate cancer cells.

Keywords: Prostate cancer, Bioactive Sphingolipids, Ceramides, Docetaxel.

GİRİŞ

Hormona dirençli hale gelmiş, ileri evre prostat kanseri fatal seyirlidir ve her türlü tedaviye rağmen hastalar kısa süre içerisinde hayatlarını kaybetmektedir. Bu nedenle yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır.

Araştırmamızda hücelere dışarıdan bir seramid analogu olan C8-seramid, GSS inhibitörü olan PDMP ve SK1 inhibitörü uygulanarak hücre içi seramid sentezi ve birikimi artırılmış ve bu artışın dirençli prostat kanseri hücrelerinin dosetaksele duyarlılığını nasıl etkilediği belirlenmiştir. Bu incelemeler XTT hücre çoğalma yüzdeleri, kaspaz-3 enzim aktivitesi, mitokondri zar potansiyeli gibi yöntemlerle moleküler düzeyde gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşım ile prostat kanseri hücrelerine dosetaksel uygulamanın yanı sıra seramid metabolizmasının hedeflenmesinin ilaç duyarlılığını arttırdığı belirlenmiştir.

Öte yandan, artan dozlarda dosetaksel uygulanan prostat kanseri hücrelerinde, seramid metabolizması genelerinin (Lass1, -2, -4, -5, -6, GSS, SK1) ekspresyon analizleri RT-PCR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlarımız, dosetaksel uygulamaları ile her iki hücre hattında da SK1 ve GSS genlerinin ekspresyon düzeylerinde azalma olduğunu göstermiştir. Dosetaksel PC-3 hücrelerinde LASS1, LASS2 ve LASS6 genlerinin ekspresyon düzeylerini arttırırken, DU-145 hücrelerinde sadece LASS1 geninin ekspresyonunu arttırmıştır.

Elde edilen sonuçlar bir bütün olarak değerlendirildiğinde, seramid metabolizmasını hedeflemenin terapötik potansiyelleri olduğu ve özellikle klinikte uygulanan ajanlarla beraber uygulandığında kuvvetli sinerjistik hücre ölümlerini tetikleyeceği görülmüştür.

GENEL BİLGİLER

Prostat kanseri, ileri yaştaki erkeklerde daha sık görülen bir kanser türü olup, kansere bağlı ölümlerin ikinci sıradaki nedenidir. Moleküler biyoloji ve epidemiyolojideki yeni gelişmeler prostat kanseri biyolojisi ve etiyolojisine yeni bir bakış açısı getirmiştir. Bu gelişmeler ışığında, bu hastalığın daha iyi anlaşılması sağlanacak ve gelecekte prostat kanserinin önlenmesi ve tedavi edilmesi için yeni bir umut ışığı olacaktır. Batı ülkelerinde daha yüksek oranda olmakla beraber prostat kanserinin sıklığı ve mortalite oranı çeşitli ülkeler arasında oldukça değişkendir. Bu çeşitliliğin nedeni temelde genetik ve çevresel değişimlerden kaynaklanır (VISAKORPI, 1998; SCHULZ, 2003; BASLER, 2007; KISH, 2001; TING 2007).

Prostat kanserine 65 yaşın üzerindeki erkek hastalarda daha fazla rastlanılmaktadır. Bu hastalığın başlangıcı ve ilerleyişi henüz tam olarak bilinmemekle beraber genetik ve çevresel faktörlerin hastalığın gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Yapılan klasik ve moleküler epidemiyolojik çalışmalar prostat kanserinin gelişimini tetikleyen birçok potansiyel risk faktörleri olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmalarda prostat kanserinin aile içi görülme olasılığının yüksek olması bu hastalığın genetik olabileceğini ve bu şekilde gelişen prostat kanserinin daha agresif bir tablo çizebileceğini göstermiştir. Prostat kanseri başlangıcı ve gelişimi androjenler tarafından etkilenir. Prostat tümörü androjene oldukça duyarlıdır ve tedavide, medikal ve cerrahi kastrasyonla baskılanır. Metastatik prostat kanserinde standart tedavinin androjen ablasyonu olmasına rağmen, olguların önemli bir bölümünde zamanla tedaviye direnç gelişecektir. Bu hastalarda kemoterapi, süregelen ana tedavi yöntemlerinden bir tanesidir. Klinik çalışmalarda, androjene direnç gelişmiş hastalarda bir yarı sentetik taksan olan dosetakselin prostat spesifik antijen (PSA) düzeyini düşürdüğü ve hastalığın semptomlarını iyileştirdiği gözlemlenmiştir. Dosetaksel diğer taksan ailesindeki ilaçlar gibi Beta tübülünlere bağlanarak mikrotübül depolimerizasyonunu ve mitozu bozar ve hücre siklusunu G2-M fazında geciktirir (VISAKORPI, 1998; SCHULZ, 2003; BASLER, 2007; KISH, 2001; TING 2007).

Seramidler hücre metabolizmasında hücrelerin büyümesinden çoğalmasına, programlı hücre ölümlerinden yaşlanmaya kadar birçok önemli olayda temel rolleri olan hücre içi moleküllerdir. Seramidler sfingomyelinleri seramide dönüştüren sfingomyelinaz ve/veya de novo olarak seramid sentaz enzimi ile sentezlenmektedirler. Farklı çalışmalarda uygulanan kemoterapötik ajanlara karşı seramid miktarlarında önemli bir artış olduğu gösterilmiştir. Bunun yanısıra uygulanan antikanser ajanlara olumlu yanıt vermeyen hücre hatları ve kanser hastalarında ise seramidin üretiminde ve/veya metabolizmasında önemli sapmalar olduğu

belirlenmiştir. Bu sapmaların temelinde hücrede seramidlerin sentezinden sorumlu olan insan longevity assurance gen ailesine (LASS) ait 6 genin (LASS1, -2, -3, -4, -5, -6) ekspresyon düzeyindeki düşüşler, seramidi glukozil seramid ve sfingozin 1 fosfata dönüştüren glukozil seramid sentaz ve sfingozin kinaz-1 genlerinin ekspresyon düzeylerindeki artışlar olduğu bilinmektedir (MACCHIA, 2003; HANNUN, 2008; SENCHENKOV, 2001; GOUAZÉ-ANDERSSON, 2007).

Çeşitli memeli hücrelerinde seramid oluşumunun altta yatan ana mekanizmalarından biri olan de novo seramid sentezi LASS1-6 genleri tarafından düzenlenmektedir. Lass ailesi, ökaryot hücrelerinde korunarak günümüze kadar gelmiş seramide genleridir. Lass ailesi üyelerinin ekspresyon düzeyleri her doku tipinde farklıdır. Yapılan çalışmalarda farklı memeli hücrelerinde, bu genlerin her birinin fazla ekspresyonu sonucunda farklı uzunlukta ve işlevde seramid oluşumunu düzenledikleri gösterilmiştir. Son zamanlarda Lass aktivitesi sonucu artan seramidin kemoterapinin indüklediği hücre ölümlerinin artışında önemli bir rolü olduğu anlaşılmıştır (OGRETMEN, 2006; SÉGUI, 2006).

Glukozil seramid sentaz enzimi seramide glukoz transfer ederek glukozil seramidi sentezler. Glukozil seramid hücrenin büyümesi, çoğalması, yayılması ve programlı hücre ölümlerinde oldukça önemli fonksiyonlara sahip bir moleküldür. Yüksek glukozil seramid sentaz aktivitesi kemoterapiye iyi yanıt veremeyen meme, epiteloid ve yumurtalık gibi farklı kanser türlerinde ilaç dirençliliğine neden olan önemli bir faktördür (LAVIE, 1996).

Sfingozin kinaz-1 geninin ürünü olan sfingozin-1-fosfat hücre içerisinde hücrenel farklılaşmayı, çoğalmayı, göçü ve apoptozu engellemeyi tetikleyici gibi önemli fonksiyonları olan bir ikincil mesajcıdır. Özellikle büyüme ve hayatta kalmayı teşvik eden birçok dış faktör sfingozin kinaz-1 genini aktive ederek hücre içi sfingozin-1-fosfat konsantrasyonlarının yükselmesine ve pro-apoptotik seramid miktarlarını azalmasına neden olmaktadır. Karşıt işleve sahip olan seramid ve sfingozin-1-fosfatın birbirine dönüşmesi özel enzimler tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Bu nedenle, seramidin sfingozine ve sfingozin-1-fosfata dönüşümü pro-apoptotik sinyalleri bloke etmekte ve hücreye yaşama ve bölünme ortamını sağlayan sinyaller yaratmaktadır. Sfingozin kinaz-1 geninin aşırı ekspresyonu hücrelerin kemoterapötik ajanlara karşı dirençliliğini artırırken, siRNA ile ekspresyonunun engellenmesi pro-apoptotik seramidin hücre içerisinde birikmesine ve dolayısı ile hücrelerin ilaçlara karşı duyarlılıklarının artmasına neden olmaktadır (BARAN, 2007; MELENDEZ, 2008; LEROUX, 2007).

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Hatları

PC-3 Ve DU145 Hücreleri

PC-3 androjen tedavisinden sonra gelişen metastatik prostat kanseri olan 62 yaşında beyaz bir erkeğin post-mortem kemik iliğinden izole edilmiştir. DU-145, 69 yaşındaki bir hastanın merkezi sinir sistemine metastaz yapmış olan tümör dokusundan alınmıştır.

Dosetaksel

Taksoid ailesinden olan dosetakselin, serbest tübülünleri bağlayarak stabil mikrotübüllerin içinde tübülünlerin polimerizasyonunu sağlayarak ve mikrotübüllerin ayrılmasını engelleyerek mitotik hücre bölünmesini engellediği bilinmektedir.

İnsan PC-3 Ve DU-145 Prostat Kanseri Hücrelerinin Besi Yerleri Ve Üreme Koşulları

PC-3 ve DU-145 hücreleri %10 fetal dana serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerinde üretilmişlerdir. Hücreler 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ ortamında karbondioksit inkübatöründe büyütülmüşlerdir.

İnsan PC-3 Ve DU-145 Prostat Kanseri Hücrelerinin Pasajlanması

PC-3 ve DU-145 hücreleri 3 günde bir pasajlanmıştır. Hücre kültür flaskından besiyeri uzaklaştırılmış ve yüzeye yapışık duran hücreler PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra hücrelerin üzerine 4 ml Tripsin-EDTA solüsyonundan ilave edilmiş ve inkübatörde 5 dakika beklenmiştir. Hücrelerin üzerine 4 ml besiyeri ilave edilmiş ve 1000 rpm de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı atılmış ve falkon tüpünün dibine çöken hücreler 15 mL besiyeri solüsyonunda çözülerek hücre kültür flaskına aktarılmıştır.

Dosetaksel ve PDMP Veya SK-1 İnhibitörü Veya C8:Seramid Kombinasyonun PC-3 Ve DU-145 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin XTT Yöntemi İle Belirlenmesi

Tetrazolium tuzlarının hücre proliferasyonu, hücre canlılığı ve/veya sitotoksosite analizleri için yaygın bir şekilde kullanıldığı bilinmektedir. XTT sitotoksosite testi, tetrazoliumun canlı hücrelerin mitokondrileri tarafından formazana çevrilmesi temeli üzerine kurulmuştur. Reaksiyon aktif mitokondrilere gerçekleştirilmekte, ölü hücreler ise bu işlemi gerçekleştirememektedir. XTT uygulaması gerçekleştirildikten sonra örnekler ELISA okuyucu tarafından analiz edilerek meydana gelen renk değişimine göre çoğalan hücre oranları belirlenmektedir (BARAN, 2007).

Çalışmamızda PC-3 ve DU-145 hücreleri 96 kuyucuklu kültür kaplarına (10.000 hücre/kuyucuk) ekilmiş ve dosetaksel + PDMP, dosetaksel + SK-1 inhibitörü ve dosetaksel + C8:seramid kombinasyonlarına artan dozlarda 72 saat boyunca maruz bırakılmışlardır. 72 saat

sonunda her göze aktifleştirilmiş XTT solüsyondan 50 µL eklenmiş ve karbondioksit inkübatöründe 37° C’de 4 saat daha bekletilmişlerdir. Hücrelerin çoğalma değerleri 490 nm dalga boyunda ELISA okuyucu ile optik yoğunluğun belirlenmesi ile elde edilen değerlerle hesaplanmıştır.

Hücre içi seramid miktarını arttırmaya yönelik dışardan C8:seramid veya hücre içinde sentezlenen apoptotik seramidi antiapoptotik glukozil seramide dönüştüren glukozil seramid sentaz inhibitörü olan PDMP veya apoptotik seramidi antiapoptotik sfingozin 1 fosfata dönüşümünü engelleyen SK-1 inhibitörü dosetaksel ile birlikte PC-3 ve DU-145 hücrelerine uygulanmış ve hücrelerin ölüm yüzdelerindeki değişimler incelenmiştir. Bu çalışmada, PDMP ve SK-1 inhibitörü hücreler üzerine glukozil seramid sentaz enzimini ve sfingozin kinaz-1 enzim aktivitesini inhibe eden ancak hücreler üzerine toksik etkisi olmayan bir doz (IC90) tercih edilirken, C8:seramid uygulaması ile hücrelerde apoptoz indüklenmeye çalışıldığından seramidin IC50 dozu dosetaksel ile kombine uygulanmıştır. Bu şekilde seramid metabolizmasının manipülasyonu ile dosetakselin apoptotik etkisinin artırılabilirliği test edilmiştir.

Kombinasyon Uygulamalarının İzobologram Analizleri

Dosetaksel/ C8:seramid, /PDMP, ve /SK-1 inhibitörü kombinasyonlarının olası sinerjistik, additif, nötral veya antagonistik etkilerinin belirlenmesi amacı ile CalcuSyn Windows bilgisayar programı (CalcuSyn software, Biosoft, UK) kullanılmıştır. Programa dataların girilmesinden sonra software tarafından bulunan CI değeri iki ajanın etkisinin nasıl olduğunun belirtilmesi için kullanılan bir terimdir. $CI < 1$ sinerji olduğunu, $CI = 0.1-0.5$ güçlü sinerji olduğunu, $CI < 0.1$ çok güçlü sinerjiyi, $CI = 1$ additif etkiyi, $CI > 1$ antagonist etkiyi, $CI = 3.3-10$ güçlü antagonist etkiyi ve $CI > 10$ çok güçlü antagonist etkiyi gösterir (ZHAO, 2010).

Kaspaz-3 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Kaspaz-3 enzim aktivitesindeki artış ve azalışlar programlı hücre ölümlerini birinci derecede etkileyen önemli bir parametredir. Enzim aktivitesindeki artışlar programlı hücre ölümlerini tetiklerken enzim aktivitesindeki azalışlar hücre ölümü engellemektedir. Çalışmamızın bu kısmı ile dosetakselin yalnız uygulandığı hücrelere göre, PDMP, SK-1 inhibitörü veya C8:seramid ile beraber uygulandığında bir sinerji meydana getirip getirmediği kaspaz-3 enzim aktivitesine bakılarak kantitatif olarak belirlenmiştir (BARAN, 2007).

Bu amaçlarla, dosetaksel yalnız ve PDMP veya SK-1 inhibitörü veya C8:seramid ile kombine uygulanarak PC-3 ve DU-145 hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesindeki olası değişimlerin belirlenmesi amacı ile Kaspaz-3 Kolorimetrik Kiti kullanılmıştır.

Bu amaçla 5×10^5 hücre 6 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyusunda 2 mL besiyerine ekilmiş ve 72 saat boyunca farklı dozlarda ilaca maruz bırakılmışlardır. 72 saat inkübe edildikten sonra, hücreler 800 rpm de 5 dk santrifuj edilerek toplanmıştır. Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 100 μ L soğutulmuş lysis buffer ilave edilip karıştırılmış ve buzun üzerinde 10 dk bekletilmiştir. Örnekler ependorf tüpe alınıp 15.000 rpm de 5 dk santrifuj edilmiş ve supernatant steril yeni bir ependorf tüpe alınmıştır. Aynı ayrı kuyucuklara 50 μ L supernatantlardan ve 50 μ L 2X reaksiyon bufferı 96 kuyucuklu flat bottom mikrolatelere ekim yapılmıştır. Daha sonra her kuyucuğa 5 μ L kaspaz-3 kolorimetrik substrat (DEVD-pNA) ilave edilerek 37 derecede 2 saat bekletilmiştir. Sonuçlar 405 nm dalga boyunda okunmuştur. Bu yöntemle PC-3 ve DU-145 hücrelerinde durağan ve ilaç uygulamaları sonrasında kaspaz-3 enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler ve kaspaz-3 enzim aktivitesinin seramid metabolizmasının hedeflendiği ve dosetaksele maruz bırakılan prostat kanseri hücrelerinde nasıl etkilendiği belirlenmiştir.

Mitokondri Zar Potansiyelinin Belirlenmesi

Mitokondri zar potansiyeli programlı hücre ölümlerinde önemli bir fonksiyona sahiptir. Mitokondri zar potansiyelinin azalması ile mitokondri içerisinde bulunan sitokrom-c sitoplazmaya salınarak kaspaz enzimlerini aktiveleştirir ve bu durum hücrelerin ölümü ile sonuçlanır. Bu çalışmada ile dosetakselin indüklediği hücre ölümünde mitokondri zar potansiyelinin rolü belirlenmiştir. Öte yandan, dosetakselin yalnız ve PDMP, SK-1 inhibitörü veya seramid ile uygulandığı hücrelerde mitokondri zar potansiyeli belirlenerek ölçülmüş ve kombinasyon uygulamanın programlı hücre ölümleri üzerine sinerjistik bir etki yaratıp yaratmadığı belirlenmiştir (BARAN, 2007).

PC-3 ve DU-145 hücrelerinde mitokondri zar potansiyelinin belirlenmesi amacı ile JC-1 mitokondri zar potansiyeli belirleme kiti kullanılmıştır. Bu amaçla 5×10^5 hücre 6 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyusunda 2 mL besiyerine ekilmiş ve 72 saat boyunca farklı dozlarda ilaca maruz bırakılmışlardır. Hücre süspansiyonu 800 rpm de 5 dk sentrifuj edilerek hücreler toplanmıştır.

Hücreler 0.5 mL 1X JC-1 kimyasalı ile sulandırılıp hücre süspansiyonu 37 °C de %5 CO2 inkübatöründe 15 dakika inkübe edilmiş ve 800 rpm de 5 dk santrifuj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 2 mL besiyerine ekilmiş ve tekrar santrifuj edilmiştir. Hücre pelleti 0.5 mL taze besiyerinde sulandırılmış ve akım sitometride analiz edilmiştir. Bu yöntemle PC-3 ve DU-145 hücrelerinde durağan ve dosetaksel ve PDMP veya SK-1 inhibitörü veya C8:seramid uygulamaları sonrasında mitokondri zar potansiyelinde

meydana gelen değişimler ve mitokondri zar potansiyelinin hücre ölümlerine etkileri belirlenmiştir.

Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Yöntemi İle Seramid Metabolizması Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Dosetaksel uygulanan hücrelerde seramidi metabolize eden genlerin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi, dosetakselin indüklediği hücresele ölümlerde seramid metabolizması genlerinin rolünün belirlenmesi açısından son derece önemlidir. Bu amaçla, RT-PCR yöntemi ile artan dozlarda ve farklı zaman dilimlerinde dosetaksel uygulanan PC-3 ve DU-145 hücrelerinden RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'lardan Ters Transkriptaz enzim kiti kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezi yapılmıştır. Daha sonra uygun primerler kullanılarak ilgili genlerin ekspresyon düzeyleri real time-PCR yöntemi ile belirlenmiştir.

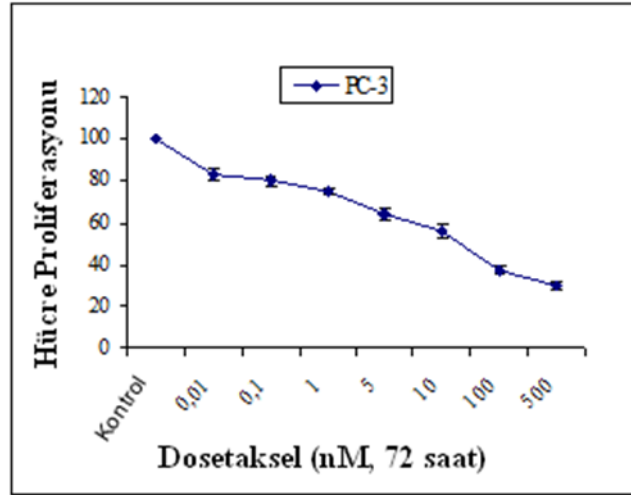
Real time-PCR sonucunda elde edilen ürünlerin yoğunluk analizi yapılmış ve ekspresyon düzeyindeki değişimler kontrol grubu ile karşılaştırılarak tartışılmıştır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan primerler (BARAN, 2007).

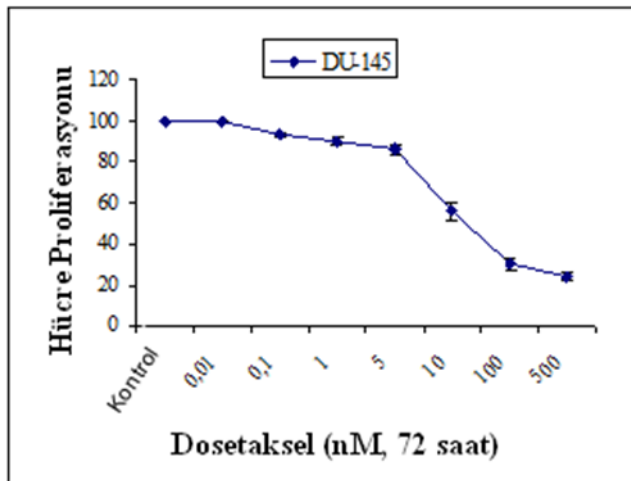
GSS-F	5'ATGACAGAAAAAGTAGGCT3'
GSS-R	5'GGACACCCCTGAGTGGAA3'
LASS1-F	5'CTATACATGGACACCTGGCGCAA3'
LASS1-R	5'TCAGAAGCGCTTGTCTTCACCA3'
LASS2-F	CCCTCGAGGGATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGATGCTCC AGACCTTGTATGATT 3'
LASS2-R	5'CGGAATTCCGTCAGTCATTCTTACGATGGTT3'
LASS3-F	5'-GGTCTCTGCAAGAATTCAGGGCTTACG-3'
LASS3-R	5'-CATCATGATCTTCCAGGTCTGAC-3'
LASS5-F	5'CCCTCGAGGGATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGATGGCG ACAGCAGCGCAGGGA 3'
LASS5 -R	5'CGGAATTCCGTTACTCTTCAGCCCAGTAGCT 3'
LASS6-F	5'CCCTCGAGGGATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGATGGCA GGGATCTTAGCCTGG 3'
LASS6-R	5'CGGAATTCCGTTAATCATCCATGGAGCAGGA 3'
SK-1-F	5'CCGACGAGGACTTTGTGCTAAT3'
SK-1-R	5'GCCTGTCCCCCAAAGCATAAC3'
Beta actin-F	5'CAGAGCAAGAGAGGCATCCT3'

BULGULAR**Dosetakselin PC-3 Ve DU-145 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri**

Dosetakselin PC-3 ve DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri XTT yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla PC-3 ve DU-145 hücrelerine artan dozlarda (0,01-500 nM) dosetaksel 72 saat boyunca uygulanmış ve ilaç uygulanmayan kontrol grubu hücrelerine göre çoğalma yüzdeleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar dosetakselin PC-3 ve DU-145 hücreleri üzerine doza bağımlı olarak antiproliferatif ve sitotoksik etkisi olduğunu göstermiştir (Şekil 1 ve 2). Hücre büyüme grafiği sonuçları PC-3 (Şekil 1) ve DU-145 (Şekil 2) hücrelerinde dosetakselin IC50 değerlerinin sırayla 38.4- ve 30 nM olduğunu göstermiştir.



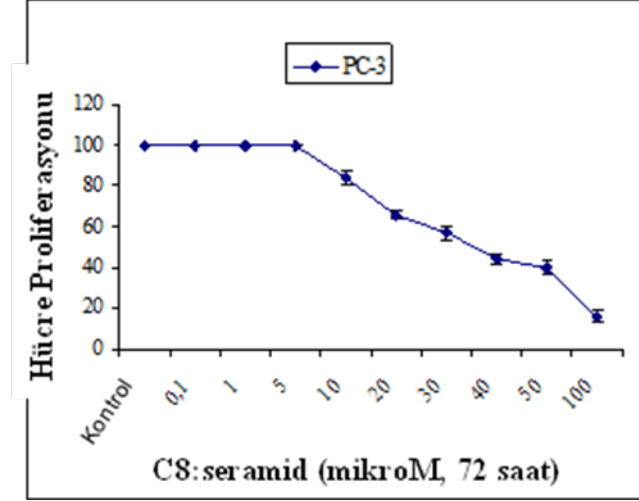
Şekil 1. Dosetakselin PC-3 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.



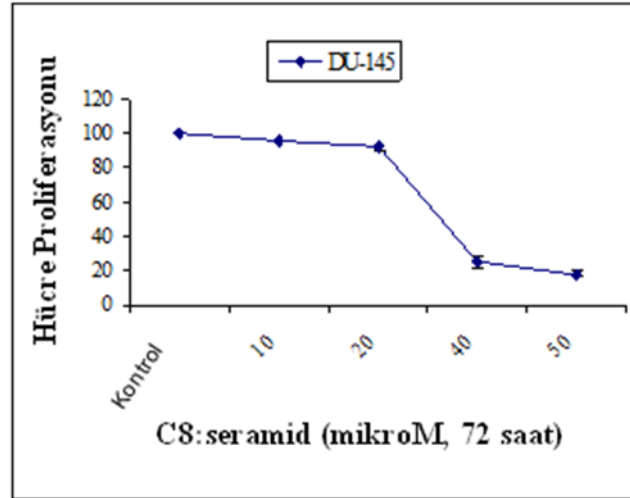
Şekil 2. Dosetakselin DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.

C8:seramidin PC-3 Ve DU-145 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri

Prostat kanseri hücreleri 72 saat boyunca artan dozlarda C8:seramide (Şekil 2) maruz bırakılmışlardır. Hücrelerin çoğalma grafiğinden, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde C8:seramidin IC50 değeri sırasıyla 35 (Şekil 3) ve 33 μ M (Şekil 4) olarak hesaplanmıştır.



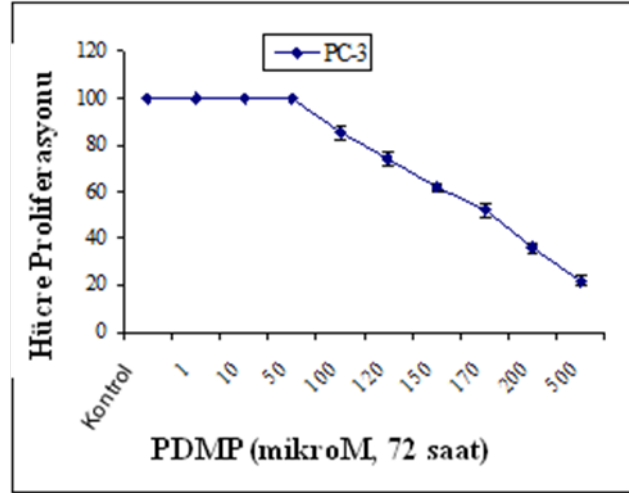
Şekil 3. C8:seramidin PC-3 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.



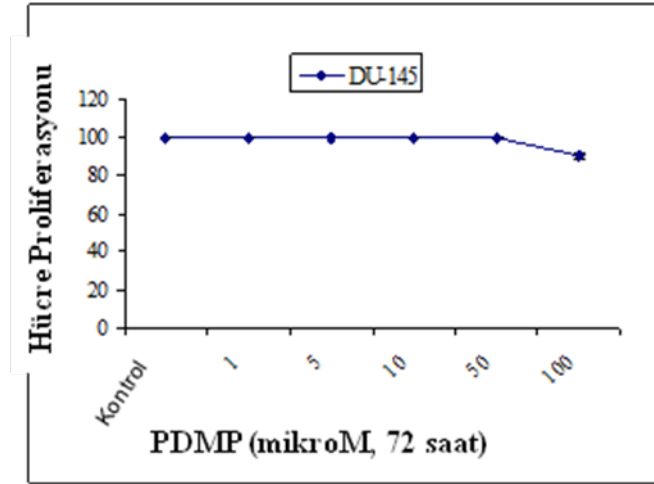
Şekil 4. C8:seramidin DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.

PDMP'nin PC-3 Ve DU-145 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri

Prostat kanseri hücreleri 72 saat boyunca artan dozlarda PDMP'ye (Şekil 5 ve 6) maruz bırakılmışlardır. Hücrelerin çoğalma grafiğinden, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde PDMP'in IC10 değeri 85 (Şekil 5) ve 100 μ M (Şekil 6) olarak hesaplanmıştır.



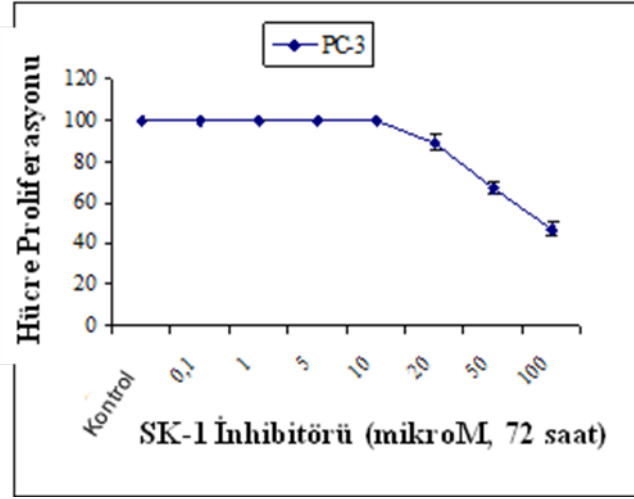
Şekil 5. PDMP'nin PC-3 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.



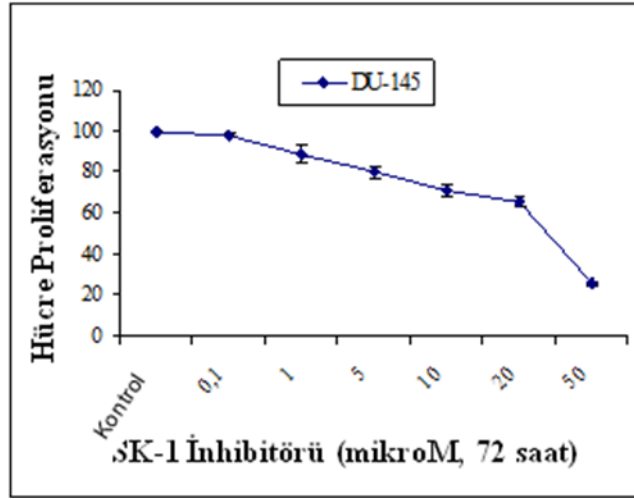
Şekil 6. PDMP'nin DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.

SK-1 inhibitörünün PC-3 Ve DU-145 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri

PC-3 ve DU-145 prostat kanseri hücreleri 72 saat boyunca artan dozlarda SK-1 inhibitörüne (Şekil 7 ve 8) maruz bırakılmışlardır. Hücrelerin çoğalma grafiğinden, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde SK-1 inhibitörünün IC50 değeri 92 (Şekil 7) ve 32 µM (Şekil 8) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 7. SK-1 inhibitörünün PC-3 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.

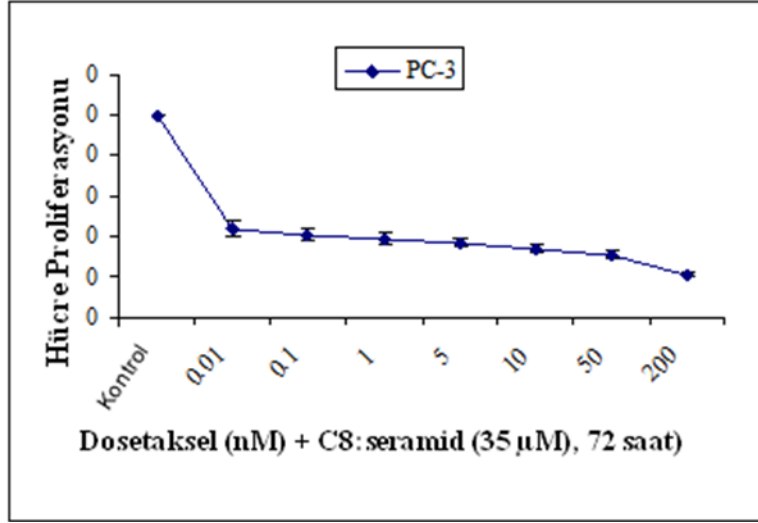


Şekil 8. SK-1 inhibitörünün DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.

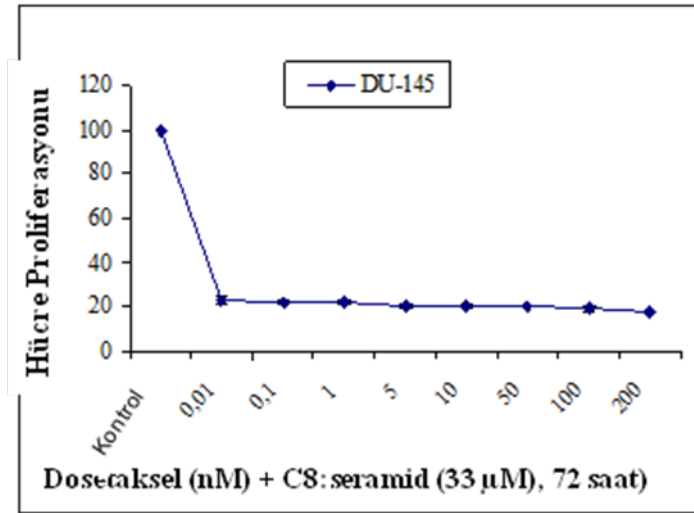
Dosetaksel/C8:seramid Kombinasyonunun PC-3 Ve DU-145 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri

Dosetaksel/C8:seramid kombinasyonunun PC-3 ve DU-145 hücreleri üzerine sinerjistik antiproliferatif etkileri olduğu belirlenmiştir. Spesifik örnek vermek gerekirse, 72 saat boyunca 1-, 10 ve 100 nM dosetaksle maruz bırakılan PC-3 hücrelerinin proliferasyonunda ilaç uygulanmayan kontrol grubu hücelere göre sırasıyla %25, 44 ve 63 azalma belirlenirken aynı dozlarda dosetaksle maruz bırakılan DU-145 hücrelerinde bu azalmalar %10, 44 ve 70 olarak hesaplanmıştır. Aynı dozlarda dosetakselin 35 µM C8:seramid ile kombinasyonu PC-3 hücrelerinin çoğalmasını %61, 66 ve 69 azaltmıştır (Şekil 9). 33 µM C8:seramid ile kombine uygulanan aynı dosetaksel dozları DU-145 hücrelerinin proliferasyonunu %78, 80 ve 81

azalttığı belirlenmiştir (Şekil 10). Bu sonuçlar dosetaksel/C8:seramid kombinasyonunun DU-145 hücreleri üzerine çok daha etkili olduğunu göstermiştir.



Şekil 9. Dosectaxel/C8:seramid kombinasyonunun PC-3 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.

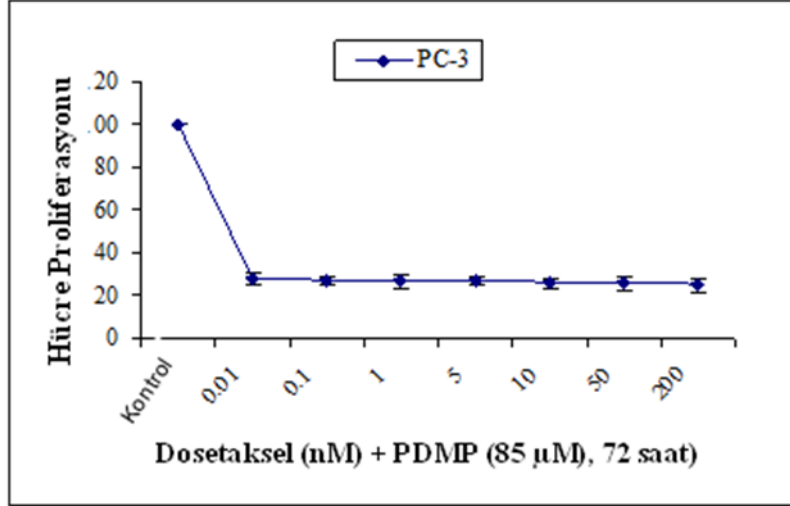


Şekil 10. Dosectaxel/C8:seramid kombinasyonunun DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.

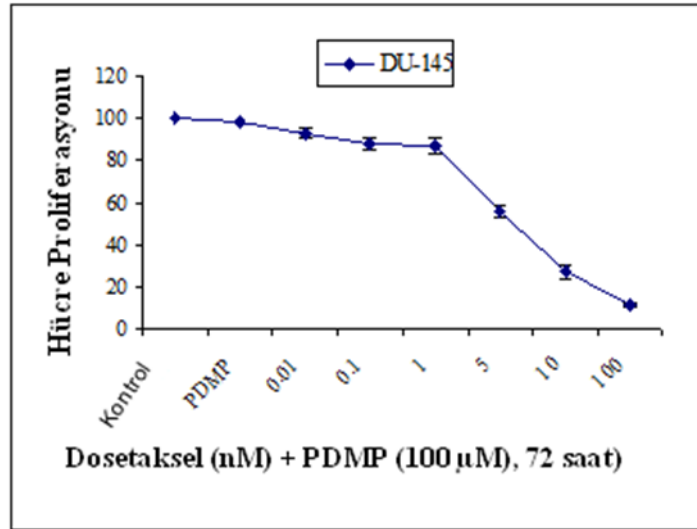
Dosectaxel/PDMP Kombinasyonunun PC-3 Ve DU-145 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri

Dosectaxel/PDMP kombinasyonunun PC-3 ve DU-145 hücreleri üzerine sinerjistik antiproliferatif etkileri olduğu belirlenmiştir. Spesifik örnek vermek gerekirse, yukarıda belirtilen dozlarda dosetakselin 85 µM PDMP ile kombinasyonu PC-3 hücrelerinin çoğalmasını %73, 74 ve 74 azaltmıştır (Şekil 11). 100 µM PDMP ile kombine uygulanan aynı

dosetaksel dozları DU-145 hücrelerinin proliferasyonunu %13, 73 ve 89 azalttığı belirlenmiştir (Şekil 12). Bu sonuçlar dosetaksel/PDMP kombinasyonunun PC-3 hücreleri üzerine çok daha etkili olduğunu göstermiştir.



Şekil 11. Dosetaksel/PDMP kombinasyonunun PC-3 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.

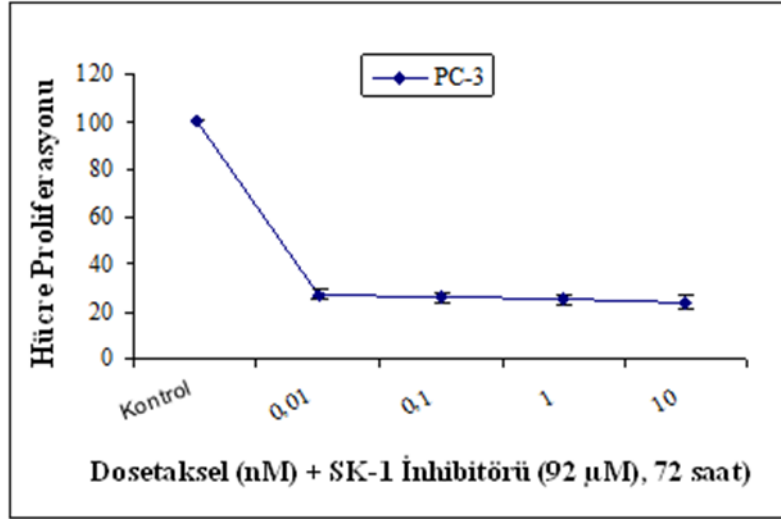


Şekil 12. Dosetaksel/PDMP kombinasyonunun DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.

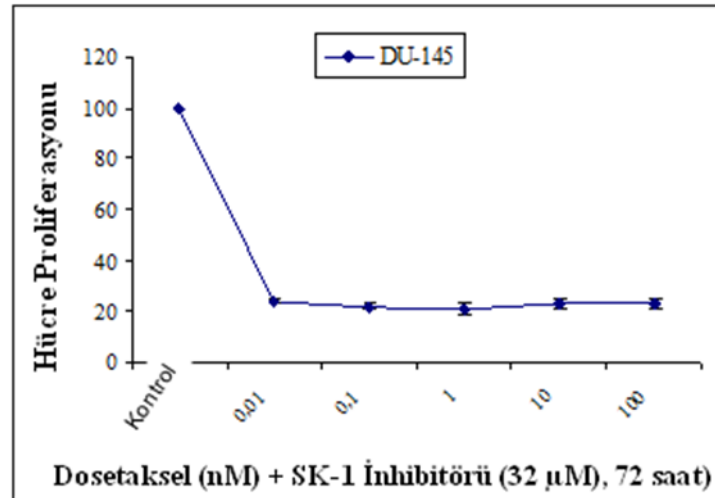
Doksetaksel/SK-1 İnhibitörü Kombinasyonunun PC-3 Ve DU-145 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri

Doksetaksel/SK-1 inhibitörü kombinasyonunun PC-3 ve DU-145 hücreleri üzerine sinerjistik antiproliferatif etkileri olduğu belirlenmiştir. Spesifik örnek vermek gerekirse, yukarıda belirtilen dozlarda dosetakselin 32 µM SK-1 inhibitörü ile kombinasyonu PC-3 hücrelerinin çoğalmasını %79, 77 ve 77 azaltmıştır (Şekil 13). 92 µM SK-1 inhibitörü ile kombine

uygulanan aynı dosetaksel dozları DU-145 hücrelerinin proliferasyonunu %74, 75 ve 76 azalttığı belirlenmiştir (Şekil 14).



Şekil 13. Dosetaksel/SK-1 inhibitörü kombinasyonunun PC-3 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.



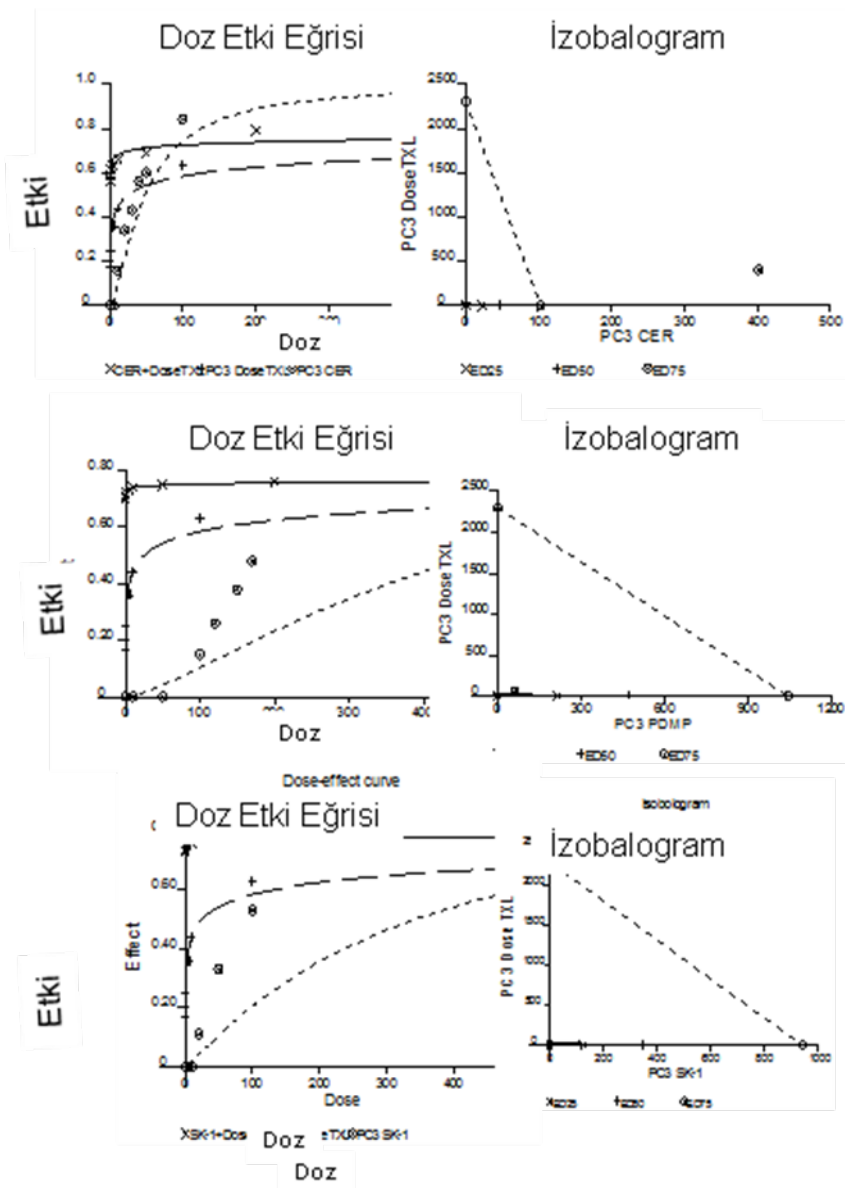
Şekil 14. Dosetaksel/SK-1 inhibitörü kombinasyonunun DU-145 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.

Kombinasyonların İzobalogram Analizleri

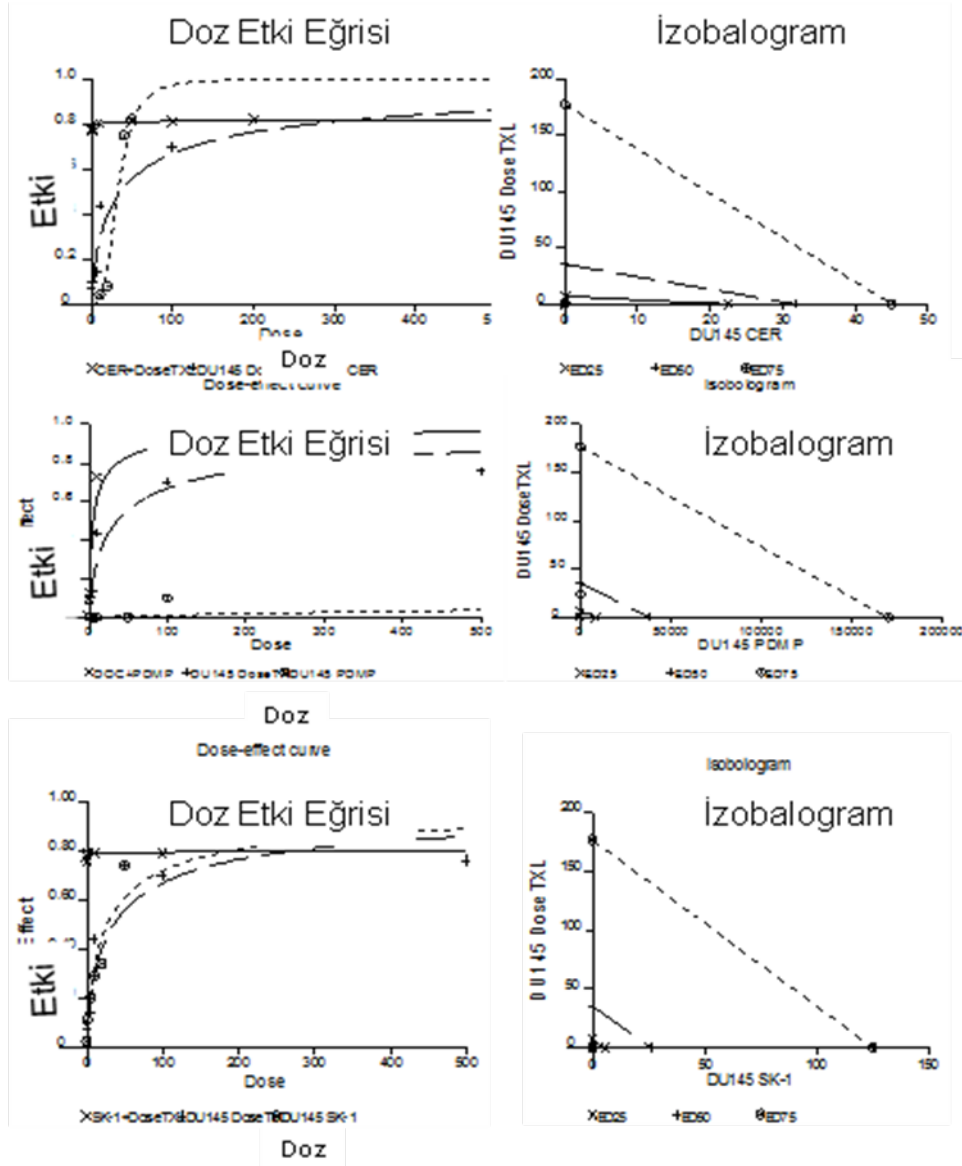
Doksetaksel/ C8:ceramide, /PDMP, ve /SK-1 inhibitörü kombinasyonlarının nasıl bir etki yarattığının belirlenmesi amacı ile CalcuSyn Windows bilgisayar programı (CalcuSyn software, Biosoft, UK) kullanılmıştır. Programa dataların girilmesinden sonra software tarafından bulunan CI değeri iki ajanın etkisinin nasıl olduğunun belirtilmesi için kullanılan

bir terimdir. $CI < 1$ sinerji olduğunu, $CI = 0.1-0.5$ güçlü sinerji olduğunu, $CI < 0.1$ çok güçlü sinerjiyi, $CI = 1$ additif etkiyi, $CI > 1$ antagonist etkiyi, $CI = 3.3-10$ güçlü antagonist etkiyi ve $CI > 10$ çok güçlü antagonist etkiyi gösterir.

Elde edilen sonuçlar dosetaksel/C8:seramid, /PDMP ve /SK-1 inhibitörü kombinasyonlarının CI değerlerinin PC-3 hücrelerinde sırasıyla 0.00018, 1.3924E-015 ve 5.9743E-023 olduğunu göstermiştir (Şekil 15). Aynı kombinasyonların DU-145 hücrelerindeki CI değerleri ise 5.256E-021, 0.14462 ve 1.4137E-033 olarak belirlenmiştir. Bu CI değerleri dosetaksel ile sfingolipidleri hedefleyen bu kimyasalların güçlü sinerjistik etkileri olduğunu göstermiştir (Şekil 16).



Şekil 15. PC-3 hücrelerin üzerine dosetakselin C8:seramid, PDMP ve SK-1 inhibitörü ile kombinasyonunun sinerjistik etkileri.

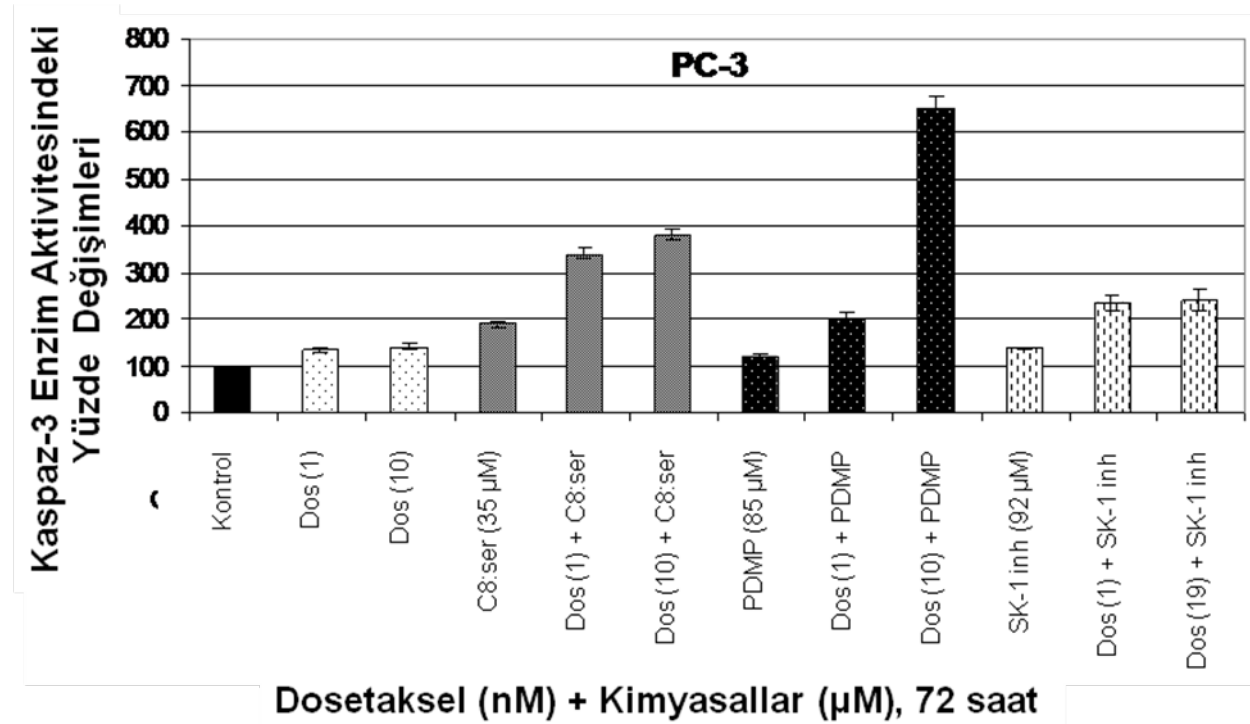


Şekil 16. DU-145 hücrelerin üzerine dosetakselin C8:seramid, PDMP ve SK-1 inhibitörü ile kombinasyonunun sinerjistik etkileri.

Dosetakselin Yalnız Ve C8:seramid, PDMP Ve SK-1 İnhibitörü İle Kombine Uygulandığı PC-3 Hücrelerinde Kaspaz-3 Enzim Aktivitesinde Meydana Gelen Değişimler

Kaspaz-3 enzim aktivitesi ölçümleri, 1- ve 10 nM dosetakselle yalnız maruz bırakılan PC-3 hücrelerinin enzim aktivitesinde 1,33- ve 1,4 kat artışlar olduğunu gösterirken aynı dozlarda dosetakselin 35 μ M C8:seramid ile kombinasyonunun enzim aktivitesini 3,4 ve 3,8 kat arttırdığını göstermiştir. Kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldığında, C8:seramidin yalnız uygulandığı hücrelerdeki kaspaz-3 enzim aktivite artışı ise 1,9 kat olarak belirlenmiştir. Aynı dozlarda dosetakselin 85 μ M PDMP ile kombinasyonunun enzim aktivitesini 2 ve 6,5 kat

arttırdığını göstermiştir. Kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldığında, PDMP nin yalnız uygulandığı hücrelerdeki kaspaz-3 enzim aktivite artışı ise 1,2 kat olarak belirlenmiştir (Şekil 17). 92 μ M SK-1 inhibitörü ile beraber uygulanan 1 ve 10 nM dosetakselin kaspaz-3 enzim aktivitesini 2,3 ve 2,4 kat arttırdığını göstermiştir. Kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldığında, SK-1 inhibitörünün yalnız uygulandığı hücrelerdeki kaspaz-3 enzim aktivite artışı ise 1,3 kat olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar hücre içi seramid sentezinin arttırılması veya seramidin katabolize edilmesinin engellenmesi ile dosetakselin apoptotik etkilerinin PC-3 hücrelerinde arttırılabileceğini göstermiştir (Şekil 17).

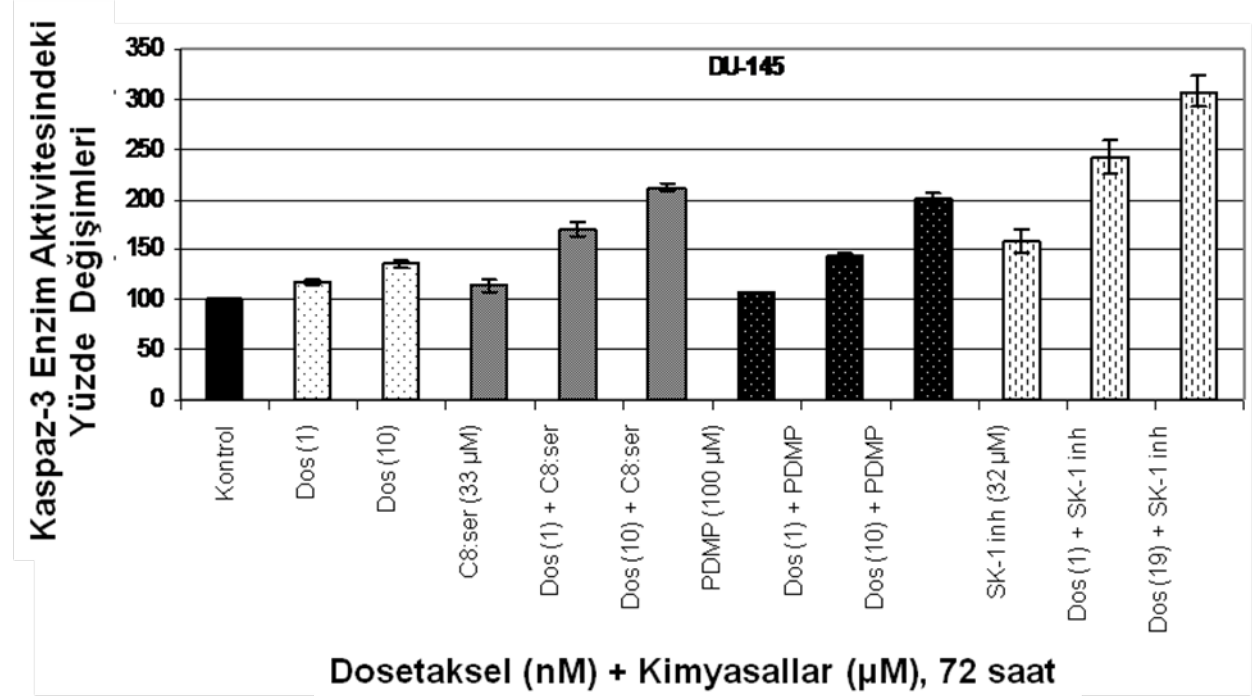


Şekil 17. PC-3 hücrelerinde hücre içi seramid konsantrasyonunun biyokimyasal yöntemlerle arttırılması ile dosetakselin apoptotik etkisinin arttırılması

Dosetakselin Yalnız Ve C8:seramid, PDMP Ve SK-1 İnhibitörü İle Kombine Uygulandığı DU-145 Hücrelerinde Kaspaz-3 Enzim Aktivitesinde Meydana Gelen Değişimler

Kaspaz-3 enzim aktivitesi ölçümleri, 1- ve 10 nM dosetakselle yalnız maruz bırakılan DU-145 hücrelerinin enzim aktivitesinde 1,17- ve 1,36 kat artışlar olduğunu gösterirken aynı dozlarda dosetakselin 33 μ M C8:seramid ile kombinasyonunun enzim aktivitesini 1,7 ve 2,12 kat arttırdığını göstermiştir. Kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldığında, C8:seramidin yalnız

uygulandığı hücrelerdeki kaspaz-3 enzim aktivite artışı ise 1,15 kat olarak belirlenmiştir. Aynı dozlarda dosetakselin 100 μM PDMP ile kombinasyonunun enzim aktivitesini 1.43 ve 2,01 kat arttırdığını göstermiştir. Kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldığında, PDMP nin yalnız uygulandığı hücrelerdeki kaspaz-3 enzim aktivite artışı ise 1,07 kat olarak belirlenmiştir (Şekil 18). 32 μM SK-1 inhibitörü ile beraber uygulanan 1 ve 10 nM dosetakselin DU-145 hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesini 2,42 ve 3,08 kat arttırdığını göstermiştir. Kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldığında, SK-1 inhibitörünün yalnız uygulandığı DU-145 hücrelerindeki kaspaz-3 enzim aktivite artışı ise 1,58 kat olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar hücre içi seramid sentezinin arttırılması veya seramidin katabolize edilmesinin engellenmesi ile dosetakselin apoptotik etkilerinin DU-145 hücrelerinde arttırılabileceğini göstermiştir (Şekil 18).

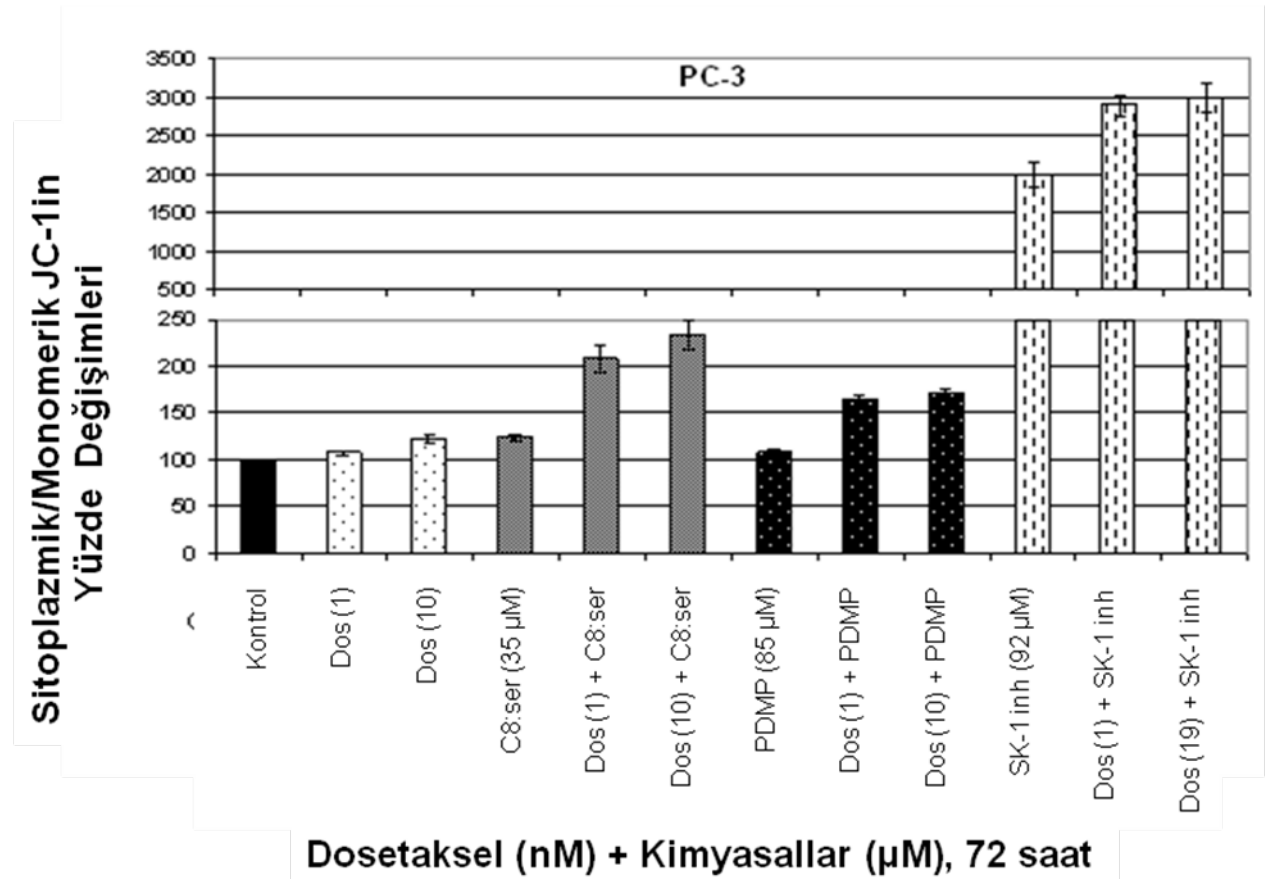


Şekil 18. DU-145 hücrelerinde hücre içi seramid konsantrasyonunun biyokimyasal yöntemlerle arttırılması ile dosetakselin apoptotik etkisinin arttırılması.

Dosetakselin Yalnız Ve C8:seramid, PDMP Ve SK-1 İnhibitörü İle Kombine Uygulandığı PC-3 Hücrelerinde Mitokondri Zar Potansiyelinde Meydana Gelen Değişimler

Mitokondri zar potansiyeli ölçümleri sitoplazmik/monomerik JC1 oranları ile belirlenmiştir. 1- ve 10 nM dosetakselle yalnız maruz bırakılan PC-3 hücrelerinin sitoplazmik/mitokondrial JC1'i miktarında 1,08- ve 1,22 kat artışlara yol açarken aynı dozlarda dosetakselin 35 μM

C8:seramid ile kombinasyonunun sitoplazmik/mitokondriyal JC1'i 2,08 ve 2,34 kat arttırdığı belirlenmiştir. Kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldığında, C8:seramidin yalnız uygulandığı hücrelerdeki sitoplazmik/mitokondriyal JC1 artışı ise 1,24 kat olarak belirlenmiştir. Aynı dozlarda dosetakselin 85 μ M PDMP ile kombinasyonunun sitoplazmik/mitokondriyal JC1'i 1,65 ve 1,72 kat arttırdığı gözlenmiştir. Kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldığında, PDMP nin yalnız uygulandığı hücrelerdeki sitoplazmik/mitokondriyal JC1 artışı ise 1,09 kat olarak belirlenmiştir (Şekil 19). 92 μ M SK-1 inhibitörü ile beraber uygulanan 1 ve 10 nM dosetakselin sitoplazmik/mitokondriyal JC1'i 29 ve 30 kat arttırdığını göstermiştir. Kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldığında, SK-1 inhibitörünün yalnız uygulandığı hücrelerdeki sitoplazmik/mitokondriyal JC1 artışı ise 20 kat olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar hücre içi seramid sentezinin arttırılması veya seramidin katabolize edilmesinin engellenmesi ile dosetakselin apoptotik etkilerinin PC-3 hücrelerinde arttırılabileceğini göstermiştir (Şekil 19).

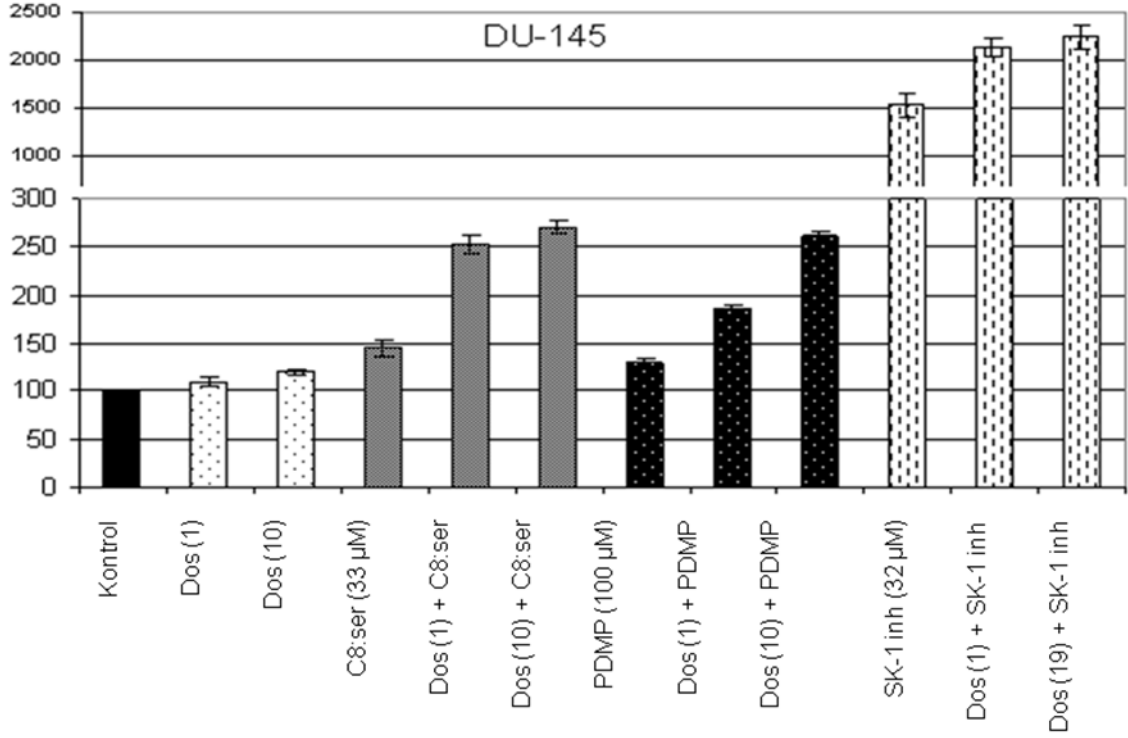


Şekil 19. PC-3 hücrelerinde hücre içi seramid konsantrasyonunun biyokimyasal yöntemlerle arttırılması ile dosetakselin apoptotik etkisinin arttırılması

Dosetakselin Yalnız Ve C8:seramid, PDMP Ve SK-1 İnhibitörü İle Kombine Uygulandığı DU-145 Hücrelerinde Mitokondri Zar Potansiyelinde Meydana Gelen Değişimler

Mitokondri zar potansiyeli ölçümleri, 1- ve 10 nM dosetaksele yalnız maruz bırakılan DU-145 hücrelerinin sitoplazmik/mitokondriyal JC1 oranında 1,1- ve 1,2 kat artışlar olduğunu gösterirken aynı dozlarda dosetakselin 33 μ M C8:seramid ile kombinasyonunun sitoplazmik/mitokondriyal JC1 oranını 2,53 ve 2,71 kat arttırdığını göstermiştir. Kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldığında, C8:seramidin yalnız uygulandığı hücrelerdeki sitoplazmik/mitokondriyal JC1 artışı ise 1,45 kat olarak belirlenmiştir. Aynı dozlarda dosetakselin 100 μ M PDMP ile kombinasyonunun sitoplazmik/mitokondriyal JC1'i 1,85 ve 2,63 kat arttırdığını göstermiştir. Kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldığında, PDMP'nin yalnız uygulandığı hücrelerdeki sitoplazmik/mitokondriyal JC1 artışı ise 1,30 kat olarak belirlenmiştir (Şekil 20). 32 μ M SK-1 inhibitörü ile beraber uygulanan 1 ve 10 nM dosetakselin DU-145 hücrelerinde sitoplazmik/mitokondriyal JC1 oranını 21,30 ve 22,37 kat arttırdığı gözlenmiştir. Kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldığında, SK-1 inhibitörünün yalnız uygulandığı DU-145 hücrelerindeki sitoplazmik/mitokondriyal JC1 artışı ise 15,38 kat olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar hücre içi seramid sentezinin arttırılması veya seramidin katabolize edilmesinin engellenmesi ile dosetakselin apoptotik etkilerinin DU-145 hücrelerinde arttırılabileceği gösterilmiştir (Şekil 20).

Sitoplazmik/Monomerik JC-1'in
Yüzde Değişimleri

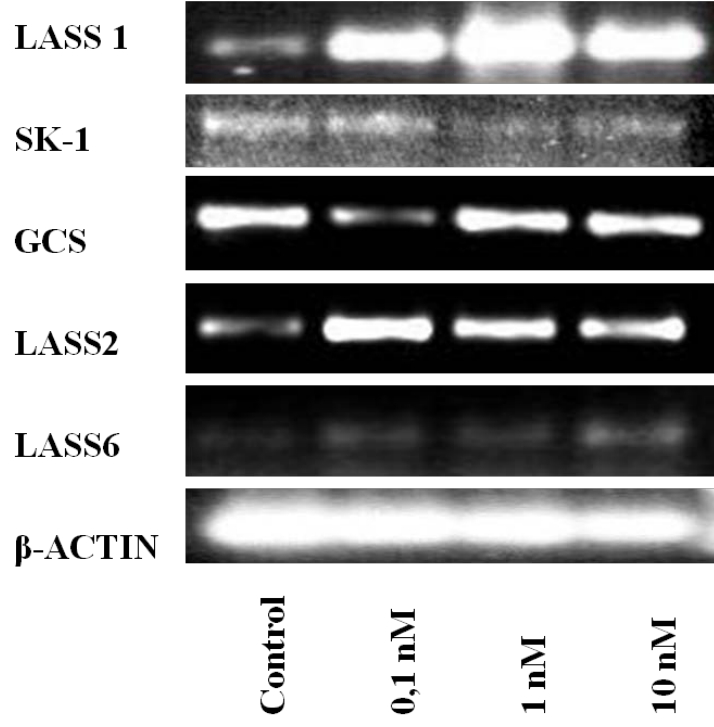


Dosetaksel (nM) + Kimyasallar (µM), 72 saat

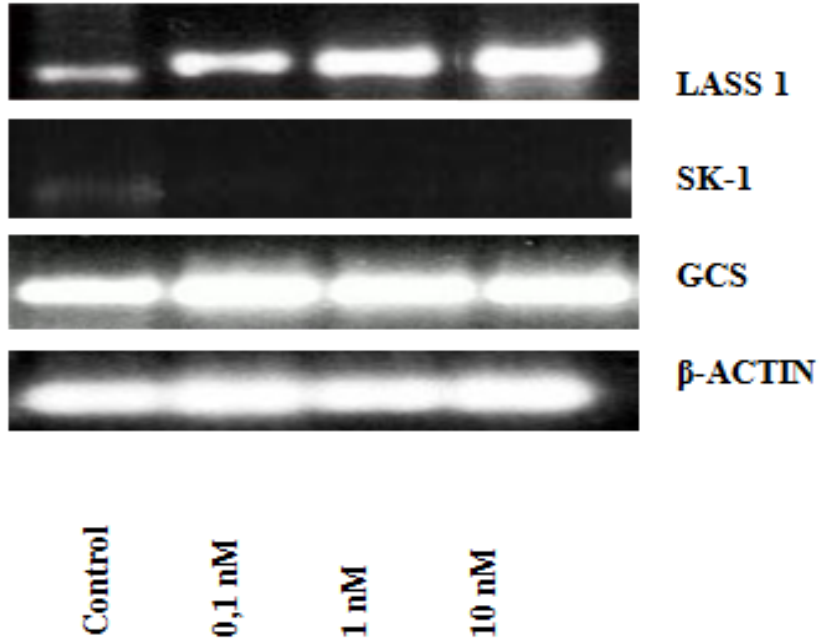
Şekil 20. DU-145 hücrelerinde hücre içi seramid konsantrasyonunun biyokimyasal yöntemlerle artırılması ile dosetakselin apoptotik etkisinin artırılması

Dosetaksel Uygulaması ile Seramid Metabolize Eden Genlerin Ekspresyon Düzeylerinde Meydana Gelen Değişimler

Dosetaksel uygulanan PC-3 (Şekil 21) ve DU-145 (Şekil 22) hücrelerinde GSS ve SK-1 genlerinin ekspresyon düzeylerinde anlamlı derecede azalmalar belirlenmiştir. Öte yandan PC-3 hücrelerinde LASS1, LASS2 ve LASS4 genlerinin ekspresyon düzeylerinde artışlar tespit edilirken (Şekil 21) DU-145 hücrelerinde sadece LASS1 geninde bir artış gözlenmiştir (Şekil 22).



Şekil 21. 0,1-, 1- ve 10 nM dosetaksel uygulanan PC-3 hücrelerinde seramid metabolize eden genlerin ekspresyon analizleri.



Şekil 22. 0,1-, 1- ve 10 nM dosetaksel uygulanan DU-145 hücrelerinde seramid metabolize eden genlerin ekspresyon analizleri.

TARTIŞMA/SONUÇ

Bu çalışmada, seramid metabolizması genlerinin ve metabolik ürünlerinin dosetaksel tetiklediği hücrelölümlerdeki rolü incelenmiştir. Araştırmamızda elde edilen sonuçlar, prostat kanser hücrelerinde dosetakselin indüklediği apoptozis ile ilgili yeni mekanizmaları anlamamıza yardımcı olmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar, hücre içi seramid miktarının seramid analogları veya GSS ve SK-1 enzimlerinin kimyasal olarak inhibisyonu sayesinde artırılması ile DU-145 ve PC-3 prostat kanser hücrelerinin proliferasyonunun azaldığını ve mitokondriyal zar potansiyelinin bozulması ve kaspaz enzim-3 aktivitesindeki artış sayesinde apoptozisi tetiklediğini göstermiştir. Daha da önemlisi, dosetakselin bir seramid analogu olan C8:seramid veya GSS inhibitörü PDMP veya SK-1 inhibitörü ile kombine uygulanmasının, DU-145 ve PC-3 kanser hücrelerinin dosetakselle olan duyarlılığını sinerjistik bir şekilde arttırdığı tespit edilmiştir. Bu araştırmadan elde edilen bilgiler sayesinde, bioaktif sfingolipidlerin düzenlenmesinin, androjenden bağımsız prostat kanserinin tedavisinde yeni kapılar açabileceği gösterilmiştir. Moleküler veya biyokimyasal yöntemler ile seramid miktarının artırılmasının, çeşitli kanser türlerinde farklı kemoterapötiklerin apoptotik etkisini arttırdığı gösterilmiştir (BARAN, 2007; DESAI, 2008). Paklitaksel ile kısa zincirli seramid kombinasyonu, hem duyarlı hem de çoklu ilaç direnci olan ovaryum kanser hücrelerinde apoptozu sinerjistik olarak arttırmıştır (DEVALAPALLY, 2007; DESAI, 2008). Hücre geçirgenliği olan C6:seramidin dışarıdan uygulamasının, çeşitli kanser hücrelerinin doksorubisine duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir (Jİ, 2010). C2:seramidin insan kolon kanser hücrelerinde apoptozisi indüklediği (AHN, 2010) ve NSCLC H1299 kanser hücrelerinde de paklitakselle duyarlılığı artırıp apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (CHEN, 2010). Yeni bir seramid analogu olan AL6'nın gemtisabin ile beraber sinerjistik sitotoksik etki ve pankreatik kanser hücrelerinde artan apoptozise yol açtığı bildirilmiştir (GİOVANNETTİ, 2010). Akao ve arkadaşları dışarıdan uygulanan ve hücre geçirgenliği olan seramid analoglarının apoptozisdeki rolünü göstermişlerdir (AKAO, 2002). Bu çalışmalara paralel olarak, araştırmamızda kısa zincirli C8:seramidin dosetaksel ile kombinasyonunun sinerjistik bir şekilde prostat kanser hücrelerinde proliferasyonu azalttığını ve apoptozisi indüklediğini gösterdik. İlk defa çalışmamızda, hem PC-3 hem de DU-145 hücrelerinde dosetakselin LASS1 ekspresyon miktarlarını arttırdığı gösterilmiştir. Aynı zamanda da dosetakselin yalnız PC-3 hücrelerinde LASS2 ve LASS6 ekspresyon miktarlarının arttırıldığı tespit edilmiştir.

GSS'nin yüksek düzeyde ekspresyonu ve glukozilseramid miktarlarındaki artışların ilaç dirençliliğini geliştirdiği tespit edilmiştir (OGRETMEN, 2006). GSS, apoptotik seramidi

antiapoptotik glukozilseramide çevirdiği için, PDMP gibi bazı kimyasal inhibitörlerle GSS'in inhibisyonu sayesinde antikanser ilaçların sitotoksik ve apoptotik etkilerini arttırmıştır (REYNOLDS, 2008). Maurer ve arkadaşları, bir GSS inhibitörü olan PPMP'nin (1-phenyl-2-palmitoylamino-3-morpholino- 1-propanol) fenretinide ile olan kombinasyonunun sinerjistik olarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığını göstermişlerdir (MAURER 1999; MAURER, 2000). Benzer şekilde, çalışmamızda da dosetakselin GSS inhibitoru, PDMP, ile kombinasyonunun diğer kimyasalların tek başına verdikleri etkileriyle karşılaştırıldığında, DU-145 ve PC-3 hücrelerinin proliferasyonunu sinerjistik olarak baskıladığı, mitokondriyal zar potansiyelini sinerjistik olarak bozduğu ve kaspaz-3 enzim aktivesini sinerjistik olarak arttırdığı belirlenmiştir. Daha da önemlisi, RT-PCR sonuçları, her iki hücre hattında da dosetaksel uygulamaları sonucunda GSS ekspresyon düzeylerinde doza bağlı azalma belirlenmiştir.

Sfingozin kinaz-1, apoptotik sfingozini antiapoptotik sfingozin-1-fosfata (S1F) dönüştürür (SEGUI, 2006). SK-1/S1F dengesi, bioaktif sphingolipid metabolizmasını değiştirir, kanser hücrelerini antikanser kimyasalların apoptotik etkilerinden korur ve ilaçlara dirençlilik gelişmesini tetikler. S1F uygulaması normal hücrelerde hücre ölümüne karşı koruyucu etki sağlarken, S1F biyosentezinin inhibisyonu, çeşitli kanser hücrelerinin tedavisinde yeni bir tedavi seçeneği olarak karşımıza çıkar (TILLY, 2002). Pchejetski ve arkadaşları SK-1'in prostat adenokarsinom hayvan modelleri ve kültürlerinde ilacın indüklediği apoptozisi düzenlediğini göstermişlerdir (PCHEJETSKI, 2005; PCHEJETSKI, 2008). Daha önceki çalışmalarımızda da gösterdiğimiz gibi, S1F düzeylerinin azaltılması apoptozisi artırır ve SK-1'in yüksek düzeyde ekspresyonu ile seramid metabolizmasının bozulması, antikanser ilaçlara dirençliliğin gelişmesinde önemli bir rol oynar (BARAN, 2007). Yaptığımız bu çalışmada SK-1 enzim aktivitesini kimyasal bir inhibitörle inhibe ederek hücre proliferasyonunun her iki hücre hattında da doza bağlı olarak azaldığını gösterdik. Diğer taraftan, SK-1 inhibitor/dosetaksel kombinasyonun, prostat kanseri hücrelerindeki sinerjistik apoptotik etkisini gösterdik. Dosetakselin iyi bilinen apoptotik mekanizmasına ek olarak, dosetakselin doza bağlı olarak antiapoptotik SK-1 ekspresyon düzeylerini baskıladığı da bu çalışma ile gösterilmiştir.

Sonuç olarak, tüm bu çalışmalar, elde edilen sonuçları bir bütün olarak değerlendirdiğimizde, dosetakselin tetiklediği hücre ölümünde apoptotik seramidleri sentezleyen genlerin ekspresyonunu tetikleme ve antiapoptotik GSS ve SK1 genlerinin baskılanması olduğu ilk defa bu çalışma ile ortaya konmuştur. Öte yandan, translasyonel bir katkısı olabilecek düzeyde, dosetaksel ile beraber seramid metabolizmasını hedefleyen

kimyasal ajanların beraber uygulanması ile prostat kanseri gibi son derece yaygın, ölümcül ve tedavi edilmesi zor bir kanser türünün çok daha etkili bir şekilde tedavi edilebileceği belirlenmiştir. Bu çalışma ile başarılı ve etkileyici sonuçlar alınmasına rağmen bu çalışma sonuçlarının hayvan (in vivo) çalışmalarıyla desteklenmesi gerekmektedir. TÜBİTAK desteği ile gerçekleştirdiğimiz ve hipotezimizi doğrulayan bu in vitro çalışmadan elde ettiğimiz veriler bizi cesaretlendirmiş ve bundan sonraki çalışmalarda in vivo ya yönelmemiz noktasında yol gösterici olmuştur.

REFERANSLAR

- AHN E.H., Schroeder J.J., Induction of apoptosis by sphingosine, sphinganine, and C(2)-ceramide in human colon cancer cells, but not by C(2)-dihydroceramide, *Anticancer Res*, 30(7): 881-884, (2010).
- AKAO Y., Kusakabe S., Banno Y., Kito M., Nakagawa Y., Tamiya-Koizumi K., Hattori M., Sawada M., Hirabayashi Y., Ohishi N., Nozawa Y., Ceramide accumulation is independent of camptothecin-induced apoptosis in prostate cancer LNCaP cells, *Biochem Biophys Res Co* 294(2): 363-370, (2002).
- BARAN Y., Salas A., Senkal C.E., Gunduz U., Bielawski J., Obeid L.M., Ogretmen B., Alterations of ceramide/sphingosine 1-phosphate rheostat involved in the regulation of resistance to imatinib-induced apoptosis in K562 human chronic myeloid leukemia cells, *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 10922-10934, (2007).
- BASLER M., Groettrup M., Advances in prostate cancer immunotherapies, *Drugs and Aging*, 24(3), 197-221, (2007).
- CHEN J.Y., Hwang C.C., Chen W.Y., Lee J.C., Fu T.F., Fang K., Chu Y.C., Huang Y.L., Lin J.C., Tsai W.H., Chang H.W., Chen B.H., Chiu C.C., Additive effects of C(2)-ceramide on paclitaxel-induced premature senescence of human lung cancer cells, *Life Sci* 87(11-12): 350-357, (2010).
- DESAI A., Vyas T., Amiji M., Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations, *J Pharmacol Sci*, 97(7): 2745-2756, (2008).
- DEVALAPALLY H., Duan Z., Seiden M.V., Amiji M.M., Paclitaxel and ceramide co-administration in biodegradable polymeric nanoparticulate delivery system to overcome drug resistance in ovarian cancer, *Int J Cancer*, 121(8): 1830-1838, (2007).
- GIOVANNETTI E., Leon L.G., Bertini S., Macchia M., Minutolo F., Funel N., Alecci C., Giancola F., Danesi R., Peters G.J., Study of apoptosis induction and deoxycytidine kinase/cytidine deaminase modulation in the synergistic interaction of a novel ceramide analog and gemcitabine in pancreatic cancer cells *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 29(4-6): 419-426, (2010).
- GOUAZÉ-ANDERSSON V, Yu JY, Kreitenberg AJ, Bielawska A, Giuliano AE, Cabot M.C., Ceramide and glucosylceramide upregulate expression of the multidrug resistance gene MDR1 in cancer cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771(12), 1407-1417, (2007).
- HANNUN Y.A., Obeid L.M., Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 139-150, (2008).

HUWILER A., Pfeilschifter J., New players on the center stage: sphingosine 1-phosphate and its receptors as drug targets, *Biochemical Pharmacology*, 75(10), 1893-1900, (2008).

KISH J.A., Bukkapatnam R., Palazzo F., The treatment challenge of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Control*, 8(6), 487-495, (2001).

LAVIE Y., Cao H., Bursten S.L., Giuliano A.E., Cabot M.C. Accumulation of glucosylceramides in multidrug-resistant cancer cells, *J Biol Chem*, 271, 19530-19536, (1996)

LEROUX M.E., Auzenne E., Evans R., Hail N. Jr, Spohn W., Ghosh S.C., Farquhar D., McDonnell T., Klostergaard J., Sphingolipids and the sphingosine kinase inhibitor, SKI II, induce BCL-2-independent apoptosis in human prostatic adenocarcinoma cells, *Prostate*, 67(15), 1699-717, (2007).

MACCHIA M., Bertini S., Fogli S., Giovannetti E., Minutolo F., Rapposelli S., Danesi R., Ceramide analogues in apoptosis: a new strategy for anticancer drug development, *Farmaco*, 58(3), 205-211, (2003).

MAURER B.J., Metelitsa L.S., Seeger R.C., Cabot M.C., Reynolds C.P., Increase of ceramide and induction of mixed apoptosis/necrosis by N-(4-hydroxyphenyl)- retinamide in neuroblastoma cell lines, *J Natl Cancer*, 91: 1138–1146, (1999).

MAURER B.J., Melton L., Billups C., Cabot M.C., Reynolds C.P., Synergistic cytotoxicity in solid tumor cell lines between N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and modulators of ceramide metabolism, *J Natl Cancer*, 92: 1897–1909, (2000).

MELLENDEZ A.J., Sphingosine kinase signalling in immune cells: potential as novel therapeutic targets, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784(1), 66-75, (2008).

OGRETMEN B., Sphingolipids in cancer: regulation of pathogenesis and therapy, *FEBS Letters* 580(23). 5467-5476, (2006).

PCHEJETSKI D., Golzio M., Bonhoure E., Calvet C., Doumerc N., Garcia V., Mazerolles C., Rischmann P., Teissié J., Malavaud B., Cuvillier O., Sphingosine kinase-1 as a chemotherapy sensor in prostate adenocarcinoma cell and mouse models, *Cancer Res*, 65(24): 11667-11675, (2005).

PCHEJETSKI D., Doumerc N., Golzio M., Naymark M., Teissié J., Kohama T., Waxman J., Malavaud B., Cuvillier O., Chemosensitizing effects of sphingosine kinase-1 inhibition in prostate cancer cell and animal models, *Mol Cancer Ther*, 7(7): 1836-1845, (2008).

REYNOLDS M.A., Molecular alterations in prostate cancer, *Cancer Lett*, 271(1): 13-24, (2008).

SCHULZ W.A., Burchardt M., Cronauer M.V., Molecular biology of prostate cancer, *Mol Hum Reprod*, 9(8): 437-448, (2003).

SCHULZ W.A., Burchardt M., Cronauer MV., Molecular biology of prostate cancer, *Molecular Human Reproduction*, 9(8), 437-448, (2003).

SÉGUI B., Andrieu-Abadie N., Jaffrézou J.P., Benoist H., Levade T., Sphingolipids as modulators of cancer cell death: potential therapeutic targets, *Biochimica et Biophysica Acta*, 758(12), 2104-2120, (2006).

SENCHENKOV A., Litvak D.A., Cabot M.C., Targeting ceramide metabolism; a strategy for overcoming drug resistance, *Journal of the National Cancer Institute*, 93(5), 347-357, (2001).

TILLY J.L., Kolesnick R.N., Sphingolipids, apoptosis, cancer treatments and the ovary: investigating a crime against female fertility, *Biochim Biophys Acta*, 1585: 135–138 (2002).

TING H.J., Hsu J., Bao B.Y., Lee Y.F., Docetaxel-induced growth inhibition and apoptosis in androgen independent prostate cancer cells are enhanced by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3, *Cancer Letters*, 247(1), 122-129, (2007).

VISAKORPI T., The molecular genetics of prostate cancer, *Urology*, 62, 3-10, (1998).

ZHAO L., Au J.L., Wientjes M.G. Comparison of methods for evaluating drug-drug interaction, *Front Biosci* 2, 241-249, (2010).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 109S215
Proje Başlığı: Hormona Dirençli Prostat Kanseri Hücrelerinde Dosetaksel Ve Seramidin İndüklediği Apoptozisde Seramid Genlerinin Ve Ürünlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Doç Dr Yusuf Baran
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Urla, İzmir
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK Tunus Cad. No:80 Kavaklıdere, Ankara
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.01.2010 - 26.01.2011
Öz (en çok 70 kelime) DU-145 ve PC-3 prostat kanser hücrelerinde, C8:seramid ve GSS, SK-1 inhibitörleri ile dosetaksel kombinasyonlarının kuvvetli sinerjizm gösterdikleri sitotoksite, kaspaz-3 enzim aktivitesindeki değişiklikler ve mitokondri zar potansiyelindeki bozulmalarla ortaya konmuştur. Daha da önemlisi, RT-PCR sonuçları dosetaksel ile muamele edilen hücrelerde, GSS ve SK-1 genlerinin ekspresyonlarında azalma ve LASS genlerinin ekspresyonlarında ise artış olduğunu, dolayısı ile dosetakselin tetiklediği hücreölümlerde seramid metabolize eden genlerin rolleri olabileceğini göstermiştir.
Anahtar Kelimeler: Prostat kanseri, Dosetakesel, Bioaktif sfingolipidler, Seramidler
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: Elde ettiğimiz verilerle "Bioactive Sphingolipids In Docetaxel Induced Apoptosis In Human Prostate Cancer Cells" başlıklı makale yazılmış ve World Journal of Urology dergisine sunulmuştur.