

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**PROSTAT KANSERİ GELİŞİMİNDE STAMP2 VE
SIRT1 İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Serhan TURUNÇ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ

İkinci Danışmanı: Dr. Öğr. Üy. Bilge DEBELEÇ BÜTÜNER

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 26.06.2018

Bornova- İZMİR

2018

Serhan TURUNÇ tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Prostat kanseri gelişiminde STAMP2 ve SIRT1 ilişkisinin araştırılması.” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 26/06/2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ



Raportör Üye : Prof. Dr. Ogün Sercan



Üye : Doç. Dr. Savaş İzzetoğlu



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Prostat kanseri gelişiminde STAMP2 ve SIRT1 ilişkisinin araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlamasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

26/06/2018

Serhan Turunç



ÖZET**PROSTAT KANSERİ GELİŞİMİNDE STAMP2 VE SIRT1 İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

TURUNÇ, Serhan

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ

İkinci Danışmanı: Dr. Öğr. Üy. Bilge DEBELEÇ BÜTÜNER

Haziran 2018, 62 Sayfa

Altı membran geçişli prostat proteini 2 / six transmembrane protein of prostate 2 (STAMP2) geni, prostat kanserinde (PCa) androjen tarafından düzenlenen bir gendir. STAMP2 ektopik ekspresyonu, hücre çoğalmasını ve kolonizasyonunu arttırdığı bulunmuştur. Farklı hücre hatlarında yapılan çalışmalarda ve protein yapısında belirlenen bölgelerde, hücre metabolizmasında bir rolü olabileceği düşünülmektedir. STAMP2'nin bu önemli görevlerini anlayabilmek için; PCa hücre hatlarında, farklı metabolik koşullarda, SIRT1 proteini ile olan ilişkisi ve bu regülasyonun hücreye etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu tez çalışmasında STAMP2 ve SIRT1 ekspresyon durumlarının antagonist bir regülasyonda olduğu ve bu durumun hücre fenotipine etki ettiği gözlenmiştir. Bu regülasyon PCa hücrelerinin çoğalması ve sağkalım mekanizmalarını daha iyi anlamamızı sağlayarak, terapötik tedavilerin etkisini arttıracak öneme sahiptir. Sonuçlarımız, farklı metabolik koşullarda STAMP2 ile SIRT1 regülasyonunun mitotik aktivite, oksidatif stress yanıtı ve DNA hasar onarımı sinyal yollarında yer alan proteinleri etkilediği ve yapılan analizlerde bu parametrelerin hücre çoğalmasını düzenlediği gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: STAMP2, prostat kanseri gelişimi, SIRT1, AR sinyal yolları.

ABSTRACT**INVESTIGATING THE RELATIONSHIP BETWEEN STAMP2 AND
SIRT1 IN PROSTATE CANCER DEVELOPMENT**

TURUNÇ, Serhan

MSc in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ

Co-Supervisor: Assist. Prof. Bilge DEBELEÇ BÜTÜNER

June 2018, 62 pages

The six transmembrane protein of prostate 2 (STAMP2) is an androgen-regulated gene whose mRNA expression is increased in prostate cancer (PCa). Ectopic expression of STAMP2 in prostate cancer cells significantly increases cell proliferation and colony formation. Metabolic studies in different cell lines and identified domains in the protein structure, these data established that STAMP2 may play a role in cellular metabolism. To be able to elucidate the function of STAMP2, we aimed to investigate the relationship between SIRT1 protein and cellular effects of this regulation on PCa cell lines under different metabolic conditions. In this study, we showed that STAMP2 and SIRT1 expression states are in an antagonist regulation and this affects the cell phenotype. The regulation allows us to better understand the proliferation and survival mechanisms of PCa cells, which is important to increase the effect of therapeutic treatments. Further, we found that, under different metabolic conditions, regulation of STAMP2 and SIRT1 has affected mitotic activity, oxidative stress response and DNA damage repair signaling pathways proteins and signal pathways proteins. In the analyzes performed, it has been shown that these parameters regulate cell proliferation.

Keywords: STAMP2, prostate cancer, SIRT1, AR signaling pathways.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimi için beni laboratuvarına kabul eden ve bu süreçte bana büyük emeği olan, sadece bilimsel problemlerle karşılaştığım anlarda değil, fırtınanın ortasında kayaya vurmuş, alabora olacak teknede bile yanımda olan, bu yüzden benim için hocadan çok daha fazlasını gördüğüm değerli danışman hocam Prof. Dr. Kemal Sami Korkmaz'a teşekkür ederim. Tez çalışmam boyunca deneysel ve rutin çalışmalarımda yardımını hiç esirgemeyen, başarılı bir bilim insanı olmasının yanı sıra hepimize bir abla gibi olan ikinci danışman hocam Dr. Öğr. Üy. Bilge Debeleş Bütüner'e teşekkür ederim.

Her biri birbirinden değerli, yardım sever ve başarılı insanlarla dolu bir labda çalıştığım için kendimi çok şanslı hissediyorum. Laboratuvarda paylaştığım anları eğlenceli ve güzel hatırlamama sebep olan yol arkadaşlarım Gencer Kaan Akyüz, Aykut Bostancı, Nurşah Ertunç, Gülevin Takır, Elif İşel, Öznur Singin, İroda Saydullaeva ve Gülseren Özdoğan'a çok teşekkür ederim. Deneylerimde bana geç saatlere kadar yardım eden Defne Dinç'e; Tez çalışmamda kullanmam için Nile Red boyasını veren Dr. Öğr. Üy. Arzu Yıldırım'a; Bu süreci daha eğlenceli kılan ve moral veren, yüksek lisansın bana kazandırdığı dostlarım Kübra Arslan, Emre Taylan Duman ve Haris Nalakath Abubachar'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana hep destek veren, inanan, en değerlilerim olan aileme minnettarım. Ne isem sebebi onlar.

Proje desteğinden dolayı TÜBİTAK'a (Proje No: 113S044) teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1 Prostat Bezi	3
2.1.1 Androjenler	4
2.2 Prostat Kanseri	5
2.3 Prostat Kanseri Gelişiminde AR rolü	6
2.4 Prostat Kanseri Gelişiminde İnflamasyon ve Ros'un Rolü	9
2.5 STAMP2 Genel Özellikleri ve Kansere Metabolizmasına Etkisi	10
2.5.1 Yapı ve Fonksiyonu	10
2.5.2 Doku ve Hücrelerdeki ekspresyonu	13
2.6 SIRT1 Genel Özellikleri ve Kansere Metabolizmasına Etkisi	14
3. GEREÇ ve YÖNTEM	18
3.1 Cihaz	18
3.2 Sarf Malzemeler	19
3.3 Yöntemler	23
3.3.1 Hücrelerin Bakımı ve Pasajlanması	23
3.3.2 Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi	23
3.3.3 Hücre Sayımı	24
3.3.4 Western Blot	24
3.3.5 Hücrelerden Protein Lizatı Elde Etme	25
3.3.6 SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi)	25
3.3.7 Membrana Transfer	27

İÇİNDEKİLER (DEVAM)

3.3.8 Bloklama ve Antikor İnkübasyonu	28
3.3.9 WST1 Deneyi.....	29
3.3.10 İmmunofloresan Mikroskopi.....	29
3.3.11 Plazmit Transformasyonu ve İzolasyonu.....	31
3.3.12 DNA Jel Elektroforezi	32
3.3.13 Plazmit ve siRNA Transfeksiyonu.....	33
3.3.14 Makrofaj Farklılaşması ve Koşula Bağlı Ortamın Eldesi	33
3.3.15 CM'de sitokinlerin ölçümü.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1 Ektopik STAMP2 Ekspresyonu ve Vektörlerin Doğrulanması	35
4.2 Ektopik STAMP2 Ekspresyonu ve Glukoz Uygulaması	37
4.3 STAMP2-SIRT1 Susturulması ve Glukoz Uygulaması.....	39
4.4 İnflamasyon Varlığında STAMP2 Susturulması	41
4.5 Kronik İnflamasyon Durumunda STAMP2 Regülasyonu	42
4.6 STAMP2 Hücre Lokalizasyonu	45
4.7 STAMP2 Ekspresyonu Artışı ve Lipit Oranındaki Artış	46
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ.....	54
7.ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR DİZİNİ	56
ÖZGEÇMİŞ.....	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1. A-) Prostat bezi bölümleri. Transition bölgesi yaşlanmayla birlikte malignant olmayan prostat büyümesi eğilimindedir. Periferal bölge ise daha çok malignant tümörlerin ortaya çıktığı bölgelerdir. B-) prostat bezindeki hücre çeşitliliği gösterilmiştir (Verze et al., 2016).....3
- Şekil 2.2. Androjen aracılıklı gen regülasyonunun genel mekanizması. Serbest testosteron plazma zarından hücrenin içine girer ve 5 α -redüktaz tarafından DHT'ye dönüştürüldükten sonra, AR'nin ligand bağlama alanına (LBD) bağlanır, daha sonra kompleksten HSP'ler ayrılır, fosforile olur, dimerleşir ve çekirdeğe girerek ARE'lere bağlanabilir ve kofaktörlerle birlikte gen ifadesini aktive eder / baskı altına alır (Sultan et al., 2002).5
- Şekil 2.3. Prostat kanseri tedavi süreci ve androjen ablasyonu sonrası kanserin kastrasyon direnci geliştirmesi (Verze et al., 2016).6
- Şekil 2.4. Steroid hormonlarının başlıca sınıflandırılması ve enzimatik yolları etkileşim gücü yüzdeleri. Testosteron=%100, 5 α -dihidrotestosteron=%90, Androstanediol=%60, Androstenedione=%20, Dehidroplanandrosterone=%10, Androsterone=%10. 5 α -dihidrotestosteron'nun prostat dokusunda testesterondan daha güçlü bir afiniteye sahip olduğu görülmüştür (Haggstrom and Richfield, 2014).7
- Şekil 2.5. Kastrasyon direnci mekanizması. 1-) Androjene aşırı duyarlılığı sonucu AR'nün aşırı ekspresyon durumu. 2-) Sitokinler ve büyüme faktörlerinin düzensizliği aracılığıyla AR'in androjen-bağımsız aktivasyonu. 3-) AR mutasyonu sonucu ligand spesifitesini kaybetmesi (Ishikura et al., 2015).....8
- Şekil 2.6. STAMP2 geninin kromozom 7q21 üzerindeki konumu ve şematik yapısı. STAMP2 gen yapısı gösterilmiştir. İntronlar ve ekzonlar boyutlarıyla beraber gösterilmiştir. Tahmin edilen başlangıç ve dur kodonları siyah ve gri oklarla gösterilmiştir (Korkmaz et al., 2005). 10
- Şekil 2.7. STAMP2 gen (A) ve protein (B) bölgeleri gösterilmiştir. NADP oksidoreduktaz (mavi), FAD interaksyonu (kırmızı), Demir interaksyonu (kahverengi), heme grubu interaksyonu (mor) ve endozomal hedefli motifler (yeşil) renklerle gösterilmiştir. Soru işareti korunmuş fakat varsayılan interaksyon bölgelerini gösterir. N-terminal bölgesi enzimatik aktivitesi C-terminal bölgeye göre daha azdır. N-terminal bölgesi proteinin regülatör rolünü ve protein-protein interaksyon bölgelerini içerir (Sikkeland et al., 2016). 11

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

- Şekil 2.8. Yukarıdaki üçlü resimde erken endozom yapılarıyla kolokalize olduğu gösterilmiştir. Alttaki iki resimde ise STAMP2'nin intrasellüler alandaki lokalizasyonu gösterilmiştir (Korkmaz et al., 2005). 12
- Şekil 2.9. STAMP2 diğer ismiyle STEAP4 ekspresyonunu etkileyen regülatörler gösterilmiştir (Scarl et al., 2017). 13
- Şekil 2.10. STAMP2 ifadesinin karakterizasyonu. (a) Birden fazla dokuda Northern blot tekniğiyle STAMP2 veya G3PDH cDNA'sı kullanılarak analiz yapılmıştır. Örnekler: 1. kalp, 2. beyin, 3. plasenta, 4. akciğer, 5. karaciğer, 6. iskelet kası, 7. böbrek, 8. pankreas, 9. dalak, 10. timus, 11. prostat, 12. testis, 13. Ovaryum, 14. ince bağırsak, 15. kolon, 16. periferik kan lökositleri. (b) Sentetik androjen R1881(10nm) ile 24 saatlik uygulanması sonucu STAMP2 probu kullanılarak northern blot analizi yapılmıştır. (C2), akciğer kanseri hücrelerinde (PC-3, DU-145, CA-HPV10, PZ-HPV7, YPEN-1) androjen reseptörü eksprese etmeyen birkaç prostat kanseri hücre hattında değerlendirildi NCI-H661), meme kanseri hücreleri (MCF7, MCF7-LCC1, MCF7-LCC2, MB435) veya servikal karsinom hücreleri (HeLa) Aynı bant STAMP1 cDNA probu ile de araştırılmıştır. (c) LNCaP hücrelerinde belli zaman aralıklarında uygulanan R1881 sonucunda STAMP2 mRNA birikimi olur. İzole edilen RNA'lar Northern blot analizinde kullanılmıştır (Korkmaz et al., 2005). 13
- Şekil 2.11. Gleason derecelendirmesi histolojik olarak tümörün agresiliğini gösteren bir metottur. Benign (malignant olmayan), malignant ve daha agresif malignant dereceli örnekler üzerinde yapılan histokimyasal boyamada STAMP2 proteini sentezi tümörün agresif durumuyla artış gösterdiği görülmüştür (Jin et al., 2015). 14
- Şekil 2.12. SIRT1 (A) yapısı, (B) fonksiyonu ve regülasyonu (Liu et al., 2013)... 15
- Şekil 4.1. Vektör haritaları üzerinden kesim sonrası beklenen fragmentler ve boyutları. 36
- Şekil 4.2. Kesim sonrası plazmitlerin jel elektroforezinde görüntülenmesi. 36
- Şekil 4.3. PC3 hücre hattında HM-STAMP2 ve pSG5-AR transfeksiyonu sonrası western blot 37
- Şekil 4.4. LNCaP ve PC3 hücre hatlarında, STAMP2 ektopik ekspresyonu ya da susturma deneylerinde glukoz üzerinden uyguladığım genel protokol. 38

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

- Şekil 4.5. Ektopik STAMP2 ekspresyonu sonucu SIRT1 bantlarında azalma gözlenmiştir. SIRT1 bant yoğunluklarının densitometrik analizi ImageJ programı kullanılarak yapılmıştır.38
- Şekil 4.6. STAMP2 aşırı ekspresyon durumunda ve farklı glukoz konsantrasyonlarında hücre canlılığı ve çoğalması oranları gösterilmiştir. (* p < 0.05).....39
- Şekil 4.7. STAMP2 susturulması sonucu p-Histon3-serin10 bantlarında büyük oranda azalma görülmüştür. SIRT1 bantlarında ise artış gözlenmiştir. siSIRT1 LNCaP örneğinde ise STAMP2 bandında artış görülmektedir. SIRT1 bant yoğunluklarının densitometrik analizi ImageJ programı kullanılarak yapılmıştır.....40
- Şekil 4.8. STAMP2 yokluğu ve farklı glukoz konsantrasyonlarının hücre canlılığı ve çoğalmasına etkisi gösterilmiştir. Canlılık Tripan mavisi hücre sayımı ile ve çoğalması WST-1 ile yapılmıştır. (* p < 0.05, ** p < 0.01).....41
- Şekil 4.9. İnflamasyon durumunda STAMP2 susuturulması sonucunda SIRT1, NKX3.1 ve OGG1 protein seviyelerinin değişimi.42
- Şekil 4.10. In silico yöntemler ile hazırlanan STAMP2 ilk ekzonunun önündeki 5000 bç'lik promotor bölgesinin transkripsiyonel bağlanma noktaları verilmiştir. (Daha önceki çalışmalarda Prof. Dr Kemal Sami Korkmaz tarafından bulunan ve yayınlanmamış bir veridir.)43
- Şekil 4.11. LNCaP hücrelerinde 6 günlük bir kronik inflamasyon modeli oluşturulmuş ve zamana bağlı bantlardaki değişim gösterilmiştir.43
- Şekil 4.12. LNCaP hücrelerinde 48 saatlik CM50 uygulaması sonrası hücrelerde çoğalma ve canlılık oranları çok yüksek artış göstermektedir. (** p < 0.01)44
- Şekil 4.13. Farklı hücre hatlarında farklı transfeksiyon ajanlarıyla yapılmış yeşil floresan proteinle birleşik STAMP2 proteini lokalizasyonu.45

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

- Şekil 4.14. PC3 hücre hattında STAMP2 ektopik ekspresyonu ve glukoz uygulaması yapılan ve 48 saatlik CM50 uygulanmış LNCaP hücre hatları üzerinde Nile Red floresan boyasıyla işaretlenmiş ve florometrik yöntemle ölçüm yapılmıştır (ex: 530, em: 636). (* p < 0.05, ** p < 0.01)47
- Şekil 4.15. STAMP2 ektopik ekspresyonu ve glukoz uygulaması yapılan PC3 hücre hattının immünofloresan mikroskoptaki görüntüsü. STAMP2 Alexaflour 488nm (yeşil), Nile Red 530nm (turuncu) ve DNA DAPI 364nm (mavi).....48
- Şekil 4.16. LNCaP hücre hattında 48 saatlik CM50 uygulaması sonrasıimmünofloresan mikroskoptaki görüntüsü. STAMP2 Alexaflour 488 (yeşil), Nile Red 530 (turuncu) ve DNA'da (mavi) ile işaretlenmiştir.48
- Şekil 5.1. SIRT1 fonksiyon kaybı veya arttığı durumların diğer sinyal yollarına etkileri gösterilmiştir (Liu at al., 2013).....52
- Şekil 5.2. Daha önceki veriler ve çalışmamız sonucu STAMP2 ile SIRT1 arasındaki olası ilişkiyi sinyal mekanizmaları.....53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
PCa	Prostat kanseri
TST	Testosteron
AR	Androjen reseptörü
GFP	Yeşil floresan protein
HM	Hismax
Si	Küçük interferans
WB	Western blot
CRPC	Kastrasyon dirençli prostat kanseri
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
NR	Nile red
DHT	Dihidrotestosteron
ROS	Reaktif oksijen türleri
Fe	Demir
Cu	Bakır

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
3.1 Ayırma jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları	27
3.2 Depolama jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları.....	27



1. GİRİŞ

Prostat kanseri, en sık olarak teşhis edilen kanserlerdendir. Erkeklerde Avrupa ve ABD'de kanser ölümlerinde ikinci sırada yer alır (Siegel et al., 2012). PCa gelişimi başlangıçta dolaşımdaki androjenlere bağımlıdır ve androjen yoksunluğuna yönelik hormonal terapiler tümörün büyümesini geriletir. Bununla birlikte, tanılarının çoğunluğunda, tedaviye cevap vermemekle birlikte ölüme neden olan kastrasyon dirençli bir PCa (CRPC) tekrar oluşmaktadır. Son gelişmelere rağmen PCa oluşumu ve CRPC'ye ilerleme ile ilgili moleküler mekanizmalar hala iyi anlaşılammıştır (Arnold and Isaacs, 2002; Shen and Abate-Shen, 2010; Dayyani et al., 2011; Yap et al., 2011). Bu sebeple hastalığın tanısı, biyolojik markör keşfi ve aynı zamanda PCa için terapötik hedeflerin tanımlanması gerekmektedir (Prensner et al., 2012).

Önceki araştırmalar, androjen reseptörünün (AR) aracılık ettiği androjen sinyalizasyonunun, CRPC'de dahil olmak üzere PCa'nın tüm evrelerinde rol oynadığını göstermiştir (Arnold and Isaacs, 2002; Shen and Abate-Shen, 2010; Dayyani et al., 2011; Yap et al. 2011; Bluemn and Nelson, 2012). AR aktivasyonu, hücresel işlevin birden çok yönü ile ilgili geniş bir gen kümesini düzenler. Genom çapındaki keşifler, PCa hücrelerinde birkaç yüz genin birincil AR hedef genleri olduğunu ortaya koymuştur (Velasco et al, 2004). Ek olarak, düzensiz androjen sinyalleşmesi PCa'da reaktif oksijen türünü (ROS) arttırmaktadır (Ripple et al. 1997; Sun et al. 2001; Frohlich et al. 2008; Basu et al. 2009). Hatta PCa gelişiminin oksidatif stres ile ilişkili olduğuda düşünülmüştür (Paschos et al., 2013). Fakat PCa'da ROS üretiminde değişikliğe neden olan net moleküler mekanizmalar şu anda bilinmemektedir.

Bu bulgular doğrultusunda, PCa gelişiminde androjen ile regüle olan genlerin belirlenmesinde STAMP2 geninin regülasyonundaki değişim keşfedilmiştir. Yapılan çalışmalarda STAMP2 mRNA ekspresyonunun, prostat kanseri epitelinde diğer normal prostat dokusu ve iyi huylu büyüme görülen prostat dokularına göre aşırı ifadesi saptanmıştır. STAMP2 ifadesi bulunmayan PCa hücrelerine gen transfeksiyonu yöntemiyle STAMP2 ektopik ekspresyonu sağlandığında hücrelerin çoğalması ve kolonizasyonunda artış görülmüştür (Korkmaz et al., 2005). Son gelişmeler STAMP2'nin PCa biyolojisinde önemli bir

rol oynayabileceğini öne sürmekle birlikte, STAMP2'nin PCa hücrelerinde hücre büyümesini nasıl modüle ettiği ve terapötik bir hedef görevi görebileceği konusunda açıklık daha getirilmemiştir. Bu bulguların yanı sıra, STAMP2 regülasyonunun aynı zamanda adiposit hücrelerindeki insülin toleransını ve makrofaj hücrelerindeki enflamasyon mekanizmalarını etkilediği görülmüştür. Bu nedenle metabolik hastalık ve ateroskleroz ile ilişkilendirilen çalışmalarda mevcuttur (Wellen et al., 2007; ten Freyhaus et al., 2012).

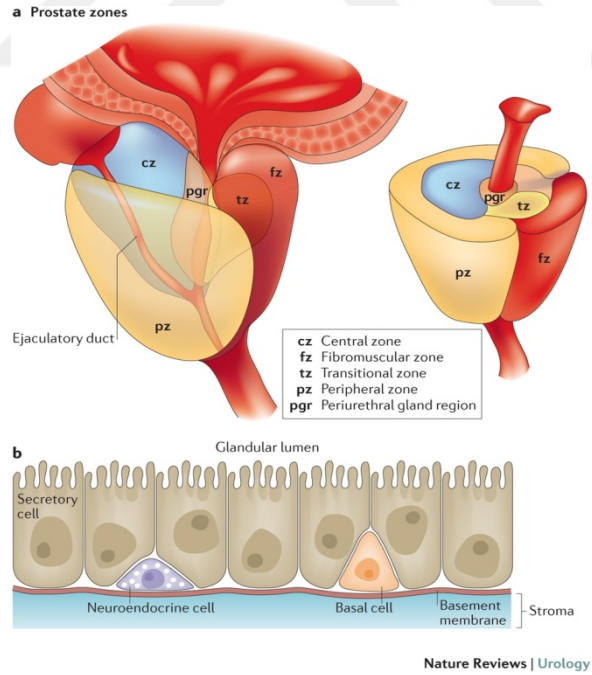
Bu tez çalışmasında, STAMP2 ile yapısında histon deasetilaz bölge bulunduran ve metabolik regülatör olan SIRT1 arasındaki ilişki üzerine çalışma yürütülmüştür. Farklı PCa hücre hatlarında transfeksiyon yöntemi uygulanarak bu iki genin susturulması ve ektopik ekspresyonu yapıldı. Aynı zamanda farklı metabolik koşullar altında hücre çoğalması, ROS yanıtı ve DNA hasarı mekanizmalarında yer alan proteinlerle olan etkileşimleri Western blot yöntemiyle saptandı. Elde edilen bilgiler doğrultusunda WST-1 testi ve Tripan Mavisi boyamayla hücre çoğalması-canlılığı analizleri yapıldı. Farklı metabolik koşullar altında bu iki genin arasındaki regülasyonun hücre metabolizmasına etkisi yağ yapılarını Nile Red ile işaretleyerek immünofloresan mikroskopi yöntemi ve florometrik okumayla gözlenmiştir.

Hücre çoğalması ve sağkalım gibi fonksiyonları bulunduran bu iki proteinin birbirleriyle etkileşimleri ve bulunan bağlantısı PCa gelişim sürecini daha iyi anlamamızı sağlayarak, gelecekte kanser tedavisinde terapötik etkiyi arttıracak çalışmalara ışık tutabilme önemine sahiptir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Prostat Bezi

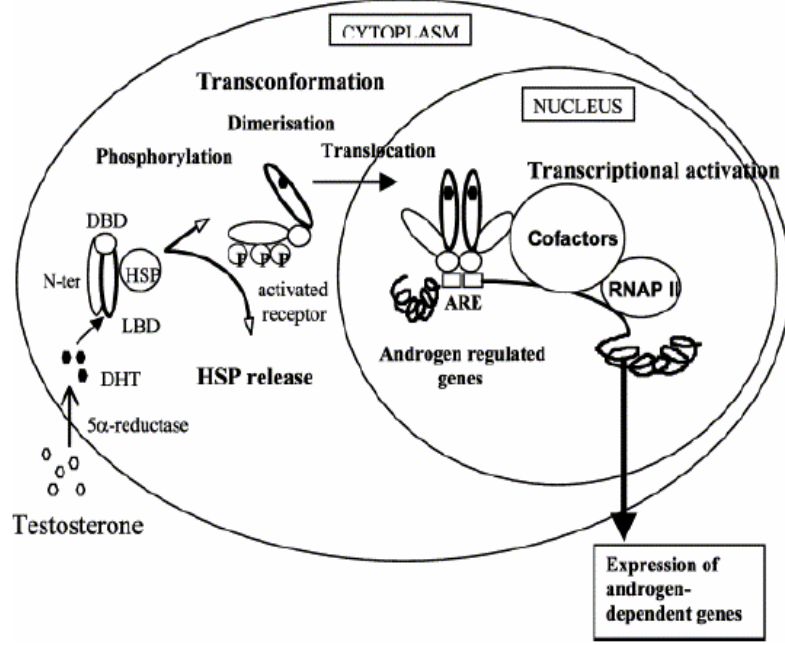
Prostat, erkeklerde idrar torbasının boynundaki idrar yolunu çevreleyen yaklaşık 30 gr ağırlığında ceviz büyüklüğünde ekzokrin bezdir. En önemli fonksiyonu semen oluşturmaktır (sperm hücreleri + seminal bezlerden gelen sıvı). Prostat düz kasları sayesinde semen ve üre çıkışını kontrol eder. Embriyonik yaşamın 9. haftasında primitif (ilksel) posterior üretradan içe doğru katlanma yapan birçok tübül grubundan gelişir. Prostat, bir yetişkinde sürekli olan birkaç lobdan oluşur. Loblar, bir seri tübül vasıtasıyla prostatik üretranın içine dağılan salgılayıcı epitel alveolleri ile kaplanmıştır. Salgı parankima, düz kaslar ve bağ dokusu ile bir arada bulunur (Verze et al, 2016).



Şekil 2.1. A-) Prostat bezi bölümleri. Transition bölgesi yaşlanmayla birlikte malignant olmayan prostat büyümesi eğilimindedir. Periferik bölge ise daha çok malignant tümörlerin ortaya çıktığı bölgelerdir. B-) prostat bezindeki hücre çeşitliliği gösterilmiştir (Verze et al., 2016).

2.1.1 Androjenler

Erkeklerin steroid hormonları olan Androjenler, polipeptit büyüme faktörü-5'e ek olarak, prostatın farklılaşması ve işlevinin korunması için gereklidir. Testosteron (TST), % 95'i testiste Leydig hücreleri tarafından üretilir ve erkeklerin kan dolaşımında dolaşan ana androjendir. Dolaşımında, dokular bağlı olduğu çeşitli proteinlerle düzenlenir. Bunlar şunlardır: seks hormonu bağlayıcı globulin (SHBG) ve albümin ve kortikosteroid bağlayıcı globulin 6 daha azdır. Prostatta serbest TST, hücrelere girer ve 5 α -redüktaz enzimi tarafından aktif formu olan 5 α - dihidrotestosteron (DHT)'a dönüştürülür. Hem TST hem de DHT, steroid reseptör süper ailesinin bir üyesi olan AR'ye bağlanabilir. Bununla birlikte, DHT'nin AR'ye bağlanma afinitesi TST'den beş kat daha fazladır. DHT bağlanması bozunmaya karşı daha dirençli AR konformasyonunda bir değişikliğe neden olur. Androjen yokluğunda AR, ısı şoku proteinleri (HSP'ler) ile kompleks halde sitoplazmada bulunur. Ligand bağlandığında, konformasyonel değişikliğe uğrar, HSP'lerden ayrışır ve hiperfosforile hale gelir. HSP-salınımı, dimerizasyon motiflerini ve nükleer lokalizasyon sinyalini açığa çıkarır. AR, çekirdeğe girmeye, dimerleşmeye ve androjen cevap yanıt elementlerine (ARE'lere) bağlanmaya hazırdır. Androjen düzenleyen genlerin promotorları ve / veya enhancerları içinde yer alan ARE'ler, AR çeşitli ortak faktörlerle birlikte gen transkripsiyonunun regülasyonunu arttıran veya azaltabilen sekanslardır (Sultan et al., 2002).



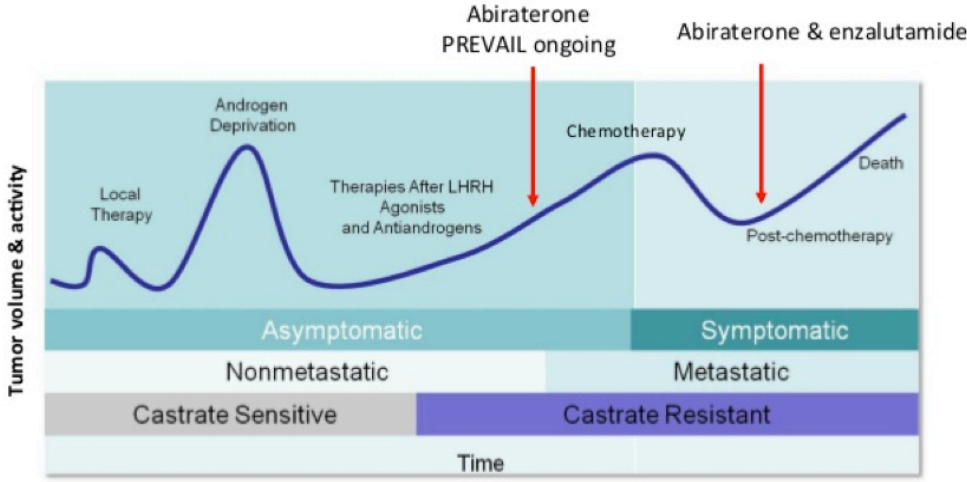
Şekil 2.2. Androjen aracılıklı gen regülasyonunun genel mekanizması. Serbest testosteron plazma zarından hücrenin içine girer ve 5α -redüktaz tarafından DHT'ye dönüştürüldükten sonra, AR'nin ligand bağlama alanına (LBD) bağlanır, daha sonra kompleksten HSP'ler ayrılır, fosforile olur, dimerleşir ve çekirdeğe girerek ARE'lere bağlanabilir ve kofaktörlerle birlikte gen ifadesini aktive eder / baskı altına alır (Sultan et al., 2002).

2.2 Prostat Kanseri

Androjene bağımlı olarak epitelyal ve stromal dokularda büyüme ve farklılaşma, hem prostat gelişimi hem de prostatik karsinom için önemlidir. 2007'de Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan istatistiksel analizlere göre, prostat kanseri, kolorektal kanser ile birlikte, 40 yaş ve üstündeki erkeklerde kanser ölümlerinde üçüncü sırada gelir.

Ergenlik yaşından sonra prostat boyutu, hücre proliferasyonunu uyaran ve apoptozu inhibe edebilen androjenler tarafından düzenlenir. Çoğu PCa, prostatın periferik bölümünden kaynaklanır. Prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN), PCa'nin morfolojik olarak saptanabilir ilk safhasıdır ve erkeklerde yirmili yaşlarda bile ortaya çıkabilir. Ayrıca, prostat büyümesi hastalığı 57-60 yaş civarında kanser gelişimine kadar yavaş ilerlemektedir. Lokal prostat tümörlerinin yaklaşık üçte

biri invaziv ve metastatik hale gelebilir ve diğer dokulara yayılabilir; kemik, karaciğer ve akciğer gibi. Başlangıçta androjen ablasyonu tedavisi sayesinde, androjene büyüme ve çoğalma sürecinde bağımlı olan tümörün gelişiminde gerileme görülmüştür. Fakat bu tedavi sonrası hormona direnç kazanarak tekrar ortaya çıkarlar. PCa'deki bu tekrar oluşum özelliği, klonal seçilim ve epigenetik mekanizmaların sonucu olduğu düşünülmektedir. Multifokal tümörlerin ve PIN'in androjen ablasyonundan sonra, bulunan androjen bağımsız hücreler yayılabilirler. Bu da androjenden bağımsız bir tümör oluşumuna yol açabilir. Bunun sonucunda, genetik veya epigenetik olaylardan sorumlu mutasyonların frekansları bize şu örnekleri sunabilir; AR genindeki mutasyonlar sonucu diğer hormonlarda duyarlılık artışı, AR aktivitesini etkileyen sinyal yollarındaki değişiklikler, AR yardımcı faktörlerde



imler

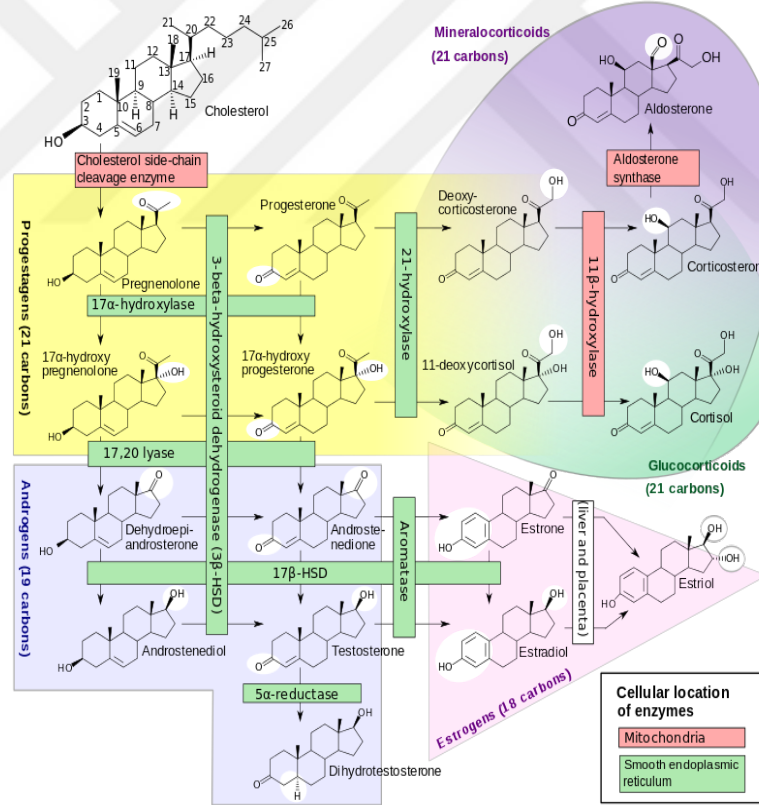
olabilir (Verze et al., 2016).

Şekil 2.3. Prostat kanseri tedavi süreci ve androjen ablasyonu sonrası kanserin kastrasyon direnci geliştirmesi (Verze et al., 2016).

2.3 Prostat Kanseri Gelişiminde AR rolü

PCa'nin sıklıkla tekrar ortaya çıkması yüzünden ve henüz etkili bir tedavi bulunmadığından, ana odak, PCa'nın androjen ablasyonu tedavisi sonrası hormona

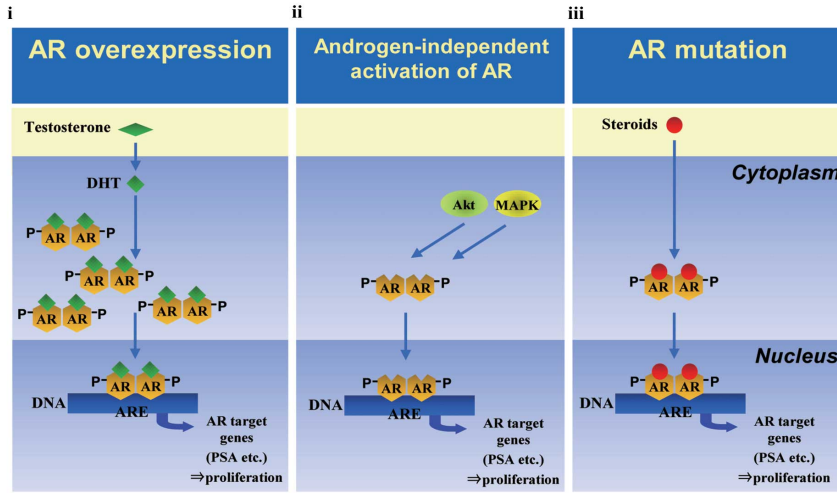
direnç geliştirmesine neden olan mekanizmaların incelenmesine yönelik olmuştur. Androjen ablasyon tedavisinde başlangıçta azalan regülasyonda olan androjen duyarlı genlerin, androjen bağımsız tümörlerde artan regülasyonda olduğu gözlenmiştir. Bu, AR'ün ligandtan bağımsız bir şekilde hareket edip etmediği sorusunu gündeme getirir ve eğer varsa, bunun arkasındaki mekanizmalar nelerdir ? AR'ü umut verici bir potansiyel terapötik hedef olarak gösteren bazı mekanizmalar önerilmiştir. Birincisi, steroid hormon koaktivatörlerinin ve AR'nün aşırı ekspresyonu önerilmiştir. Tekrarlayan tümörlerde AR geni amplifikasyonu (hem mRNA hem de protein seviyesi artar) yanı sıra artmış kararlılık, aktivite ve nükleer lokalizasyon gözlenmiştir. Ayrıca, AR LBD'de bir nokta mutasyonu, AR'ün androjen konsantrasyonunun çok düşük olmasına ve diğer androjenik olmayan ligandlara duyarlı olmasına neden olabilecek olaylardan biri olarak önerilmiştir.



şekil 2.4. Steroid hormonlarının başlıca sınıflandırılması ve enzimatik yollarını etkileşim gücü yüzdeleri. Testesteron=%100, 5α-dihidrotestesteron=%90, Androstanediol=%60, Androstenedione=%20, Dehidroplanandrosterone=%10, Androsterone=%10. 5α-

dihidrotestesteron'un prostat dokusunda testesterondan daha güçlü bir afiniteye sahip olduğu görülmüştür (Haggstrom and Richfield, 2014).

Androjen kastrasyonundan sonra dahi bazı hücre dışı androjenlerin hala mevcut olduğu prostatta bu tür yüksek duyarlılıktaki AR'ün aktifleşmesi ortaya çıkabilir. Ek olarak, prostat hücreleri, kolestrolde de novo sentez yoluyla hücre içi androjen kaynağı temin etme potansiyeline sahiptir. AR'ün hem düşük testosteron seviyesine hem de AR ligandtan bağımsız aktivasyona karşı aşırı duyarlılığının büyüme faktörlerinin neden olduğu öne sürülmüştür. Oto ve parakrin büyüme faktörleri tarafından uyarılan fosfoinositid-3 kinaz (PI3K) / Akt veya Ras / MAPK sinyal yolları, AR veya ortaklarının fosforilasyon yoluyla aktivasyonuna neden olabilir. Böylelikle büyüme faktörlerinin aşırı ekspresyonu ve bu sinyalleşme kademelerinin bileşenlerinin mutasyonları, ligand yokluğunda artmış aktivasyona neden olabilir. Son olarak, kanser gelişiminde yaygın olan bir dizi başka olay vardır. Bunların bazıları tümör baskılayıcı genlerin kaybı, onkogenin artan regülasyonu ve Bcl-2, Bcl-xL gibi antiapoptotik genlerin aşırı ekspresyonudur, bu da hayatta kalma yollarının artan regülasyonuna yol açar(Heinlein and Chang, 2004).



Şekil 2.5. Kastrasyon direnci mekanizması. 1-) Androjene aşırı duyarlılığı sonucu AR'nün aşırı ekspresyon durumu. 2-) Sitokinler ve büyüme faktörlerinin düzensizliği aracılığıyla AR'ın androjen-bağımsız aktivasyonu. 3-) AR mutasyonu sonucu ligand spesifitesini kaybetmesi (Ishikura et al., 2015).

2.4 Prostat Kanseri Gelişiminde İnflamasyon ve Ros'un Rolü

Organizmayı çevresel etmenlere karşı korumada önemli rol oynayan immün savunma mekanizmaları, bu dokularda malignant gelişimi tetikleyebilir. Bu olay inflamasyon-indüklü tümöröenez olarak adlandırılır. Toll benzeri reseptör (TLR) fonksiyonu, normal hücrelerdeki doğuştan gelen ve adaptif immün cevaplarının regülasyonu için kritiktir ve genellikle immün savunmanın sensör kabiliyetini etkileyebilen malignant hücrelerin defektif fonksiyonelliklerini ayırt etmeyi gerektirmektedir. NF- κ B, ERK gibi pro-survival faktörlerin ve JNK kinazların ayrıca artan seviyelerdeki IL-6 ve IL-12 ' nin aktivasyonu, malignant hücrelerde yüksek oranda eksprese edilen TLR seviyesi ile bağlantılıdır. Bu bulgular, kronik inflamasyon ve kanser gelişiminde TLR'lerin önemli bir rolü olduğunu işaret etmektedir. İlginç olarak TLR4, prostat kanserini de içeren çeşitli tipteki kanserlerde metastaz ile ilişkilendirilmiştir. Yüksek metastatik özellikteki insan prostat kanseri hücre hatları olan PC3 ve DU-145, RWPE ve LNCaP prostat hücre hatlarına kıyasla daha fazla seviyede TLR4 eksprese etmektedir. Bu hücreler, in vitroda LPS ile muamele edildikleri zaman, TNF- α indüklenir (nM konsantrasyona ulaşan) ve prostat kanseri hücrelerinde çoğalma ve migrasyon gözlemlenir. Aksine, TLR4 ekspresyonu yokluğu, bu hücrelerin invazyon özelliğini inhibe eder ve tümör taşıyan hayvanların sağkalımını ilerletir. Bu durum yüksek TLR4 seviyesi ya da aktivasyonunun sitokin maruziyeti üzerinden tümör hücre proliferasyonunu anlamlı bir şekilde artırdığı fikrini öne sürmektedir. Bu nedenle normal ve düşük dereceli tümörlerde TLR4 ekspresyonu, karsinogenezisi destekleyen kronik inflamasyona katkıda bulunan bir faktör olabilir. Bununla birlikte, prostata spesifik ve androjenle regüle olduğu bilinen tümör süpresör geni NKX3.1, bir homeobox proteini kodlar ve intrasellüler ROS seviyelerini azaltan ve DNA hasar yanıtını aktive eden glutatyon peroksidazları ve peroksiredoksinleri transkripsiyonel olarak regüle ederek antioksidant cevabı kolaylaştırır.

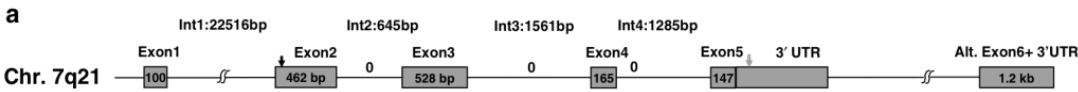
Ayrıca, metabolik büyüme oranı, stres algılayan ve NAD bağımlı bir deasetilaz olan SIRT1 üzerinden regüle edilir. İnflamasyon gibi oksidatif koşullar altında SIRT1, hücre döngüsü kontrolünü sağlayan p53'ün, DNA hasar yanıtı oluşturan NBS1'in ve prostat hücrelerinde steroid hormon faaliyetini düzenleyen

AR'ın da aralarında bulunduğu bir seri transkripsiyon faktörünü deasetile eder. Bu nedenle SIRT1, özellikle de prostat kanserinde AR'ın deasetilasyona uğramasıyla tümör hücre sağkalımı ile ilişkilendirilmiştir. Böylece TLR4 ilişkili hücresel mekanizmalar üzerinden indüklenen inflamasyon, artmış genetik heterojenitenin AR üzerinden baskılandığı ve AR'ın aktive olmuş SIRT1 tarafından deasetilasyonu ile tümör gelişimindeki stres toleransına neden olan hücre gelişiminin deregülasyonunun engellediği prostatta, antioksidant yanıtın ve DNA hasar tespitinin azalmasına yol açar (Multhoff et al., 2012)

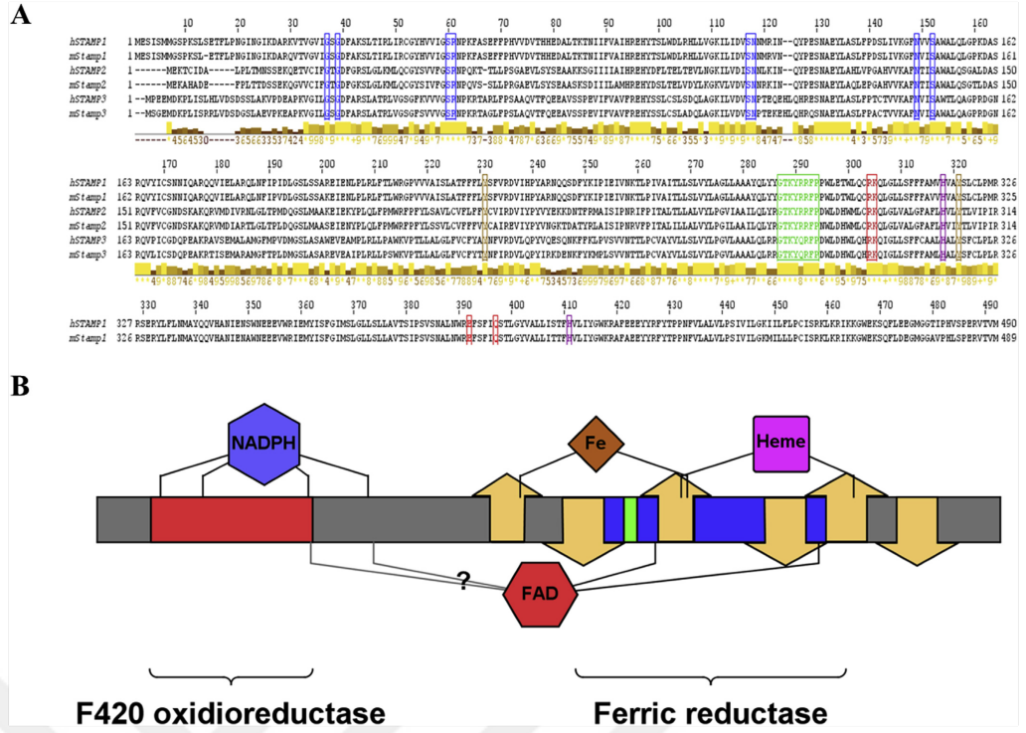
2.5 STAMP2 Genel Özellikleri ve Kanser Metabolizmasına Etkisi

2.5.1 Yapı ve Fonksiyonu

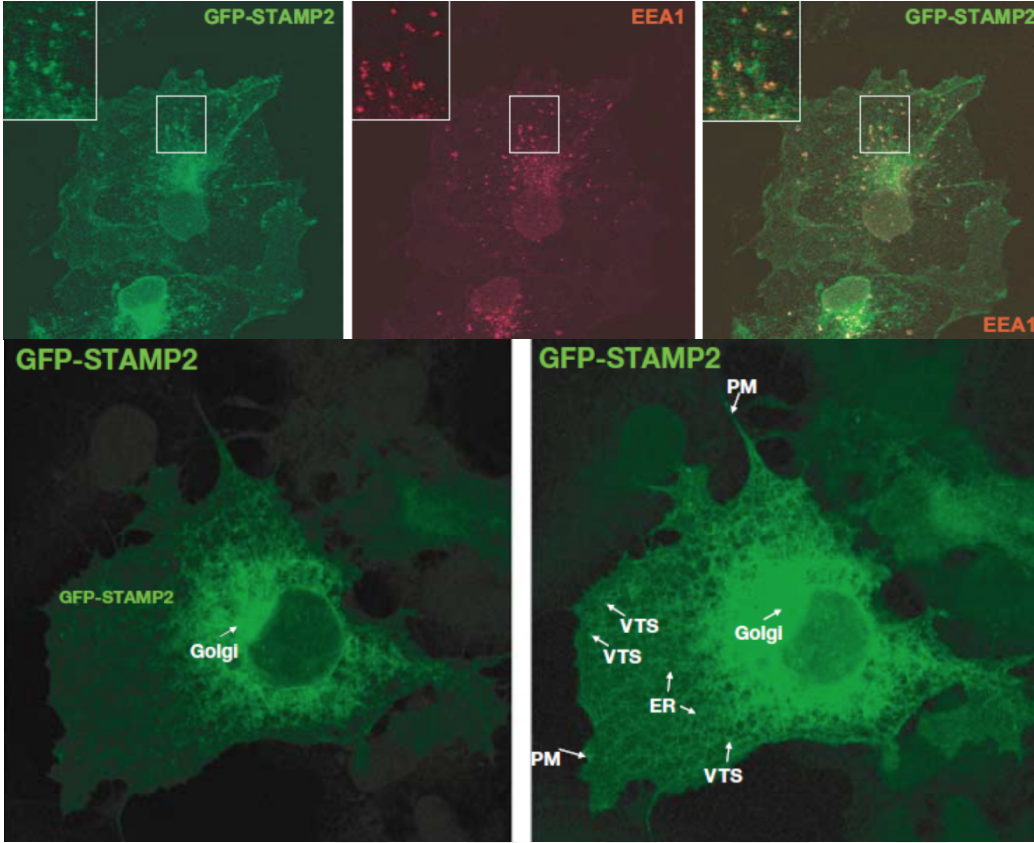
Prostat kanserinin erken safhalarında farklı şekilde ifade edilen genler araştırılırken altı membran geçişli prostat proteini 2 / six transmembrane protein of prostate (STAMP2) adı verilen ve STAMP1'e yüksek sekans benzerliği olan yeni bir gen keşfedilmiştir. STAMP2, kromozom 7q21 üzerinde bulunur ve 5 ekson, 4 intron içerir. Genomik dizi nispeten küçüktür (yaklaşık 26 kb) çünkü intron 1 son derece büyüktür (22.516 bp). Protein 495 amino asitten oluşur ve C-terminal alanına yakın 6 transmembran bölge içerir (Korkmaz et al., 2005).



Şekil 2.6. STAMP2 geninin kromozom 7q21 üzerindeki konumu ve şematik yapısı. STAMP2 gen yapısı gösterilmiştir. İtronlar ve ekzonlar boyutlarıyla beraber gösterilmiştir. Tahmin edilen başlangıç ve dur kodonları siyah ve gri oklarla gösterilmiştir (Korkmaz et al., 2005).

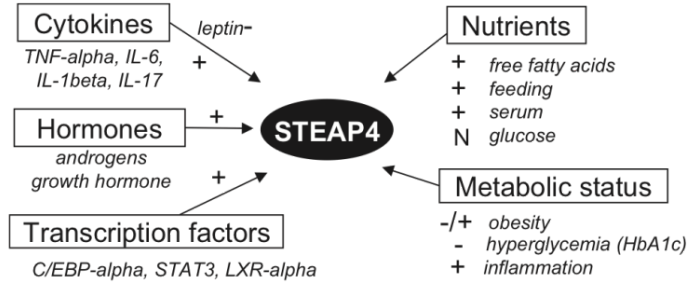


Şekil 2.7. STAMP2 gen (A) ve protein (B) bölgeleri gösterilmiştir. NADP oksidoreduktaz (mavi), FAD interaksyonu (kırmızı), Demir interaksyonu (kahverengi), heme grubu interaksyonu (mor) ve endozomal hedefli motifler (yeşil) renklerle gösterilmiştir. Soru işareti korunmuş fakat varsayılan interaksyon bölgelerini gösterir. N-terminal bölgesi enzimatik aktivitesi C-terminal bölgeye göre daha azdır. N-terminal bölgesi proteinin regülatör rolünü ve protein-protein interaksyon bölgelerini içerir (Sikkeland et al., 2016).



Şekil 2.8. Yukarıdaki üçlü resimde erken endozom yapılarıyla kolokelize olduğu gösterilmiştir. Alttaki iki resimde ise STAMP2'nin intrasellüler alandaki lokalizasyonu gösterilmiştir (Korkmaz et al., 2005).

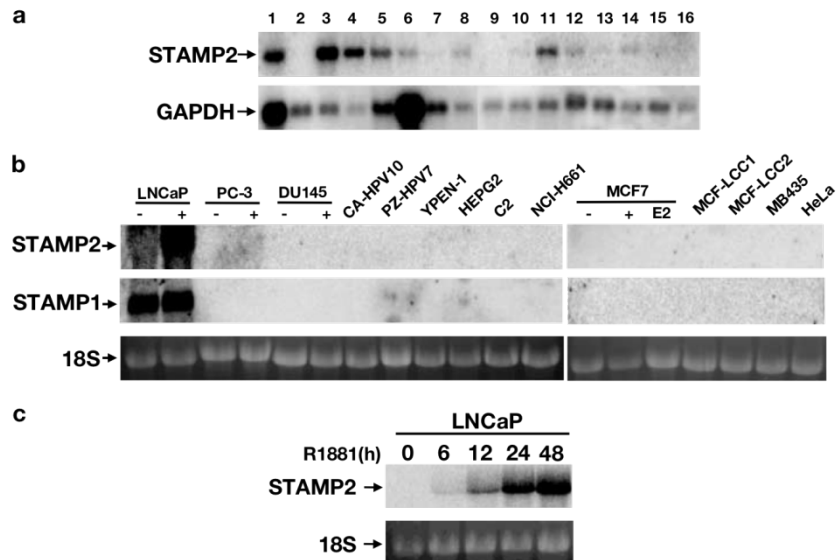
Daha önceden yapılan çalışmalarda STAMP2 hücrede golgi, trans-golgi ağına ve plazma membranına lokalize olduğu görülmüştür (Şekil 2.8). Fonksiyonel olarak, Stamp2 oksidoredüktaz bölgesinin sitoplazmik NADPH'den iki elektron alır (NADP^+ 'ya yükseltger), bunları transmembran bölgesinin sitosolik yüzünde FAD'a aktararak FADH_2 'ye indirgemektedir. FADH_2 , aynı anda elektronları, transmembran heme vasıtasıyla, hücre yüzeyi metal bağlama alanına geçirir ve bu bölgede Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} ,ye veya Cu^{+2} , den Cu^{+1} 'e indirgenme gerçekleşir. Fe^{+2} ve Cu^{+1} daha sonra kendi taşıyıcıları tarafından zar boyunca taşınmaya hazır duruma gelir. Hücre metabolik dengesinde önemli olan bu protein inflamasyon, hücre büyümesi ve kanserdeki potansiyel rolleri ile STAMP2 ekspresyonu birçok farklı faktörlerle düzenlenir. Bilinen düzenleyici faktörler aşağıda Şekil 2.9'da özetlenmiştir (Sikkeland et al., 2016; Scarl et al., 2017).



Şekil 2.9. STAMP2 diğer ismiyle STEAP4 ekspresyonunu etkileyen regülatörler gösterilmiştir (Scar1 et al., 2017).

2.5.2 Doku ve Hücrelerdeki ekspresyonu

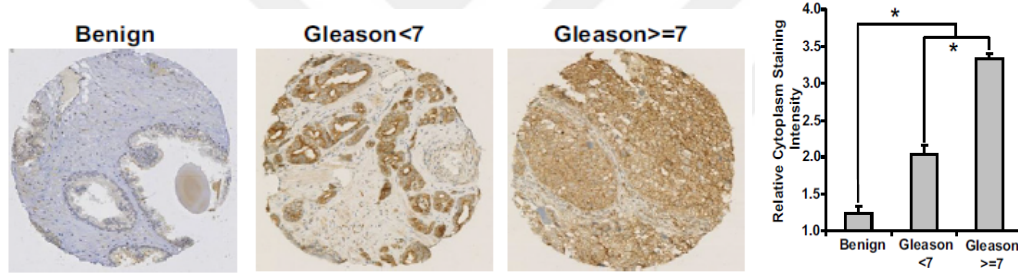
Yapılan çalışmalarda STAMP2'nin prostat kanserinde çok fazla ekspresyonu olduğu bulunmuştur. Androjen reseptörü pozitif prostat kanseri hücrelerinde androjen ile regüle edildiği fakat androjen reseptörü negatif hücrelerde ise ekspresyonu görülmemiştir. Bu da androjen ile regüle edilebilen bir gen olduğunu göstermiştir. Prostat kanseri hücrelerinde, normal prostat epitel hücrelerine oranla daha fazla STAMP2 ekspresyonu saptanmıştır.



Şekil 2.10. STAMP2 ifadesinin karakterizasyonu. (a) Birden fazla dokuda Northern blot tekniğiyle STAMP2 veya GAPDH cDNA'sı kullanılarak analiz yapılmıştır. Örnekler: 1. kalp, 2. beyin, 3.

plasenta, 4. akciğer, 5. karaciğer, 6. iskelet kası, 7. böbrek, 8. pankreas, 9. dalak, 10. timus, 11. prostat, 12. testis, 13. Ovaryum, 14. ince bağırsak, 15. kolon, 16. periferik kan lökosit. (b) Sentetik androjen R1881(10nm) ile 24 saatlik uygulanması sonucu STAMP2 probu kullanılarak nothern blot analizi yapılmıştır. (C2), akciğer kanseri hücrelerinde (PC-3, DU-145, CA-HPV10, PZ-HPV7, YPEN-1) androjen reseptörü eksprese etmeyen birkaç prostat kanseri hücre hattında değerlendirildi (NCI-H661), meme kanseri hücreleri (MCF7, MCF7-LCC1, MCF7-LCC2, MB435) veya servikal karsinom hücreleri (HeLa) Aynı bant STAMP1 cDNA probu ile de araştırılmıştır. (c) LNCaP hücrelerinde belli zaman aralıklarında uygulanan R1881 sonucunda STAMP2 mRNA birikimi olur. İzole edilen RNA'lar Nothern blot analizinde kullanılmıştır (Korkmaz et al., 2005).

Buna ek olarak, prostat kanseri hücre hattında STAMP2'nin ektopik ekspresyonu hücre proliferasyonunu arttırdığı görülmüştür. Bu veriler ışığında STAMP2'nin normal prostat fizyolojisinde ve prostat kanserinin ilerlemesinde önemli bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir (Korkmaz et al. 2005).



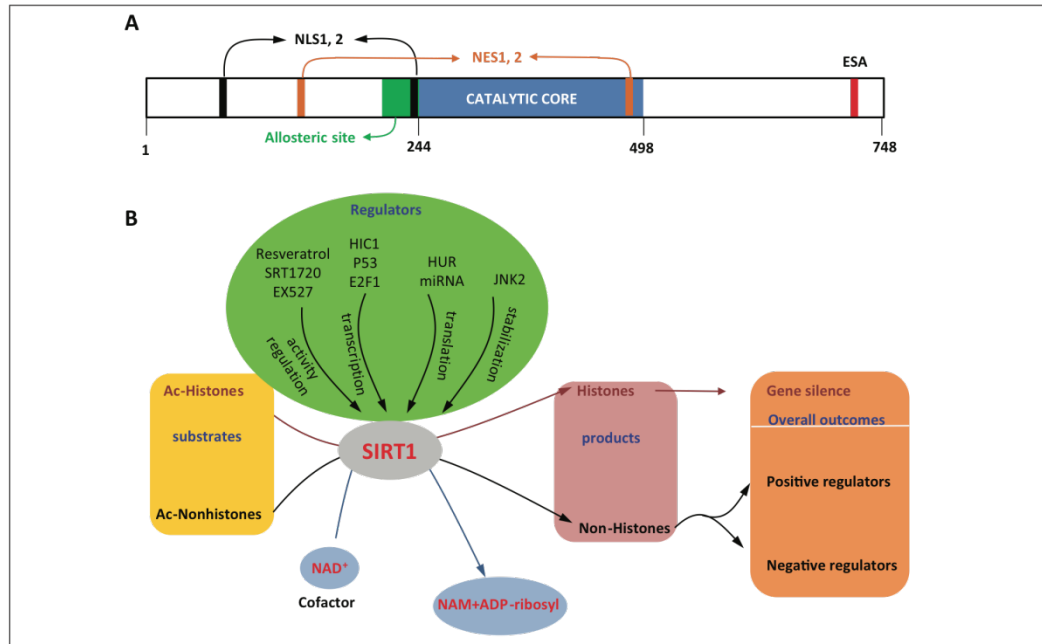
Şekil 2.11. Gleason derecelendirmesi histolojik olarak tümörün agresivliğini gösteren bir metottür. Benign (malignant olmayan), malignant ve daha agresif malignant dereceli örnekler üzerinde yapılan histokimyasal boyamada STAMP2 proteini sentezi tümörün agresif durumuyla artış gösterdiği görülmüştür (Jin et al., 2015).

2.6 SIRT1 Genel Özellikleri ve Kanser Metabolizmasına Etkisi

İnsan SIRT1, N-terminal alanı (1-182), allosterik bölge (183-243), katalitik çekirdek (244-498) ve C-terminal bölgesi olmak üzere 4 ana bölüme ayrılmış 747 amino asitten oluşur (499-747). Bağlanma duyarlılığı analizi sonucu SIRT1 aktivitesi için N- ve C-terminalleri gereklidir. N- veya C-terminalinin silinmesi ile kesilen SIRT1 mutantları, deasetilasyon reaksiyonunu katalize edememektedir. Özellikle, C-terminalinde 25 amino asit dizisi (631-655) SIRT1 aktivitesi için

gereklidir. İki nükleer giriş ve iki nükleer çıkışı olan N-terminal bölgesinde diziler çok önemlidir çünkü SIRT1'in, farklı fizyolojik ve patofizyolojik ortamlarda SIRT1 gereksinimlerini karşılamak için çekirdek ve sitoplazma arasında serbestçe yer değiştirmesine izin verirler.

SIRT1 protein deasetilasyon reaksiyonunu katalizleyebilmesi için subdomain içeren katalitik bölgesine NAD^+ ve substrat bağlanması gerekir. NAD^+ , subdomain arayüzündeki iki hidrofobik yamanın spesifik bir cebine bağlanır. Asetillenmiş substrat, NAD^+ bağlanma bölgesinin yanında küçük bir çinko alanına bağlanır. NAD^+ bağlanması, substrat protein erişimini arttırmak için katalitik çekirdeğin sekonder yapısını değiştirir. Bu gözden geçirilmiş yapısal düzenleme, protein deasetilasyonunun SIRT1'in katalizörünün NAD^+ bağımlı olmasını ve NAD^+ 'ın katalitik çekirdeğe bağlanmasıyla başlatılan sıralı bir biyokimyasal reaksiyon olarak ilerlemesini sağlar. Katalitik çekirdeğin N-terminalinin yanında, sirtuin aktivitesini olumlu şekilde düzenleyen sıkıştırılmış allosterik alan vardır. Sirtuin (AROS) ve resveratrol gibi SIRT1 aktivatörlerinden oluşan küçük bir nükleer protein aktif regülatör, allosterik bölgeye bağlanır ve SIRT1'e bağlı p53 deasetilasyonunu uyarır.



Şekil 2.12. SIRT1 (A) yapısı, (B) fonksiyonu ve regülasyonu (Liu et al., 2013).

SIRT1, kromatin yapısı, gen transkripsiyonu, metabolizma, sirkadyen ritim ve inflamasyon gibi çeşitli hücrel süreçlerde düzenleyici rol oynar. Geniş substratları ve subseleler bölmeler arasında serbest translokasyonun benzersiz özelliklerinden dolayı çok fazla fizyolojik işlev görebilir. Temelde, hedeflendiği iki grup asetillenmiş protein vardır: histon ve histon olmayan proteinler. Histon proteinlerinin asetilasyon / deasetilasyon durumu, kromatinin gen transkripsiyonu için erişilebilir olup olmadığını belirler. SIRT1 aktif olarak H1K26, H3K9 ve H4K16'nın deasetillenmesini sağlar ve gen transkripsiyonunu susturarak kromatin DNA kompaksiyonunu kolaylaştırır.

Buna karşılık, SIRT1'in histon olmayan substratları genellikle sinyal iletimini, metabolizmasını veya gen transkripsiyonunu kontrol eden moleküller veya enzimlerdir. Farklı protein özellikleri ve hücrel konumları, SIRT1'in farklı hücrel süreçlerde veya belirli bir işlemin farklı evrelerinde çift düzenleyici rol oynamasına olanak tanır. Örneğin, SIRT1, NFκB / p65'in deasetilasyonu ile proinflamatuvar gen ekspresyonunu devre dışı bırakır, ancak akut enflamasyon sırasında RelB'yi ve PGC-α'yı hedefleyerek anti-inflamatuvar gen ekspresyonunu uyarır. Substrat seviyesinde, SIRT1, p53'ün asetilasyonunu azaltarak apoptozu engeller, ancak asetil CoA sentaz 1'in deasetillenmesiyle yağ asiti sentezini uyarır.

Bu geniş SIRT1 biyoaktivitesi deasetillendirme katalizinin, transkripsiyonun, translasyonun ve stabilizasyonun hassas regülasyonu ile koordine edilir. Spesifik bağlanma sahaları, SIRT1 aktivatörlerinin / inhibitörlerinin deasetilaz aktivitesinin yoğunluğunu manipüle etmesine izin verir, ancak NAD⁺ varlığı, SIRT1 aktivasyonunun birincil ölçüsüdür. NAD⁺ / NADH oranı subseleler kompartmanları arasındaki SIRT1 translokasyonunu belirler: katalitik merkezdeki NAD⁺ bağlanma bölgesi için yarışmalı olarak hidrolize NAD⁺ 'ın ürünü NAM'dan gelen negatif geri bildirimle katalitik bölgedeki NAD⁺ bağlanma alanları için yarışmalı olarak SIRT1 aktivitesini inhibe ederken, daha fazla NAD⁺ bağlanmasıyla SIRT1 aktivasyonu oluşur. Bu nedenle, NAD⁺ geri kazanım yolağında nicotinamide phosphoribosyl-transferase (NAMPT) ve nicotinamide mononucleotide adenil-transferase (NMNAT) ve kynurenine NAD⁺ sentezi yolağında indoleamine 2,3-dioxygenase bu enzimler hem NAD⁺ seviyesi artışıyla hemde NAM seviyesi düşüşüyle SIRT1 aktivasyonunda anahtar rol oynarlar. NAD⁺ 'ın metabolik yollardaki pek çok dehidrogenaz için de bir yardımcı faktör

olduğunu, dolayısıyla hücrel metabolizmanın SIRT1 aktivitesi tarafından düzenlenir. Aşırı açlık veya kalori kısıtlaması NAD^+ 'yi artırır ve SIRT1 aktivasyonunu uyarır; Azaltıcı ajan $NADH$ yüksek seviyeleri SIRT1 aktivasyonunu sınırlar (Liu et al., 2013).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Cihaz

- Sınıf II güvenlik kabini (Esco, Hollanda)
- Fluoroskan Ascent Mikroplate Okuyucu (Thermo Fischer Scientific, ABD)
- CO₂'li inkübatör (Sanyo-MCO- 18AIC, Japonya)
- Su banyosu (GFL Model: 1008)
- İnvörted ışık mikroskobu (Leica DMIL, Almanya)
- Blok ısıtıcı (Grant-QBA2, İngiltere)
- Buz makinesi (ITV, USA)
- Orbital çalkalamalı inkubatör (Biosan-ES20)
- Mini soğutmalı santrifüj (Sigma- B6916, Almanya)
- Santrifüj (Eppendorf 5415D ve 5415R, ABD)
- Sonikasyon
- pH metre (Hanna- HI221, Almanya)
- Manyetik karıştırıcı (Wisd-MSH20A, Almanya)
- Çalkalayıcı (Heidolph- ROTAMAX 120, Almanya)
- Spektrofotometre (Amersham Biosciences-Ultraspec 100 Pro., ABD)
- Protein jel elektroforez sistem (BioRad, ABD)
- Kuars küvet (Hellma-105.202QS, Almanya)
- Hücre kültür kapları ve flasklar (Greiner, Almanya)
- Erlen
- 2.5- 5- 10 ve 25 ml hacimli steril pipetler (Orange, İtalya)
- Pastör pipetler
- 15 ml ve 50 ml'lik falkon tüpleri (Jet Biofil, İtalya)
- 1-10, 20-200 ve 100-1000 µl otomatik pipetler (Brand-Transferpette S, Almanya)
- Pipet uçları (VWR, ABD)
- Eppendorf tüpler (Grainer- Almanya)
- Filtre başlıkları 45 mm
- Enjektörler (Ayset, Türkiye)
- Hemositometre (Neubauer)
- 22×22 mm no:1 lamel (Marienfeld-0101050, Germany)
- Hücre kazıyıcı (Cell Scraper- TPP 9903, İsviçre)

- Yürütme aparatı (C.B.S. Scientific- MGV 202, ABD)
- Transfer aparatı (C.B.S. Scientific- EBX 700, ABD)
- Whatman kağıtları
- Polyvinylidene fluoride (PVDF) transfer membranı (Roche- 03010040001, Almanya)
- Pozlamanın gerçekleştiği kaset (Amersham Hypercassette, RPN 11643)
- Film (Kodak, 8143059)
- Asetat kağıtları

3.2 Sarf Malzemeler

- DMEM F12 (Gibco-31330, ABD)
- DMEM (Gibco-1810192, ABD)
- RPMI 1640 (-) glucose (Gibco-1809333, ABD)
- RPMI 1640 (Gibco-11875127, ABD)
- WST1 Reagent (Roche- 05015944001, Almanya)
- Fötal dana serumu (FBS) (Gibco- 10270, ABD)
- HEPES, H4034, Sigma
- Tripsin-EDTA (Gibco- 3103382, ABD)
- Penisilin/Streptomisin (Gibco- 15140, ABD)
- L-glutamin (Gibco- 25030, ABD)
- DMSO (Merck- K33960212-504, ABD)
- Proteaz inhibitör kokteyl (PIC) (Roche- 04693159001, Almanya)
- Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) (Fluka- 93482, Almanya)
- Fosfataz inhibitör kokteyl (Roche- 04906837001, Almanya)
- NaF 100X (100 mM), (Merck- B815549 606, ABD)
- Modifiye RIPA tamponu
 - ✓ 10 mM trima baz pH=8.0 (Sigma- T5941, Almanya)
 - ✓ % 0.1 SDS (Sigma- L4390, Almanya)
 - ✓ % 1 triton x-100 (Sigma- T8787, Almanya)
 - ✓ % 0.1 sodyum deoksikolat (Sigma- D6750, Almanya)
 - ✓ 1 mM EDTA (Sigma- K5134, Almanya)
 - ✓ 1 mM EGTA (Sigma- E3889, Almanya)
 - ✓ 140 mM NaCl (Sigma- S3014, Almanya)

- BCA kiti (Sigma- 088K6138, Almanya)
- % 4 Paraformaldehit (AppliChem- A3813, Almanya) pH:7.8
- Methanol (Merck- 1552608034, ABD)
- D-(+)-Glucose, G7528, Sigma
- Etanol (Merck- K41414186 038, ABD)
- BSA (USB- 10857, ABD)
- % 30 akrilamid karışımı için
 - ✓ % 29 akrilamid (Sigma- A9099, Almanya)
 - ✓ % 1 N, N- metilenbisakrilamid (Sigma- M2022, Almanya) karışımı hazırlanarak filtrelendi ve gazı alınarak kullanıldı.
- 4X SDS-PAGE ayırma jel tamponu
 - ✓ 1.5 M trizma baz (pH: 8.8) (Sigma- T5941, Almanya)
 - ✓ % 0.4 SDS (Sigma- L4390, Almanya), pH 8.8
- 4X SDS-PAGE depolama jel tamponu
 - ✓ 0.5 M trizma baz (pH: 6.8) (Sigma- T5941, Almanya)
 - ✓ % 0.4 SDS (Sigma- L4390, Almanya), pH 6.8
- Amonyum persülfat sol (% 10) (Sigma- A9164, Almanya)
- TEMED (Sigma- T9281, Almanya)
- 10X yürütme tamponu (1X olarak kullanılır)
 - ✓ 30 g trizma baz (Sigma- T6066, Almanya)
 - ✓ 144 g glisin (Biochemika/FLUKA- 50046, Almanya)
 - ✓ 10.0 g SDS (Sigma- L4390, Almanya) ile 1 lt dH₂O içerisinde hazırlanılmıştır.
- 4X yükleme tamponu
 - ✓ 40 mM trizma baz (pH 8.0) (Sigma- T6066, Almanya)
 - ✓ 0.4 mM EDTA (Sigma- K5134, Almanya)
 - ✓ % 4 SDS (Sigma- L4390, Almanya)
 - ✓ % 20 gliserol (Sigma- G5150, Almanya)
- ✓ Brom fenol mavisi 200 µl (Merck- L54971322 525, ABD)
- 10X transfer tamponu (1X olarak kullanılır)
 - ✓ % 20 metanol (Merck- K34212908503, ABD)
 - ✓ 30.0 g trizma baz (Sigma- T6066, Almanya)
 - ✓ 144.0 g glisin (Biochemika/FLUKA- 50046, Almanya) ile 1 lt dH₂O içerisinde hazırlanılmıştır.

- Beta-mercaptoetanol (Sigma, M3148)
- 10 X TBS (pH 7.6), toplam hacim 1L
 - ✓ 12.1 g trizma baz (Sigma, T6066)
 - ✓ 80.0 NaCl (Sigma, S3014)
- TBS-T için 1X TBS içine % 0.1 Tween 20 (Sigma, E1383) ilave edilmiştir.
- Yağsız süt tozu (Saliler, Almanya)
- Anti-rabbit IgG horse radish peroxidase (HRP) (Amersham- NA934, ABD)
- Anti-mouse IgG horse radish peroxidase (HRP) (Amersham- NA931, ABD)
- Anti-goat IgG horse radish peroxidase (HRP), sc-2020, Santa Cruz
- Anti- β -Aktin antikoru (Sigma- A5316, Almanya)
- Anti- STAMP2 (T-15), sc-104675, Santa Cruz
- Anti-Androgen Receptor Antibody, 06-680, Millipore
- Anti-SIRT1 antibody, S5447, Sigma
- Anti-GAPDH antikoru (Ambion, 447288, ABD)
- Anti-NKX3.1 (T-19x), SC15022X, Santa Cruz
- Anti-OGG1, Thermoscientific
- Anti NRF2 antikoru (C-20), sc-722, Santa Cruz Biotechnology
- P-Histone H3 (ser10)-R, Sc-8656-R, Santa Cruz Biotechlogy
- Anti-Goat IgG (Invitrogen Molecular Probes Alexa Flour 488) (Invitrogen- A11001, ABD)
- Nile Red, 72485 SIGMA
- ECL PLUS kiti (GE Healthcare Amersham Western Blot detection system, RPN2132, ABD)
- Ampisilin (Mustafa Nevzat İlaç San., Türkiye)
- SOB medium (Super Optimal Broth/ PBS) (0.25 g NaCl (Sigma- S3014, ABD), 10 g Trypton (Biolab-TRP10500, Macaristan), 25 g maya ekstresi (Biolab- YEE10500, Macaristan) ile 450 ml dH₂O içerisinde hazırlandı ve üzerine 0.25 M KCl'den 5 ml eklendi. Besiyerinin pH'ı 5 N NaOH ile 7'ye tamamlandı.)
- LB toz halinde (Sigma, Almanya)
- LB-Agar (15 g agar, 20 g LB, 1 lt'ye kadar dH₂O)
- Gliserol (Sigma- G5150, ABD)
- HiSpeed plazmit midi izolasyon kiti (Qiagen-12643, Almanya)

- Agaroz (Sigma-A5093, ABD)
- TAE tamponu (4.84 g trizma baz, 1.41 ml glasiyel asetik asit, 3.72 g Na₂EDTA, 1 lt'ye kadar dH₂O) pH: 8.0
- Etidyum Bromid (BioChemica-A1152)
- HM- boş vektör
- 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solüsyonu;
0.25 µg/ml DAPI dilactate (Sigma- D9564, Almanya)

% 30 gliserol (Sigma, Almanya)

% 70 PBS

- HM-STAMP2 konstraktı
- Scr-RNA (Santa Cruz- sc93940, Almanya)
- siSTAMP2 (Santa Cruz- sc-89820, Almanya)
- DharmaFECT Duo Transfection Reagent,(T-2010-02 Dharmacon)
- DharmaFECT 2 transfection Reagent, T-2002-02, Dharmacon
- FuGene HD Transfection reagent, E2312
- Developer (Kimetsan- Fast X-Ray Developer Sol., Türkiye)
- X-treme GENE HP DNA Transfect Reagent, 06 366 236 001, Roche
- Fikser (Kimetsan- Fast X-Ray Fikser Sol., Türkiye)
- % 0.4 Tripan mavisi solüsyonu (Sigma- T6146, ABD)
- Fosfat tamponu (Phosphate Buffered Saline / PBS)
 - ✓ 8 g NaCl (Sigma- S3014, ABD)
 - ✓ 0.2 g KCl (Merck- 1049360250, ABD)
 - ✓ 1.57 g Na₂HPO₄.2H₂O (Merck- K22287176, ABD) ile 1 lt dH₂O içerisinde hazırlanarak 6M HCl ile pH 7.4'e ayarlandı.
- Deneylede ATCC'den temin edilen 3 farklı hücre hattı kullanılmıştır.
 1. LNCaP (insan prostat karsinomu lenf nodu metastazı hücre hattı-yüzeye bağımlı), CRL-1740
 2. PC3 (insan prostat karsinomu kemik metastazı hücre hattı -yüzeye bağımlı) CRL-1435
 3. DU145 (insan prostat karsinomu beyin metastazı hücre hattı-yüzeye bağımlı)

3.3 Yöntemler

3.3.1 Hücrelerin Bakımı ve Pasajlanması

Hücrelerin besin gereksinimlerini karşılamak için ortam olarak % 5-10 FBS, % 1 L-glutamin, % 1 penisilin/streptomisin içeren DMEM F12 (DU145 ve PC3 için), RPMI1640 (LNCaP için) ve kullanılmıştır. Hücreler yetiştirilirken eğer tüm yüzeyi kaplayacak kadar çoğalmadıysa, yüzeye bağımlı hücrelerin ortamı pastör pipeti yardımıyla çekilmiş ve hücrelerin üzerine taze ortam eklenerek 2 günde bir ortam değiştirilmiştir. Hücreler, 100 x 20 mm'lik veya 75 cm²'lik flasklarda 37°C'de % 5 CO₂'li inkübatörde büyütülmüşlerdir. Hücreler tüm yüzeyi kaplayacak kadar çoğaldıklarında pasajlanmışlardır. Yüzeye bağımlı hücreler şu şekilde pasajlanmıştır;

- Steril cam pastör pipetleri kullanarak vakum yardımıyla ortam uzaklaştırılmıştır.
- Kültür yüzeyi tripsin muamelesinin etkisini arttırmak için Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen steril PBS ile bir kez yıkanmıştır.
- PBS uzaklaştırıldıktan sonra tüm yüzeyi kaplayacak kadar tripsin-EDTA solüsyonu ilave edildi ve 37°C'de % 5 CO₂'li inkübatörde 4-5 dakika hücreler yüzeyden kalkana kadar bekletilmiştir.
- Tripsini inaktive etmek için yeterli miktarda taze ortam hücreler üzerine ilave edilerek ve hücreler pipet yardımıyla homojenize edilmiştir.

Homojenize edilen hücreler yeni kültür kabındaki ortamın üzerine yavaşça ilave edilmiş ve büyümeleri için 37°C'de % 5 CO₂'li inkübatöre yerleştirilmiştir.

3.3.2 Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Hücreler uzun süreli kültüre edildiklerinde morfolojik, büyüme, fonksiyon ve karyotipik olarak değişime uğramaktadırlar. Tüm bu olumsuzlukların üstesinden hücrelerin dondurulmasıyla gelinebilir. Dondurulan hücreler daha uzun süreler boyunca özelliklerinde değişim olmadan saklanabilmektedir. Dondurulma sırasında dondurulmadan kaynaklı olumsuzluklardan hücreleri korumak için kriyoprotektan ajan olarak DMSO kullanılmıştır.

Hücreleri pasajlamak üzere tüm işlemler yapıldıktan sonra son aşamada

hücre kültür kabına aktarılmadan, hücreler üzerine % 5 DMSO eklenmiş ve her kriyotüpe yaklaşık 1 milyon hücre aktararak -86°C kaldırılarak yavaş yavaş soğuması sağlanmıştır. -86°C 'da bir gün bekletilen hücreler uzun süreli depolama için sıvı azot tankına alınmıştır.

Çözdürülecek olan hücreler -86°C 'deki derin dondurucudan çıkarılır çıkarılmaz 37°C su banyosunda çözülene kadar (yaklaşık 1-2 dk) bekletilmiştir. Ardından hücre kültür kabındaki 37°C 'ye ısıtılmış taze ortam üzerine dikkatlice ilave edilmiştir.

3.3.3 Hücre Sayımı

Hücre yoğunluğunu belirlemek üzere hücre sayımı yapılır. Hücreler pasajlanırken, yeni kültüre istenen miktarda hücre alabilmek amacıyla hemositometreyle sayılırlar.

- Sayım için hücre süspansiyonundan 10 μl alınıp tripan mavisiyle 100 μl 'ye tamamlanmıştır (10 kat dilüye edilmiş olundu).
- Karışım pipetle homojenize edilmiştir.
- Hemositometre üzerine bir lamel koyulmuş ve sayılacak hücre süspansiyonu bu ikisi arasına pipetle kenardan verilerek yayılmıştır.
- Hemositometre üzerinde yer alan 9 büyük kare içindeki hücre miktarı sayılmıştır.
- Hücre yoğunluğunu (hücre sayısı/ml) belirlemek için aşağıdaki formülden yararlanılmıştır:

3.3.4 Western Blot

Western blot proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayrılması temeline dayanır ve proteinlerde meydana gelen kantitatif değişimlerin ölçülmesi amaçlanır. Western blot birkaç basamaktan meydana gelir:

1. Hücrelerden protein lizati elde etme
2. SDS-PAGE
3. Membrana transfer
4. Bloklama ve antikor inkubasyonu

RWPE1, LNCaP ve DU145 hücre hatlarında ve karaciğer dokusunda endojen H₂S üretimini sağlayan CBS, CSE ve 3-MST enzimlerinin ekspresyonları araştırılmıştır.

3.3.5 Hücrelerden Protein Lizatı Elde Etme

Hücreler inkübatörden çıkarıldıktan sonra direkt buz üzerine alınmış ve kendi ortamları içinde kazıyıcı yardımıyla toplanmıştır. Hücreler 1000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj yapılarak çöktürülmüş ve supernatant uzaklaştırılmıştır. Aynı işlem PBS ile bir kere daha tekrarlanmıştır. Elde edilen hücre lizatının üzerine lizizi sağlamak amacıyla proteaz ve fosfataz inhibitörleri içeren (proteaz inhibitör karışımı, PMSF, fosfataz inhibitör karışımı, NaVO₃ ve NaF) RIPA tamponu eklenmiş ve buz üzerinde 45 dk bekletilmiştir. Ardından lizat sonike edilmiş ve 10 dk 12.000 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından süpernatant (ya da protein lizatı) başka bir tüpe alınmıştır.

Protein ölçümü BCA yöntemiyle yapılmış ve spektrofotometrede 562 nm'de ölçüm gerçekleştirildikten sonra absorbans değerleri kullanılarak standart eğriye göre protein miktarları µg /µl olarak belirlenmiştir.

3.3.6 SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi)

SDS aniyonik bir detarjan olup proteinleri (-) yükleyerek onların primer yapıya (linear) dönmesini sağlar, aynı zamanda da elektrik alanında proteinlerin (+) kutba doğru yürümesini sağlar. Poliakrilamid ise jel boyunca farklı

büyükliklerde porlar yaratarak proteinlerin boyutlarına göre ayrılmalarını sağlar. İşlem birkaç basamaktan oluşur:

1. Jel dökme aparatları hazır hale getirildikten sonra incelenmek istenilen proteinin büyüklüğüne göre bir ayırma jeli hazırlanmıştır (Jel solüsyonuna en son katılaşmayı sağlayacak olan TEMED ve %10'luk APS eklenir).
2. Ayırma jeli iki cam aparatın arasından dikkatli bir şekilde döküldükten sonra üzerine jelin düz bir yüzeye sahip olması için izopropanal dökülmüştür ve jel katılaşınca kadar bekletilmiştir.
3. Ayırma jeli donduktan sonra izopropanal uzaklaştırılmış ve depolama jeli dökülmüştür. Depolama jeline hava kabarcığı kalmayacak şekilde tarak yerleştirilmiş ve jel katılaşınca kadar bekletilmiştir.
4. Bu sırada jele yüklenecek örnekler hazırlanmıştır. Bunun için 30-50 µg protein lizatları kullanılmış ve proteinlerin üzerine %10 β-merkaptetanol içeren 4X'lik yükleme tamponu eklenmiştir. Ardından herbir örneğin üzerine eşit hacimde olmaları amacıyla ddH₂O eklenmiştir. Hazırlanan örneklerin 95-100°C'de 5 dk inkübe edilerek denatüre olması sağlanmıştır. İnkübasyondan sonra buz üzerine alınan örnekler kısa bir santrifüjden geçirilmiştir.
5. Jel tamamen donduktan sonra içinde yürütme tamponu bulunan yürütme aparatına yerleştirilmiştir. Tarak dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra örnekler ve moleküler ağırlık markeri (4 µl) yüklenmiştir.
6. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra jel 80 voltta yürütülmüştür.

Çizelge 3.1 . Ayırma jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları

Ayırma jeli (10 ml)	% 6	% 8	% 10	% 12	% 15
dH2O	5.4 ml	4.7 ml	4.1 ml	3.4 ml	2.4 ml
% 30 akrilamid karışımı	2.0	2.7	3.3	4	5
4X ayırma jeli tamponu	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

Çizelge 3.2. Depolama jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları

Depolama jeli	10 ml	5 ml	2.5 ml
dH2O (ml)	5.7	2.85	1.425
% 30 akrilamid karışımı (ml)	1.7	0.85	0.425
4x depolama jel tamponu (ml)	2.5	1.25	0.625
% 10 APS (ml)	0.1	0.05	0.025
TEMED (ml)	0.010	0.005	0.005

3.3.7 Membrana Transfer

Protein ayrımı tamamlandıktan sonra proteinler jelden membrana transfer edilir. Bu işlem laboratuvarımızda elektroforetik transfer aracılığıyla gerçekleştirilir. Transfer için öncelikle transfer tamponu hazırlanmış ve jel boyutundan büyük 2 adet whatman kağıdı, 1 adet jel boyutuna uygun PVDF (polivinlidin florid) membranı kesilmiştir. PVDF membran hidrofobik bir yapıya sahip olduğu için kullanılmadan önce bir alkol olan metanol ile ıslatılmıştır. Membran, jel ve pozitif elektrodun arasına yerleştirilmiştir. Membran ile jelin her iki yanına sırasıyla transfer tamponunda ıslatılmış olan whatman kağıtları ve süngerler yerleştirilmiştir. Aparat hazır hale getirildikten sonra transfer tankına yerleştirilmiş ve aparatın içerisine 1X transfer tamponu dökülmüştür. Aparatın kenarına soğutucu blok yerleştirildikten sonra 4°C'de 90 mA'de gece boyu transfer işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.3.8 Bloklama ve Antikor İnkübasyonu

Transfer işlemi tamamlanmış membran gözlemlenmek istenen proteine göre primer antikorla işaretlenir. Ayrıca jelde proteinlerin yürümesinde bir sorun olup olmadığını anlamak için jel 'Coomassie Brilliant Blue' ile yaklaşık 1-2 saat boyanmıştır. Daha sonra jel destaining solüsyona alınarak bantların görünebilmesi sağlanmıştır. Antikor işaretleme işlemlerin hepsi oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde yapılır. Bu işlem sırasıyla:

1. Membran nonspesifik antikorların bağlanmasını engellemek amacıyla % 5 süt tozu içeren TBS-T içinde 1 saat bloklanmıştır.
2. Membran TBS-T ile kısa bir süre yıkandıktan sonra uygun konsantrasyonda hazırlanan primer antikorla 1 saat oda sıcaklığında veya gece boyu 4°C'de inkübe edilmiştir. Primer antikor % 0.5'lik süt tozunun içinde hazırlanabileceği gibi BSA (bovin serum albumin) içinde de hazırlanabilir.
3. Primer antikor inkübasyonu bittikten sonra membran bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak amacıyla TBS-T ile bir defa 15 dk üç defa 5 dk olmak üzere 4 defa yıkanmıştır.
4. Membrana %0.5 süt tozu içeren TBS-T'de hazırlanan sekonder antikor ilave edilmiştir ve 1 saat inkübe edilmiştir. Sekonder antikorlar yabancı turpundan elde edilmiş olan bir peroksidaz enzimi ile ilişkilidir ve bu enzim hedef proteinin bulunduğu bölgede bir sinyal üreterek onların belirlenmesini sağlar.
5. Membran tekrar TBS-T ile bir defa 15 dk ve üç defa 5 dk süresince yıkanmıştır.
6. Yıkama işlemi bittikten sonra membran bir kemilüminesans substratı olan ECL (enhanced chemiluminescence) ile karanlık ortamda işleme sokulmuş ve 4 dk bekletilmiştir. ECL her membran için 1 ml olmak üzere 'Amersham Bioscience'dan sağlanan A ve B solüsyonlarından 1:1 oranında hazırlanmıştır.
7. Membran iki asetat kağıdı arasına yerleştirildikten sonra kesetin içine konulmuştur. Membran üzerine film konularak farklı sürelerde pozlama gerçekleştirilmiştir.
8. Kaset içerisinden alınan film önce 1:4 oranında seyreltilmiş 'developer solüsyonu'nda 1 dk daha sonra 'fikser solüsyonu'nda bir süre

karıştırılmıştır.

3.3.9 WST1 Deneyi

Hücre canlılığını gözlemlemek için yapılan deneylerde reaktif olarak elektron bağlayan, hafif kırmızı renkte, kullanıma hazır WST1 kullanılmıştır. LNCaP ve PC3 hücreleri 96 kuyucuklu plate'e her kuyucukta PC3 için 5.000 ve her LNCaP için 7.000 hücre olacak şekilde ayrılarak 37°C'de % 5 CO₂'li inkübatörde 24 saat süresi içerisinde tutunmaları beklenmiştir. Arka planda hücre ortamından oluşacak absorbansı belirleyebilmek için yalnızca hücre ortamlarının konulduğu kuyucuklar oluşturulmuştur. 24 saatin sonunda uygulamalar yapılmış ve uygulama süresinin bitiminde WST1 reaktifi her kuyucuğa 10 µl olacak şekilde eklenmiş ve 4 saat 37°C'de % 5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Fluoroskan Ascent spektrofotometresinde ölçümleri 450 ve 6500 nm dalga boyunda alınmıştır.

3.3.10 İmmunofloresan Mikroskopi

İmmunofloresans antikor-antijen etkileşimi temeline dayanır ve floresans-ışaretili antikorlar kullanılarak ilgilenilen proteinin lokasyonunu veya miktarının belirlenmesi amaçlanır. Aşamaları:

1. İçinde lamel bulunan (%70 etanol ile steril hale getirilmiş) kültür kaplarına hücreler pasajlanmıştır. Hücreler 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde üremeye bırakılmıştır.

2. Hücrelerin ortamı uzaklaştırılıp PBS ile bir defa yıkanmıştır.

3. Fiksasyonu sağlamak için hücreler % 100 metanollü ortama alınmış ve -20°C'de 30 dk bekletilmiştir. Eğer yağlarda işaretlenecekse %4 Paraformaldehit ile 1 saat +4 derece inkübasyon.

4. Fikse olan hücreler bir defa PBS'ten geçirilmiş ve % 0.2 Triton X-100 (yağlar işaretlenecekse %0.05 Triton X-100 kullanılır) içeren PBS'li ortamda alınmıştır. Hücrelerin bu ortamda oda sıcaklığında çalkalayıcının üstünde 5 dk inkübe edilerek permeabilize olması sağlanmıştır.

5. Hücreler 1 defa PBS'ten geçirilmiş ve bloklama solüsyonu olan % 1 BSA içeren PBS içerisine alınarak 5 dk oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakılmıştır.

6. BSA solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra % 1 BSA içeren PBS'de hazırlanan uygun konsantrasyonlarda primer antikolar 50 µl hacimde hücrelerin üzerine uygulanmıştır. Lamellerin üzeri parafilmle kapatıldıktan sonra 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.

7. Parafilmleler uzaklaştırılmış ve 4 defa PBS ile yıkama yapılmıştır.

8. Floresan boya ile konjuge sekonder antikor % 1 BSA içeren PBS içinde 1:500 oranında hazırlanmıştır ve her lamelin üzerine 50 µl hacimde uygulanmıştır. Lamellerin üzeri parafilmle kapatıldıktan sonra örnekler 37 °C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır.

9. Parafilmleler uzaklaştırılmış ve 4 defa PBS ile yıkama yapılmıştır.

Bu aşadan sonra Nile redd ile yağ boyamaları yapabilirsiniz. Her bir örneğe 5 µg /ml konsantrasyonda olan son hakim 50µl olacak şekilde PBS ile seyreltilmiş boya hücrelerin üzerine damlatılır ve parafilm ile kapatılır. Bu aşama 20 dakika ve oda sıcaklığında karanlıkta olması gerekir.

10. Hücreler dehidrasyonu sağlamak amacıyla - 20°C'de saklanan % 70 etanol ve % 100 etanol ile sırasıyla birer dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

11. Ardından lameller kültür kaplarından çıkarılmış ve dışarıda kurumaları için beklenmiştir.

12. Lamellerin üzerine DNA 'ya bağlanan bir boya olan DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole)'den 10 μ l ilave edilmiş ve lameller ters çevrilerek lamaların üzerine kapatılmıştır.

13. Hazırlanan örnekler floresans mikroskopuyla incelenmiştir.

3.3.11 Plazmit Transformasyonu ve İzolasyonu

Transformasyon ısı şoku aracılığıyla, *E.coli* kompetent bakterileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için;

1. -86°C'dan çıkarılan kompetent hücreler çözünmesi için buz üzerinde bir süre bekletilmiştir.

2. Çözünme tamamlandığında 1 ile 5 μ l arasında DNA (genelde 10 pg ile 100 ng arasında) kompetent hücrelerin üzerine eklenmiştir ve buz üzerinde kompetent hücre/DNA karışımı 20-30 dk kadar bekletilmiştir.

3. Ardından transformasyon tüpleri, ısı şoku sağlamak amacıyla 42°C'de yaklaşık 45 saniye bekletilmiştir.

4. Tüpler ardından tekrar buz üzerine alınarak 2 dk bekletilmiştir.

5. Tüplerin üzerine 250-500 μ l kadar zengin SOC ortamı eklenmiş ve bakteriler 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 1 saat üremeye bırakılmıştır.

6. Ek büyüme basamağından sonra transforme edilmiş bakterilerin bir kısmı (genelde 50 ile 200 μ l arasında) önceden oda sıcaklığına getirilmiş uygun antibiyotik içeren LB agar plate'e ekilmiştir.

7. Plate'ler 1 gece boyunca 37°C'ye üremeye bırakılmıştır.

8. Ertesi gün oluşan kolonilerden biri öze yardımıyla alınmış ve uygun antibiyotikli LB ortamına (yaklaşık 100 ml) aktarılmıştır.

9. Bakterilerin bu süspansiyon ortamında 37°C çalkalamalı inkübatörde (180-200 rpm) 1 gece üremesi sağlanmıştır.

10. Ertesi gün üreyen bakteriler santrifüj (4°C 600g 15 dk) ile çöktürüldükten sonra 'HiSpeed Plazmid Midi Kit' aracılığıyla plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca süspansiyon kültürde üreyen bakterilerden bir kısmı gliserol stok için alınmıştır. Bunun için LB ortama %30 oranında gliserol eklenmiş ve filtreden geçirilmiştir. Daha sonra aynı hacimde (1:1 oranında) LB ortamda bulunan bakteriler bu ortamın üzerine eklenmiş ve bakteri stokları -86°C'ye kaldırılmıştır.

11. Plazmitlerin miktarını belirlemek için nanodrop cihazı kullanılmıştır.

3.3.12 DNA Jel Elektroforezi

Linear ya da sirkular yapıdaki DNA'ların boyutlarını saptamak için DNA jel elektroforezi kullanılmaktadır. Eğer kullanılan örnek plazmit gibi sirkular yapıda bir nükleotid ise genellikle restriksiyon enzimleri kullanılmaktadır.

Plazmitlerin kesiminde ilgilenilen gen dizisi eldesi için genellikle iki kesim yaparak beklenen fragment elde edilir. Bunun için bir ependorf tüpüne sırasıyla ddH₂O, restriksiyon enzim tamponu, plazmit (1 µg), EcoRV (1 µl) ve HINDIII (1µl) konulduktan sonra 1 saat 37 °C'de inkübasyonu sağlanmıştır. İnkübasyon tamamlandıktan sonra jele yüklenecek DNA hazırlanmıştır. Bunun için 200 ng DNA ve 5 × yükleme boyası (bromofenol mavi) PCR tüplerine konularak hacim ddH₂O ile 10 µl'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan örnekler % 1'lik agarozda (5 × TAE içinde) 80 V'da yürütülmüşlerdir. DNA'nın görünür hale gelmesi için jel etidyum bromürde (TAE'nin içinde 1 µl) 10 dk çalkalamalı inkübatörde tutulmuş, ardından otoradyografi cihazı ile görüntüler alınmıştır.

3.3.13 Plazmit ve siRNA Transfeksiyonu

Plazmit transfeksiyonu için DNA/FuGene oranı 1:3 (1 µg DNA'ya 3 µl FuGene), DNA/Dharmafect ise 1:6 oranı olacak şekilde kullanılmıştır (siRNA için 200pmol uygulanır). Transfeksiyon için kullanılacak ortam ise transfeksiyon hacminin 100 µl'ye tamamlanması üzerinden hesaplanmıştır. Ya da Dharmafect ile yapılıyorsa ayrı tüplerde 100'er ul hacimlerde DNA ve reagentın oda sıcaklığına gelebilmesi için 5dk beklenir (tüpler 5 kere kibarca çek bırak yapılır).

5 dk sonrası DNA içeren solüsyonun içine reagent eklenip 15 dk daha oda sıcaklığında inkübe olur (5 kere çek bırak kibarca). 15 dk sonra hücrelerin üzerine yavaş bir şekilde direk damlatılır. Sonra hücreler hafifçe karıştırılıp 37°C %5 CO₂'li inkubatörlerde 24-48 saat arası inkübasyona bırakılmıştır.

Ayrıca transfeksiyon için kullanılan bir başka metotda da transfeksiyon için serumsuz ve antibiyotiksiz ortam kullanılmış ve hücrelerin büyümesi için serumlu ancak antibiyotiksiz ortam kullanılmıştır.

3.3.14 Makrofaj Farklılaşması ve Koşula Bağlı Ortamın Eldesi

37°C %5 CO₂ 'te, %10 FBS içeren RMPI 1640 ortamında U937 monosit hücre hattı kültürü yapılır. Makrofaj farklılaşması ve sitokin üretimine ulaşmak için, hücreler (8×10^5) işlemiden 2 saat önce 75 cm²'lik kültür flasklarına ekilmiştir. Daha sonra, tutunan yapıların (farklılaşan monositlerin) korunumu için son konsantrasyonu 16nM olacak şekilde PMA eklendi ve 16 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Hücreler 20 ml'lik taze ortam eklenmeden önce 2 kez yıkandı ve daha sonra 3 saat dinlendirildi. Ardından, sitokin sekresyonunu indüklemek için lipopolisakkarit (LPS) son konsanstrasyon 10ng/ml olacak şekilde eklenmiştir. Hücreler 24 saat daha inkübe edildi ve supernatant (Koşula bağlı ortam- CM) toplandı ve ileriki zamanlarda kullanım için filtrelendi (0.22 µm'lik filter kullanılarak). CM'in hücre içermediğinden emin olmak için seyreltilmiş CM, boş bir flask içinde (25cm²) bir hafta boyunca kültürlendi analiz edildi.

3.3.15 CM'de sitokinlerin ölçümü

Toplanan CM (hücresiz) ile LNCaP hücrelerini beslemeden önce TNF α (Invitrogen, ABD) seviyeleri üreticinin talimatlarına göre ELISA kullanılarak analiz edildi. Sitokin maruziyeti inflamatuvar mikroçevrenin önemli bir bileşenidir, (0,2,4,6,12 ve 24 saatlerde) zaman ve dozlara (62.5, 125, 250 veya 500pg/ml TNF α içeren koşula bağlı ortamlar) bağlı olarak daha önceki çalışmalarımızda bu parametrelere bağlı olarak optimizasyon yapılmıştır. TNF α , CM'i LNCaP hücrelerine uygulamadan önce CM'i normal ortam ile seyrelterek LNCaP hücrelerine uygulanmıştır. Sonuç olarak makrofaj tarafından salınan sitokinlerin konsantrasyonları ayarlandı ve pikogram düzeylerinde tutuldu. Çalışmalarımızda, TNF- α 'nın efektif konsantrasyonunun rekombinant TNF α konsantrasyonundan 400 kat daha az olduğu diğer çalışmalarda belirtilmiştir.

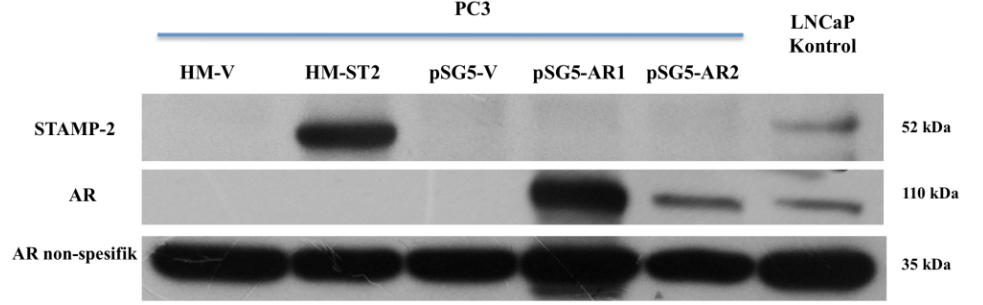
4. BULGULAR

4.1 Ektopik STAMP2 Ekspresyonu ve Vektörlerin Doğrulanması

HisMax (HM) vektörlere klonlanan STAMP2 cDNA dizisi laboratuvarımızda daha önceki çalışmalarda elde edilmiştir. Bu vektörler kompotent bakteri olan *E.coli'nin DH5- α suşuna* transforme edilerek çoğaltıldıktan sonra, HiSpeed plazmit midi izolasyon kiti aracılığıyla plazmit izolasyonları yapılmıştır. Elde edilen vektörler jel elektroforezi ve hücre hatlarına transfeksiyon ile doğrulanmıştır.

Dizi analizi yapılmış ve haritalanmış olan HM-STAMP2-(1) vektörü içerisinde ilgilenilen gen bölgesini belirleyebilmek amacıyla restriksiyon enzimleriyle kesilip DNA jel elektroforezinde yürütülmüştür. İlgilenilen bölgeyi kesebilmek için vektör haritasından '*EcoRV*' ve '*HINDIII*' restriksiyon enzimleri belirlenmiştir. Bu enzimler ile kesilen diğer örnekler ise 3000 baz çiftik LacZ bölgesi içeren HM boş vektörü ve farklı tip HM vektöre klonlanmış STAMP2 cDNA dizisi içeren bir vektör. Plazmitler, belirtilen restriksiyon enzimleri ile 37°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra %1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve transillüminatör cihazı aracılığıyla görüntüler elde edilmiştir.

sonra yapılacak ektopik ekspresyon çalışmalarında HM-STAMP2-(1) ile devam edilmiştir.



Şekil 4.3. PC3 hücre hattında HM-STAMP2 ve pSG5-AR transfeksiyonu sonrası western blot analizi ile ektopik ekspresyonlarının saptanması. LNCaP hücrelerinde belirtilen genlerin bazal ekspresyon seviyeleri görülmektedir.

STAMP2 ve AR ekspresyonu olmayan PC3 hücre hattına HM-STAMP2 transfeksiyonu yapılmıştır. Transfeksiyon işlemi Dharmafect II ajanı ile gerçekleştirilmiştir. Bunun yanı sıra kontrol olarak her iki geninde bazal seviyede ekspresyonunu yapan LNCaP hücre hattı western blot analizinde kullanılmıştır. Analiz sonucunda PC3 hücre hattına tranfekte edilen HM-STAMP2 ve pSG5-AR1 vektörlerinin LNCaP bantlarına göre aşırı ifadesi görülmüştür. Doğrulan vektörler ile çalışmalara devam edilmiştir.

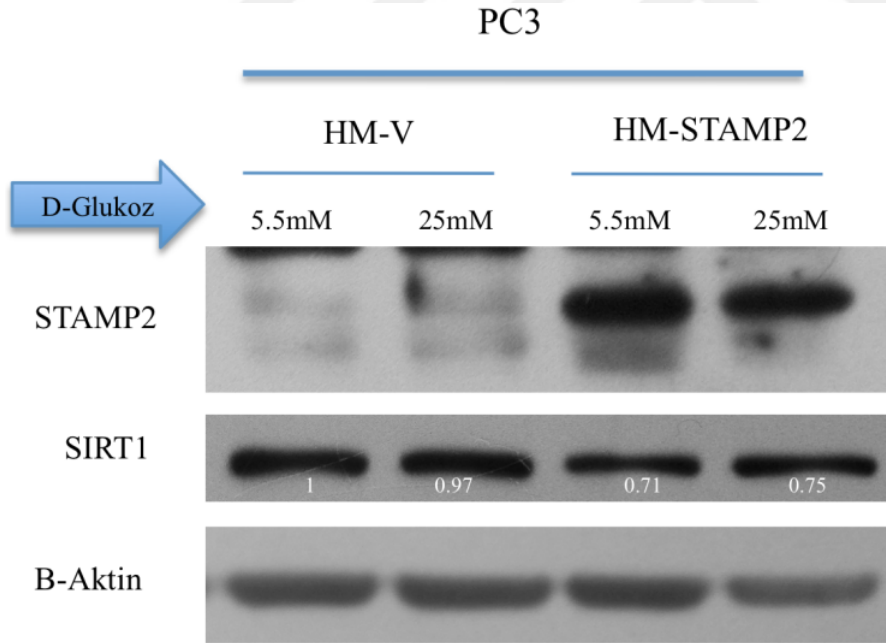
4.2 Ektopik STAMP2 Ekspresyonu ve Glukoz Uygulaması

Prostat kaynaklı kemik metastaz hücresi olan PC3 hücreleri 25 saatlik ikilenme süreleriyle enerji ihtiyacı yüksek olan bir hücredir. Bu hücre hattında hücre çoğalması ve kolonizasyonunda etkin rol oynayan metabolik protein olan STAMP2 varlığında, SIRT1 gibi önemli bir metabolik regülatörle etkileşiminin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu yüzden STAMP2 ekspresyonu olmayan PC3 hücrelerine HM-STAMP2 transfeksiyonu yapılmıştır. SIRT1 ekspresyonunu ve stabilizasyonunu ise farklı konsantrasyonlarda glukoz uygulayarak metabolik hızın artması veya azalmasıyla sağlanmıştır. Farklı glukoz konsantrasyonlarına bağlı olarak oluşacak metabolik yanıtın etkisini arttırmak için 6 saatlik starvasyon yapılmıştır (Şekil 4.3). Transfeksiyon sonrası uygulanan glukozsuz DMEM-F/12 ortam hücrenin tüm glukoz depolarını kullanmasına yol açar ve böylelikle sonraki

basamak için etkili bir yanıt sağlanır (Pang et al., 2009). Düşük (5.5mM) glukoz konsantrasyonu, sitoplazmada glikolizis basamaklarında kullanılan NAD^+ 'in sitoplazmik havuzda birikmesine yol açar ve SIRT1 kofaktörü olarak rol oynar. Yüksek (25mM) glukoz konsantrasyonu ise glikolizisin artmasına neden olur. Kansere hücrelerinde enerji ihtiyacının büyük çoğunluğu glikolizisle karşılanır ve glukozun metabolize edildiği bu süreçte NAD^+ kullanılır. SIRT1 regülasyonu ise kofaktörünün azalmasıyla doğru orantılı bir şekilde azalır. Tüm bu bağlantılar düşünülerek Şekil 4.3'te bulunan protokol oluşturulmuştur.

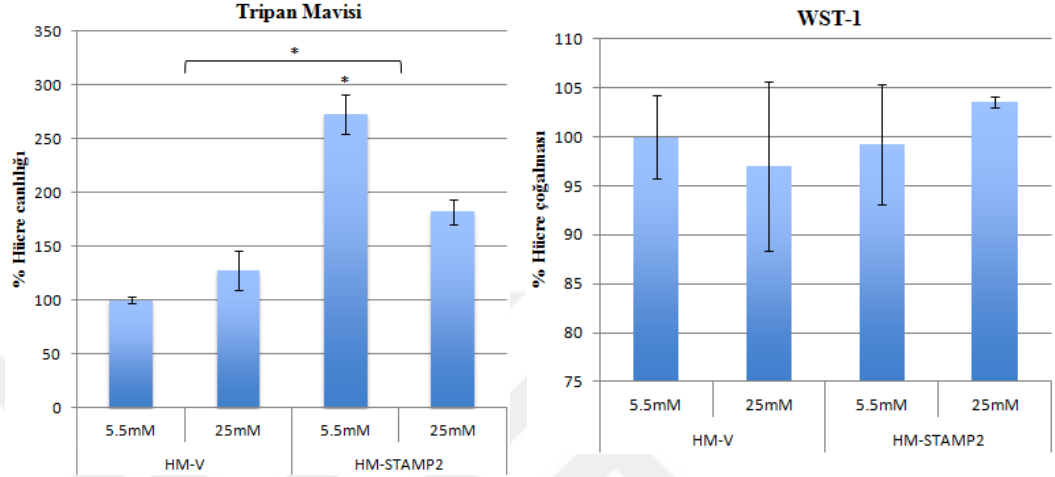


Şekil 4.4. LNCaP ve PC3 hücre hatlarında, STAMP2 ektopik ekspresyonu ya da susturma deneylerinde glukoz üzerinden uyguladığım genel protokol.



Şekil 4.5. Ektopik STAMP2 ekspresyonu sonucu SIRT1 bantlarında azalma gözlenmiştir. SIRT1 bant yoğunluklarının densitometrik analizi ImageJ programı kullanılarak yapılmıştır.

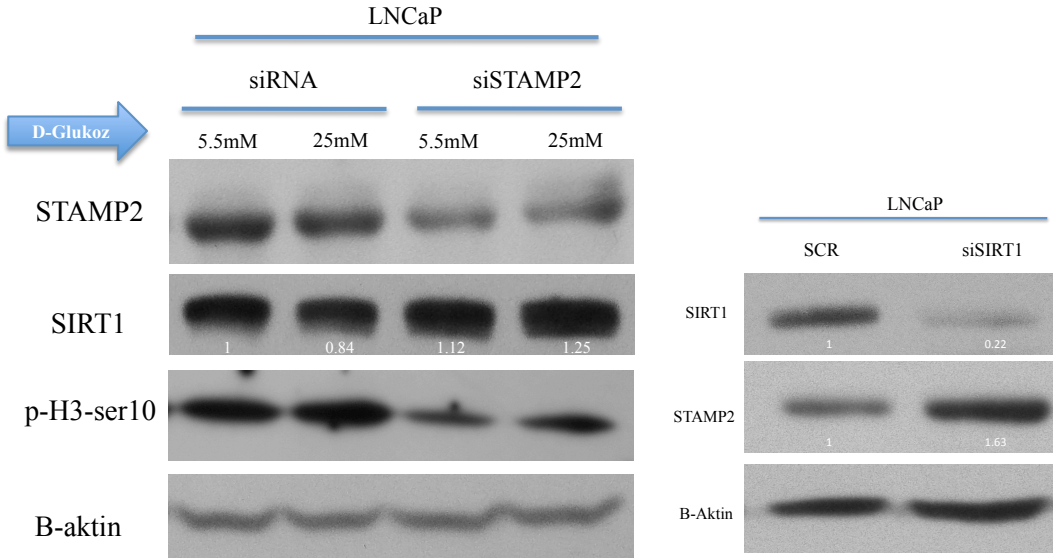
Elde edilen Western blot analizleri sonucunda, düşük glukoz ve yüksek glukoz aracılıklı SIRT1 ekspresyonunun regülasyonu STAMP2 varlığında gözle görülür bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.5). Yapılan hücre canlılığı ve çoğalması ile ilgili deneylerde çoğalma etkisine kıyasla canlılığın STAMP2 varlığında daha fazla oranda arttığı görülmüştür.



Şekil 4.6. STAMP2 aşırı ekspresyon durumunda ve farklı glukoz konsantrasyonlarında hücre canlılığı ve çoğalması oranları gösterilmiştir. (* $p < 0.05$)

4.3 STAMP2-SIRT1 Susturulması ve Glukoz Uygulaması

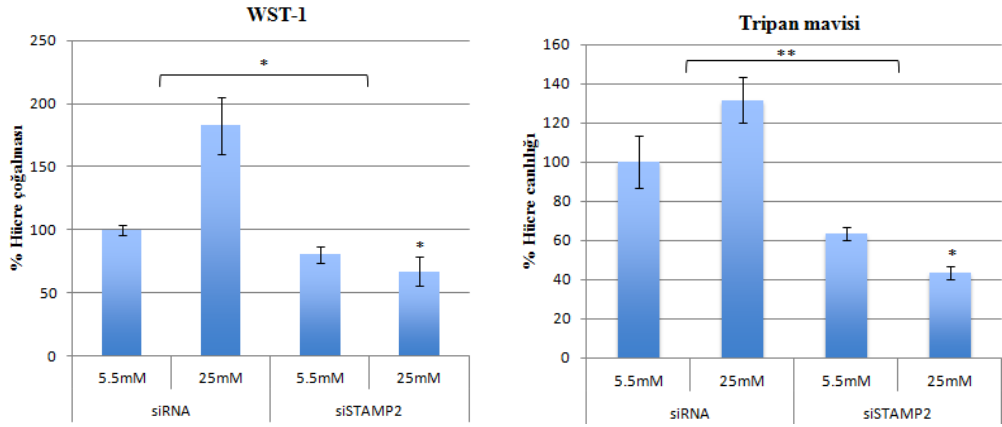
STAMP2 susturulması deneyi kurgusu, aynı glukoz uygulaması deney protokolüne bağlı olarak ilerlemiştir (Şekil 4.4). 35 saatlik ikilenme süresi olan LNCaP hücrelerinde STAMP2'nin bazal seviyede ekspresyonu bulunmaktadır. Bu deney setinde PC3 hücrelerine nazaran daha az agresif karakterli LNCaP hücrelerinde STAMP2 yokluğu durumunda fosfo-Histon3-serin10 (p-H3-ser10) ve SIRT1'in regülasyonunun değişikliği araştırılmıştır. Bu etkileşim sonucunda hücre canlılığı ve çoğalması üzerine Tripın mavisi hücre sayımı ve WST-1 deneyleri yapılmıştır.



Şekil 4.7. STAMP2 susturulması sonucu p-Histon3-serin10 bantlarında büyük oranda azalma görülmüştür. SIRT1 bantlarında ise artış gözlenmiştir. siSIRT1 LNCaP örneğinde ise STAMP2 bandında artış görülmektedir. SIRT1 bant yoğunluklarının densitometrik analizi ImageJ programı kullanılarak yapılmıştır.

STAMP2 yokluğunda, önemli bir mitotik aktivite markörü olan p-H3-ser10 ekspresyonu azalmıştır (Şekil 4.7). Bu azalan regülasyona paralel olarak hücre çoğalması ve canlılığında da büyük oranda düşüşler görülmüştür (Şekil 4.8). Bununla bağlantılı olarak histon deasetilaz olan ve metabolik aktiviteyi yavaşlatan SIRT1 bantlarında ise artma görülmüştür.

Gösterilen veriler STAMP2 yokluğunun hücre çoğalması, canlılığının metabolik süreç üzerinden etkisini hem bu süreçte yer alan proteinlerin seviyesinde hemde doğrudan yapılan canlılık, çoğalma testleriyle göstermiştir. LNCaP hücrelerinde yapılan SIRT1 susturma deneylerinde ise yine aynı antagonistik ilişki görülmektedir.

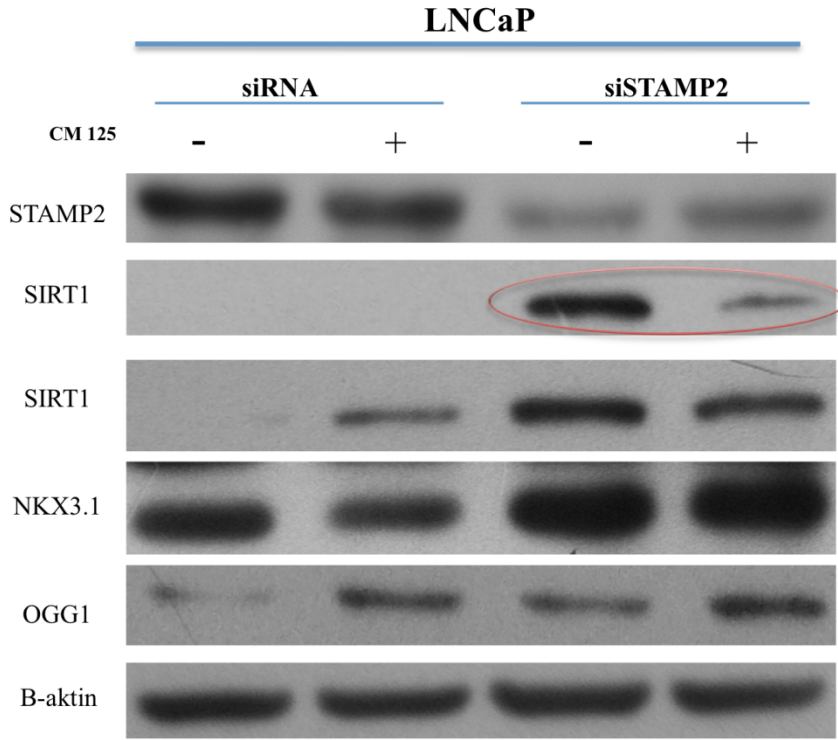


Şekil 4.8. STAMP2 yokluğu ve farklı glukoz konsantrasyonlarının hücre canlılığı ve çoğalmasına etkisi gösterilmiştir. Canlılık Tripan mavisi hücre sayımı ile ve çoğalması WST-1 ile yapılmıştır. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

4.4 İnflamasyon Varlığında STAMP2 Susturulması

İnflamasyon ortamında bulunan bazı sitokin ve adipokinler STAMP2 regülasyonunu değiştirmektedir (Wellen et al., 2007). Bu deneyde prostatik inflamasyon durumunda STAMP2 susturulması sonucu SIRT1 regülasyonuna ve bu koşula bağlı olarak önemli bir tümör baskılayıcı gen olan NKX3.1 ve DNA hasar tamirinde yer alan OGG1 proteinlerinin seviyelerine bakılmıştır. STAMP2 yokluğunda SIRT1 bandında ciddi oranda artış görülmüştür.

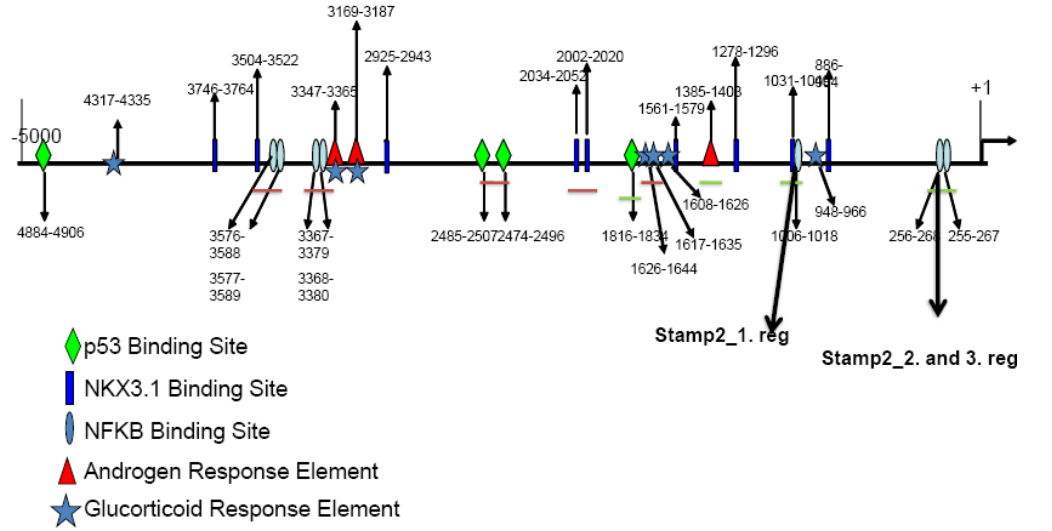
Tümör baskılayıcı özelliği ile birlikte DNA hasar yanıtında da yer alan NKX3.1, daha önceki çalışmalarda inflamasyon durumunda proteozomal degradasyona gittiği görülmüştür (Debelec-Butuner et al., 2015; et al., 2014). STAMP2 susmuş olan hücrelerde NKX3.1 yanıtında artan bir regülasyon görülmektedir. STAMP2 susmuş örneklerde kontrol grubuna göre OGG1 bantlarının yoğunluğunda artış görülmektedir.



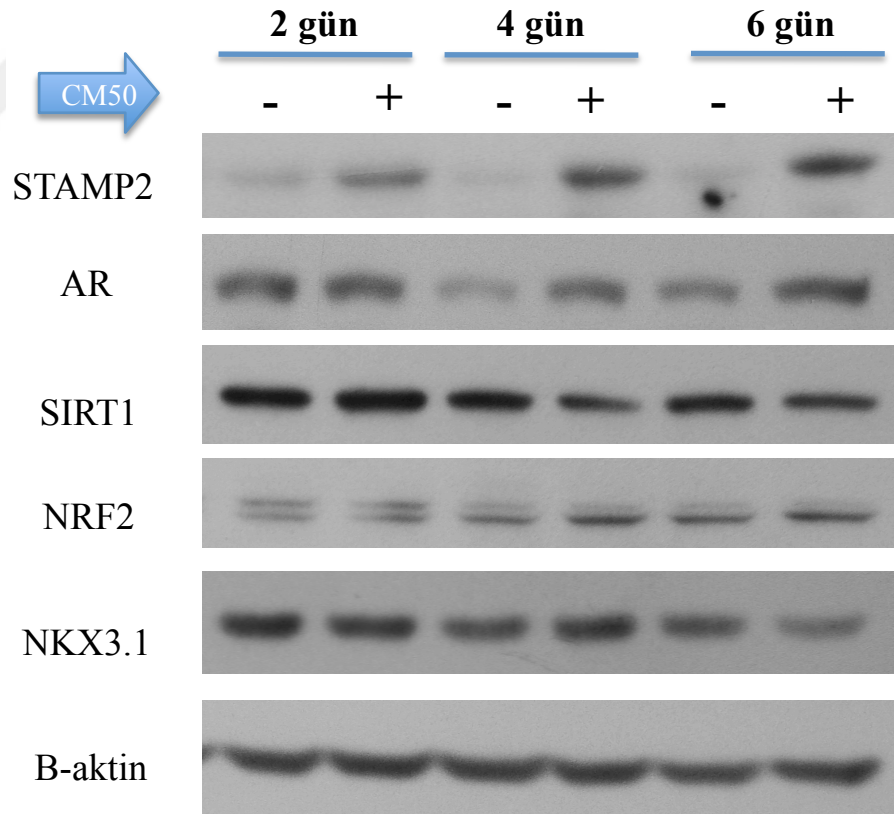
Şekil 4.9. İnflamasyon durumunda STAMP2 susuturulması sonucunda SIRT1, NKX3.1 ve OGG1 protein seviyelerinin değişimi.

4.5 Kronik İnflamasyon Durumunda STAMP2 Regülasyonu

STAMP2 geni, TNF-induced adipose-related protein (TIARP) veya six-transmembrane epithelial antigen of prostate 4 (STEAP4) olarakta bilinmektedir (Ohgami et al., 2006; Moldes, 2001). Tez çalışmamda bulunan diğer deney setlerindeki STAMP2'nin aşırı ifade durumu plazmit transfeksiyonu ile sağlanmıştır. Bu deney uygulamasında kronik prostatik inflamasyon koşullarında STAMP2'nin diğer genlerle regülasyonu ve hücre çoğalmasındaki etkisi üzerine amaçlanmıştır. WB yöntemiyle adı geçen proteinlerle regülasyonu belirlenmiştir ve hücre çoğalmasına pozitif yönde etkisi WST-1 ve Tripan mavisi deneyleriyle gösterilmiştir.

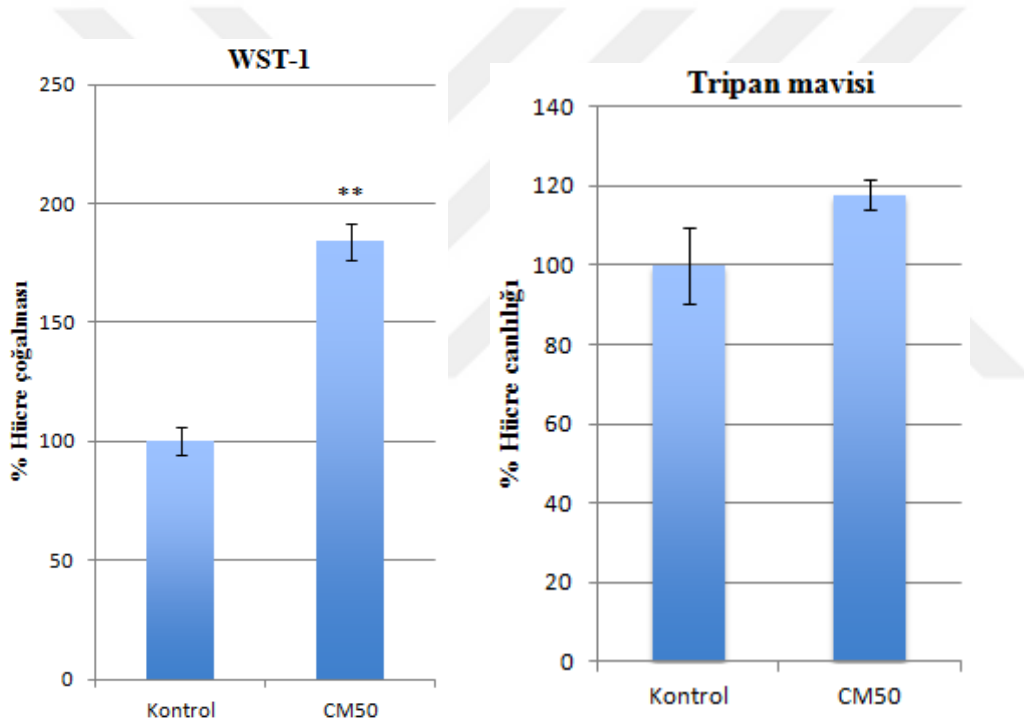


Şekil 4.10. In silico yöntemler ile hazırlanan STAMP2 ilk ekzonunun önündeki 5000 bç'lik promotor bölgesinin transkripsiyonel bağlanma noktaları verilmiştir. (Daha önceki çalışmalarda Prof. Dr Kemal Sami Korkmaz tarafından bulunan ve yayınlanmamış bir veridir.)



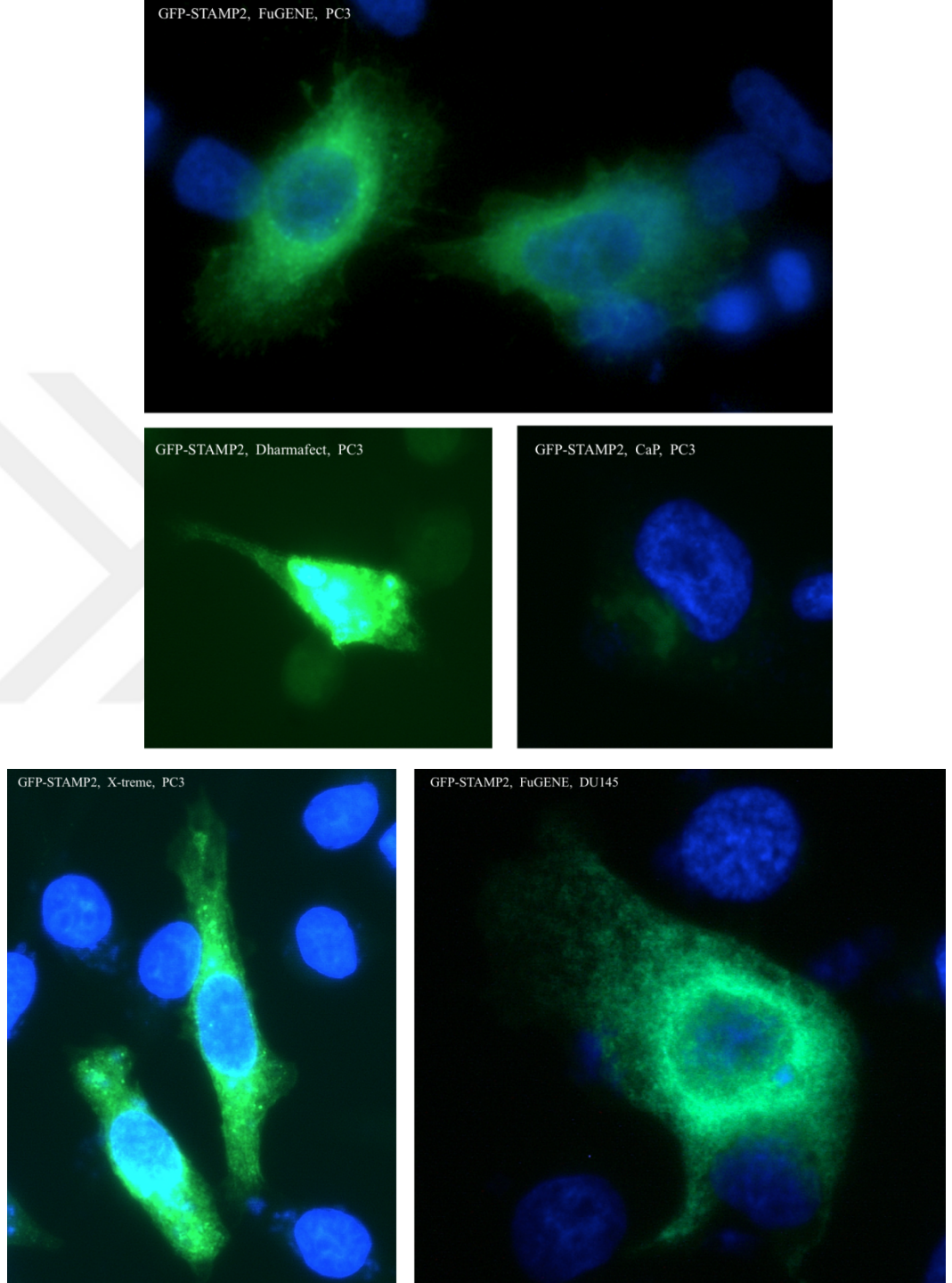
Şekil 4.11. LNCaP hücrelerinde 6 günlük bir kronik inflamasyon modeli oluşturulmuş ve zamana bağlı bantlardaki değişim gösterilmiştir.

CM50 ile yapılan denemeler sonucunda zamana bağılı olarak STAMP2 ekspresyonunda artış görülmüştür. Özellikle 4. ve 6. günlerde STAMP2'nin kademeli artışına SIRT1 bantlarında azalmalar görülmektedir. Bununla birlikte hücre çoğalmasında ve büyümesinde etkin rol oynayan AR de STAMP2 artışıyla paralel bir şekilde arttığı görülmüştür. İnflamasyon varlığında tümör baskılayıcı bir gen olan NKX3.1 protein stabilizasyonunda ise azalma görülmüştür. Antioksidant yanıtta yer alan NRF2 proteininde ise CM50'li örneklerde artış görülmektedir.



Şekil 4.12. LNCaP hücrelerinde 48 saatlik CM50 uygulaması sonrası hücrelerde çoğalma ve canlılık oranları çok yüksek artış göstermektedir. (** p < 0.01)

4.6 STAMP2 Hücre Lokalizasyonu



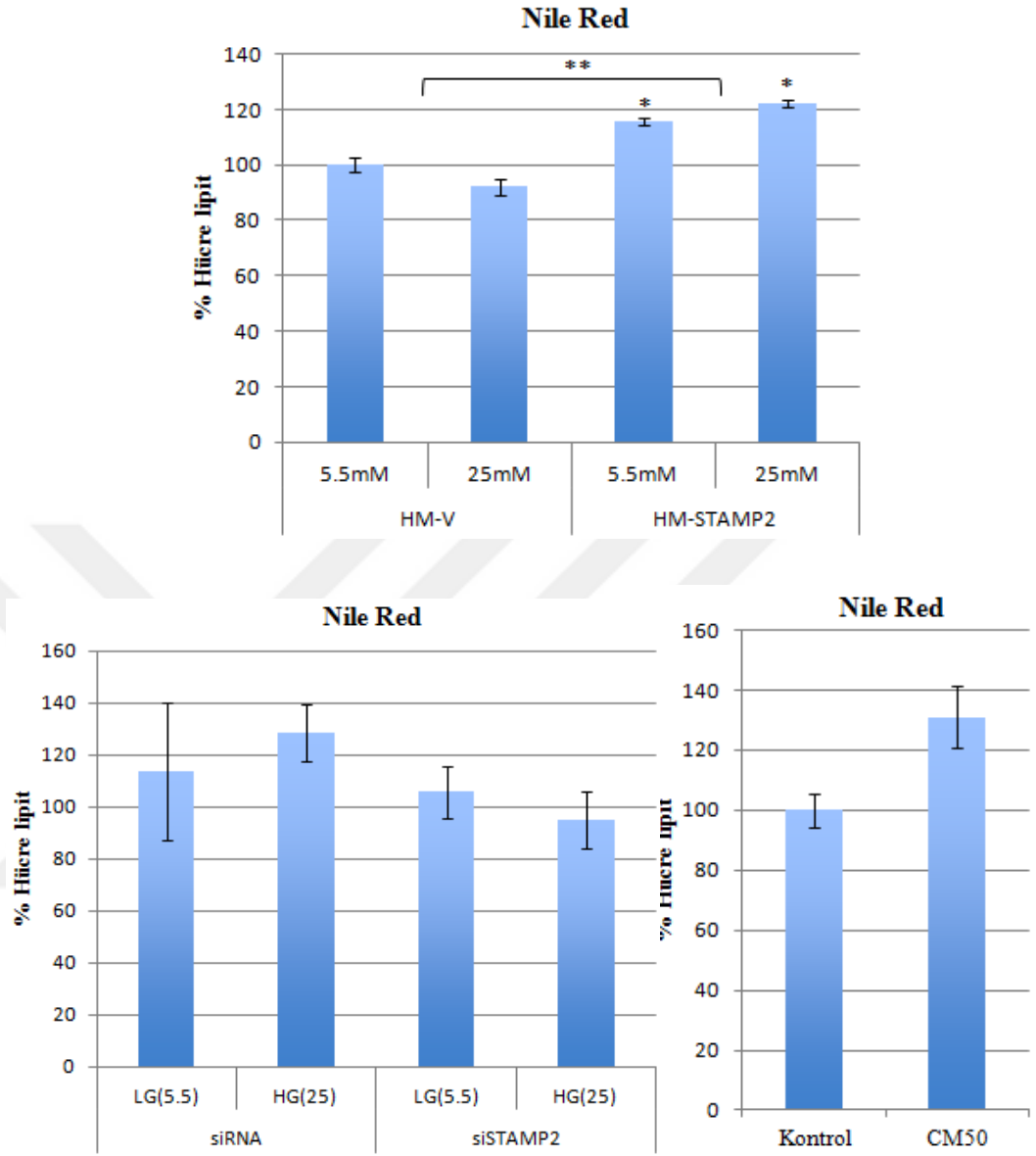
Şekil 4.13. Farklı hücre hatlarında farklı transfeksiyon ajanlarıyla yapılmış yeşil floresan proteinle birleşik STAMP2 proteini lokalizasyonu.

STAMP2 proteini endoplazmis retikulum, cis-trans golgi, endozomlar ve mebran arasındaki trafikte görülmektedir. Bu trafikte yer alması ve golgi gibi protein paketlenmesi gibi önemli süreçte yer alan organelde konumlanması, regülasyonun hücre metabolizması açısından önemini göstermektedir. Yeşil floresan proteini içeren vektörlerin içine STAMP2 cDNA dizisi klonlanmıştır. STAMP2 ve yeşil floresan proteini dizileri arka arkaya getirilerek transkripsiyon ve translasyon sonucu oluşacak STAMP2 proteini yeşil fluoeresan ışımaya yapacaktır. Translasyon sonrası yapısal doğası gereği motiflerine özel olarak hücrede lokalize olacaktır.

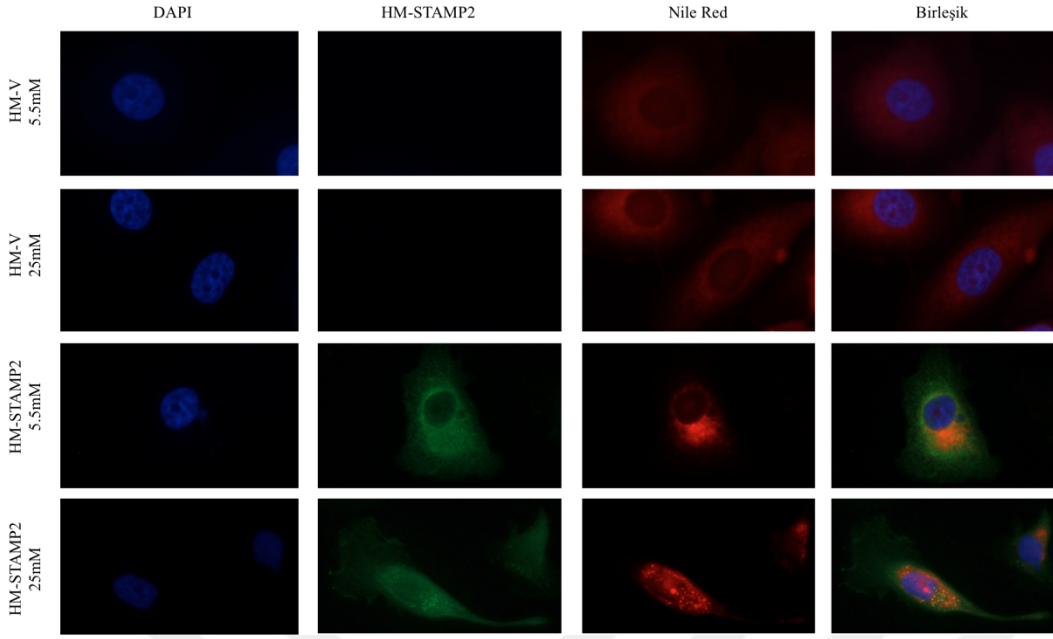
4.7 STAMP2 Ekspresyonu Artışı ve Lipit Oranındaki Artış

Normal hücrelerde STAMP2 ekspresyon seviyeleri en çok adiposit hücrelerinde görülmüştür. Bazı *in vitro* ve *in vivo* modellerde STAMP2'nin metabolik denge için önemli olduğu vurgulayan çalışmalar yapılmıştır (Wellen et al., 2007). Farklı glukoz uygulaması, CM50 uygulaması ve STAMP2 transfekte aynı deney setlerinde lipid yapıları ve yağ damlacıklarını floresan ışımaya yapan Nile Red boyası ile işaretlenmiştir.

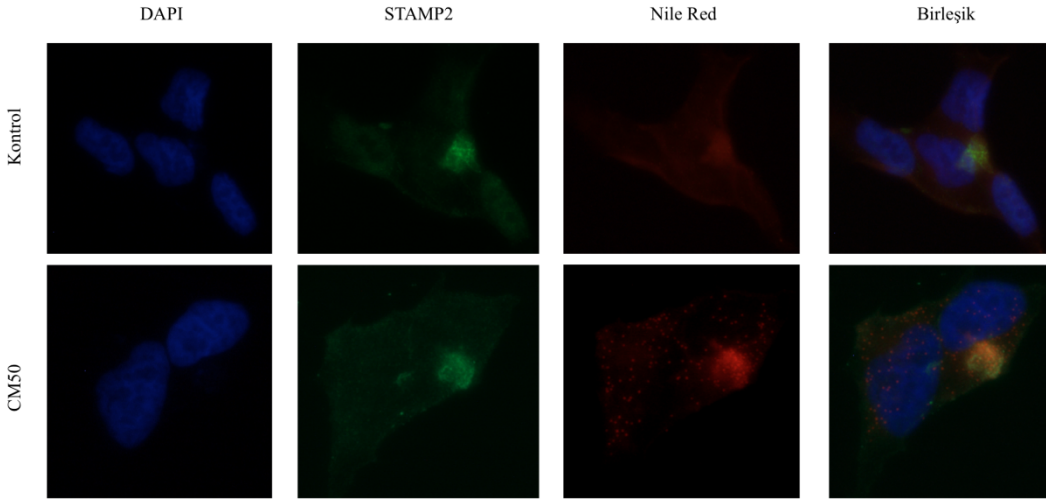
Florometrik (thermo variaskan) ölçümler sonucunda elde edilen verilerde lipit miktarı STAMP2 ekspresyonu ile paralel sonuçlar vermiştir. Nile Red ile işaretli örnekler immünofloresan mikroskopta incelendiğinde florometrik sonuçla örtüştüğü ve STAMP2 ifadesinin arttığı durumlarda lipit birikimleri görülmektedir. Bu da STAMP2'nin PCa hücresel metabolizmasında önemli rolü olduğunu gösterir.



Şekil 4.14. PC3 hücre hattında STAMP2 ektopik ekspresyonu ve glukoz uygulaması yapılan ve 48 saatlik CM50 uygulanmış LNCaP hücre hatları üzerinde Nile Red floresan boyasıyla işaretlenmiş ve florometrik yöntemle ölçüm yapılmıştır (ex: 530, em: 636). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)



Şekil 4.15. STAMP2 ektopik ekspresyonu ve glukoz uygulaması yapılan PC3 hücre hattının immüno Floresan mikroskoptaki görüntüsü. STAMP2 Alexaflour 488nm (yeşil), Nile Red 530nm (turuncu) ve DNA DAPI 364nm (mavi).



Şekil 4.16. LNCaP hücre hattında 48 saatlik CM50 uygulaması sonrası immüno Floresan mikroskoptaki görüntüsü. STAMP2 Alexaflour 488 (yeşil), Nile Red 530 (turuncu) ve DNA'da (mavi) ile işaretlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Prostat kanseri gelişimi ve tedavi sürecinde androjen regülasyonu önemli bir role sahip olmasına rağmen hala tam olarak anlaşılammıştır. Bu nedenle prostat kanseri tedavilerindeki en büyük sorunun bu olduğu herkes tarafından kabul edilmektedir. Bu durum karşısında AR sinyal mekanizması ve onun etkilediği genler iyi anlaşılması gerekmektedir. Bu süreçte androjene bağlı olarak mRNA seviyesinde artışı olan STAMP2 geni keşfedilmiştir. Bu gen PCa dokularında normal prostat büyümesi olan dokulara göre daha fazla ifadesi görülmüştür (Korkmaz et al., 2005). Aynı zamanda PCa hücrelerine ektopik ekspresyonunda kolonizasyon ve proliferasyonda artış gözlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda STAMP2 PCa için önemli bir biomarker olarak kabul edilmiştir. Çalışmamızda STAMP2'nin PCa gelişimindeki mekanizmasının daha iyi anlaşılması amaçlanmıştır. Önemli bir histon deasetilaz olan ve çeşitli metabolik stress durumlarına yanıt veren SIRT1 ile ilişkisi ilk kez bu çalışmada gözlemlenmiştir. Prostatik inflamasyon ortamında ilk STAMP2 regülasyonu gözlemlenmiş ve hücre çoğalmasına etkisi WST-1 ve Tripan mavisi deneyleriyle doğrulanmıştır.

Bu çalışmada, PC3 hücre hattına HM-STAMP2 plazmiti transfeksiyonu yapıldı. Plazmit kontrolü, bilinen noktalardan restriksiyon enzimleriyle kesimleri yapıldı ve jel elektroforeziyle beklenen fragmentler saptandı. WB yöntemiyle aşırı ifade edilen protein beklenen bölgede görüldü. Daha önceki çalışmalarda STAMP2 aşırı ifadesi PCa hücrelerinin koloni formasyonunda ve çoğalmasındaki artış, yapılan Tripan mavisi deneyiyle doğrulandı (Korkmaz et al., 2005; Jin et al., 2015). Fakat WST-1 ile anlamsız bir grafiğe ulaşıldı. Düşük-yüksek glukoz ortamlar kullanılarak, hücrenin en etkin NAD^+ kaynağı olan glikolizise etki edilmeye çalışılmıştır. Böylelikle SIRT1 aktivitesi direk kofaktörü üzerinden kontrol edilebilmesi planlanmıştır. SIRT1 aktivitesinin artmasıyla histon-deasetilasyonu ve kromozomal kondensasyonun değişimiyle hücre bölünmesi engellenir (Nogueiras et al., 2012). Fakat sürpriz olarak STAMP2 ektopik ekspresyonlu, düşük glukozlu örnek en yüksek canlılık seviyesi gösteriyordu. Nile

Red ile yağ moleküllerinin incelenmesi sonucu daha önceki çalışmalarda beklenildiği gibi STAMP2 transfekte örneklerde lipit birikimi oranı fazlaydı (Lindstad et al., 2017). Bu da STAMP2 regülasyonunun PCa hücrel metabolizamasında önemli rolünü göstermektedir.

PCa lenf nodu metastazı olan LNCaP hücrelerinde ulaşılan sonuç ise daha önce bulunan verilerle paralel olarak bizim çalışmamızda da susturulmuş STAMP2 hücrelerinin çoğalmasında ciddi düşüşler görülmüştür (Jin et al., 2015). Fakat Jin ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada STAMP2 demir alımını ve NADP oluşumunu arttırarak hücrede ROS oluşumu, bununla bağlantılı olarak hücre çoğalmasına etki eden ATF4 proteiniyle etkileşimi gözlenmiştir. Bu çalışmada gözlenen, STAMP2 susturulmasıyla mitotik aktivite markörü olan p-H3-ser10 regülasyonunda düşüş görülmüştür. Hücre çoğalması durumu WST-1 ve Tripan mavisi deneyleriyle paralellik göstermiştir. Önemli bir histon deasetilaz olan SIRT1'in regülasyonun artması bu değişen p-H3-ser10 regülasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Nowak and Corces, 2004; Prigent and Dimitrov, 2003). siSTAMP2 ve siSIRT1 örneklerinin bantları incelendiğinde aralarında antagonist bir regülasyon farkedilmektedir. Bu durum hücrel proliferasyona hem sinyal yolları hemde elde edilen canlılık analizleriyle doğruluk göstermektedir.

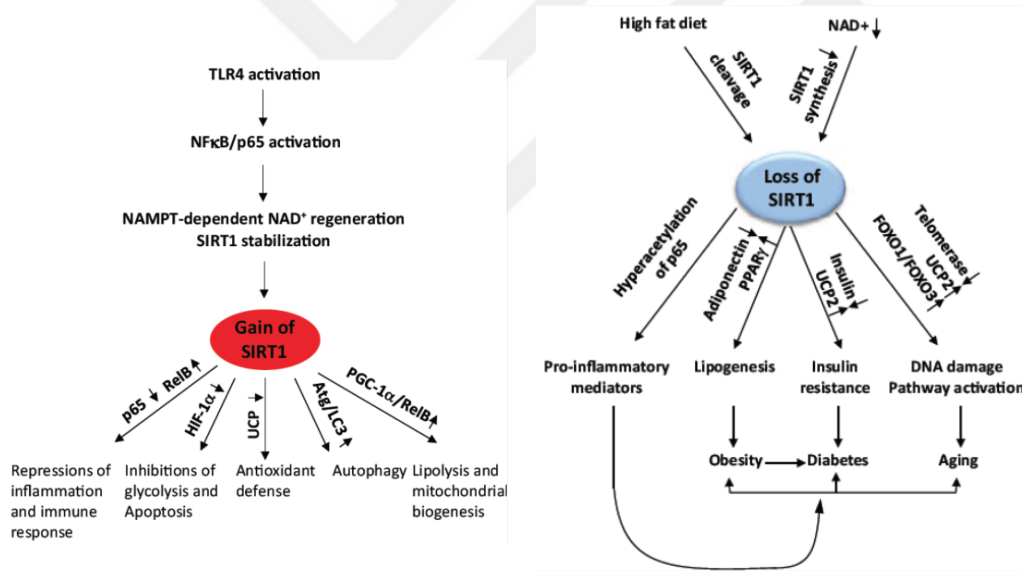
TNF- α varlığında STAMP2'nin artan regülasyonu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Ohgami et al., 2006). Bunun üzerine LNCaP hücrelerine prostatik inflamasyon koşulu yaratılarak STAMP2'nin PCa inflamatuvar mikro çevresindeki regülasyonu gözlenmiştir. siSTAMP2 ve CM125 ile yapılan deneyde STAMP2 susturulmuş örneklerde SIRT1 bantlarının önemli miktarda artışı gözlenmiştir. Bununla birlikte NKX3.1 ve OGG1 protein bantlarında da artış gözlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda SIRT1'in asetil-P53 'ü deasetile ederek P53'ü degradasyona sürüklediği ve apoptoza gidecek olan kanser hücresinin apoptozdan kaçmasını sağladığı ortaya konmuştu. SIRT1 fonksiyonelliğinin arttığı durumlarda DNA hasar onarımı mekanizmalarını aktif hale getirdiği bilinmektedir (Deng, 2009). Bu durum kanserli hücre için mükemmel bir sağkalım koşulu oluşturmaktadır. Metastatik oluşumların dokular arası az besin ve oksijence zayıf bölgelerden geçişlerinde hücrenin yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmesini sağlayan bir mekanizmadır (Byles et al., 2012). Kanserli hücrenin metabolik stressle karşılaştığı durumlarda oluşan bu kaotik

durumda; glikoz besin alımı olmaması, glikolizis yolağının aktif olmaması ve yolaktaki enzimlerce kullanılan NAD^+ moleküllerinin hücre havuzunda artışıyla açlık durumu, metabolik stress durumu oluşur (Lim et al. 2010). SIRT1 kofaktörü olan NAD^+ ile fonksiyonellik kazanır ve PCa hücrelerinde sitoplazma-nukleus lokalizasyonundaki tüm proteinlerin Lysin amino asitinden deasetilasyon gerçekleştirir. Bu da histonların deasetillenmesiyle kondense oluşu mitotik aktivite ve transkripsiyonel aktivasyonun düşüşü gibi hücre metabolizmasını yavaşlatan bir sürece sokar (Martinez-Pastor and Mostoslavsky, 2012; Grummt and Ladurner, 2008; Kaelin and McKnight, 2013).

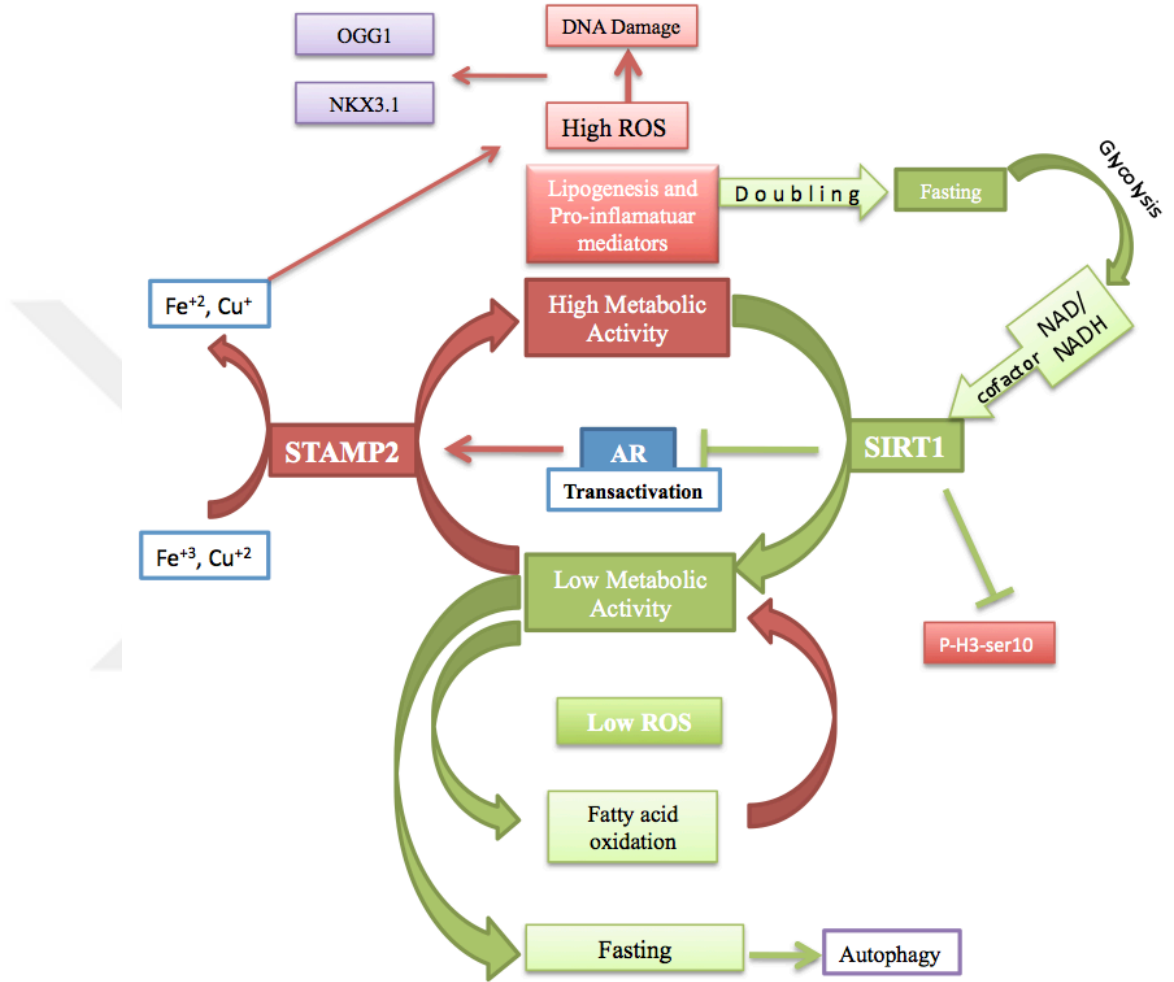
Kronik inflamasyon durumunda, CM50 uygulanan LNCaP hücrelerinde STAMP2 regülasyonu belirgin bir şekilde arttığı görülmektedir. Aynı örneklerde STAMP2 bantlarıyla paralel olarak AR'ın artışı ve SIRT1'in azalışı görülmektedir. Bu hücrelerle yapılan WST-1 ve Tripan mavisi deneyleri sonucu bize daha önceki sonuçları doğrular nitelikte STAMP2 artışının olduğu hücrelerde çoğalma ve canlılığın kontrole göre çok yüksek seviyelerde olduğu gösterilmiştir. AR ve SIRT1 ile yapılan çalışmalarda SIRT1 histon deasetilaz özelliğiyle AR transaktivasyonunu önlediği ispatlanmıştır. Transkripsiyonel faktör olan AR'ın başka genlerin promotoruna bağlanıp transkripsiyonunu aktive edebilmesi için asetiltransferazlarında dahil olduğu (CBP/P300) bir ko-aktivatör kompleksle beraber olması gerekmektedir. SIRT1 ko-repressor bir kompleks oluşturarak AR'ın fonksiyonelliğini engellemektedir (Fu et al., 2006). Kronik inflamasyon durumundaki hücrelerde tümör baskılayıcı gen olan NKX3.1 bantlarında azalma görülmektedir. Antioksidant yanıt oluşumunda önemli yer sahibi olan NRF2 geni ise CM'li örneklerde regülasyon iz miktarda artmıştır (Manda et al., 2015). CM 50 ile 48 saatlik örneğin Nile Red sonuçları ise CM'li örneklerde büyük oranda lipit artışı görülmektedir. STAMP2 ile yapılan bir diğer çalışmada ise regülasyonun artışı ile insülin direncini düzenlediği ve önemli glucose importer proteinlerden olan GLUT4 proteinin sitoplazmadan membrana translokasyonuna neden olarak hücreye glukoz alımı artmatadır (Chen et al., 2014).

Yapılan çalışma genel hatlarıyla değerlendirildiğinde STAMP2 ekspresyonunun artması hücre çoğalmasına, enerji ihtiyacına, bölünmek için biyokütle (lipit birikimi) artışı gibi parametreleri içinde barındırmaktadır. SIRT1

ise bu parametrelerin tam zıttı yönünde hareket etmektedir. Bölünen yavru hücrelerin enerji gereksinimi, metastatik hücrenin karşılaştığı metabolik stress koşulları gibi bazı parametrelerde hücre metabolizmayı yavaşlatır ve glukoz yokluğunda hücre biyokütlesi enerji kaynağı olarak kullanılır, ilk seçenek olarak lipidlerin katabolizmasıdır. Eğer lipidlerde kalmazlarsa ve hala açlık devam ediyorsa GAPDH AMPK bağlı olarak fosforillenir ve SIRT1 aktivasyonu artar. Bu sinyalizasyon sonucu otofaji süreci başlar, amino asitler, proteinler hatta organeller otofagozomlar tarafından hücre enerji kaynağı olarak kullanılır (Chang et al., 2015).



Şekil 5.1. SIRT1 fonksiyon kaybı veya arttığı durumların diğer sinyal yollarına etkileri gösterilmiştir (Liu at al., 2013).



Şekil 5.2. Daha önceki veriler ve çalışmamız sonucu STAMP2 ile SIRT1 arasındaki olası ilişkiyi sinyal mekanizmaları.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, PCa için önemli bir biyomarkör olan STAMP2 ile yapısında histon deasetilaz bölge bulunduran ve metabolik regülatör olan SIRT1 arasındaki ilişki üzerine çalışma yürütülmüştür. Farklı PCa hücre hatlarında transfeksiyon yöntemi uygulanarak bu iki genin susturulması ve ektopik ekspresyonu yapıldı. Aynı zamanda farklı metabolik koşullar altında hücre çoğalması, ROS yanıtı ve DNA hasarı mekanizmalarında yer alan proteinlerle olan etkileşimleri Western blot yöntemiyle saptandı. Elde edilen bilgiler doğrultusunda WST-1 testi ve Tripin Mavisini boyamayla hücre çoğalması-canlılığı analizleri yapıldı. Farklı metabolik koşullar altında bu iki genin arasındaki regülasyonun hücre metabolizmasına etkisi yağ yapılarını Nile Red ile işaretleyerek immüno Floresan mikroskopi yöntemi ve florometrik okumayla gözlenmiştir.

Hücre çoğalması ve sağkalım gibi fonksiyonları bulunduran bu iki proteinin birbirleriyle etkileşimleri ve bulunan bağlantısı PCa gelişim sürecini daha iyi anlamamızı sağlayarak, gelecekte kanser tedavisinde terapötik etkiyi arttıracak çalışmalara ışık tutabilme önemine sahiptir.

7.ÖNERİLER

Prostat kanseri erken aşamada androjen ablasyon tedavisi ile kontrol altına alınmaya çalışılsada sağ kalan kanser hücrelerinin ilerleyen safhalarda agresifleşerk ölüme götürdüğü bilinmektedir. Bu yüzden prostat kanserinin henüz etkili bir tedavisinin olmadığı düşünülebilir. Kanser hücreleri normal hücrelere göre çok farklı bir metabolizma sergiler eğer bu doğrultuda kanserli hücrelerin mekanizmaları keşfedilirse terapötik olarak daha etkili tedaviler ortaya çıkabilir. STAMP2 ve SIRT1 gibi hücrenin metabolik dengesine ve çoğalmasında etki eden proteinlerin mekanizmalarının çalışılmasıyla terapötik daha etkili kürler ve tedavi yöntemleri kullanılabilir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Arnold, J. T., & Isaacs, J. T.,** (2002). Mechanisms involved in the progression of androgen-independent prostate cancers: it is not only the cancer cell's fault. *Endocrine-related cancer*, 9(1), 61-73.
- Basu, H. S., Thompson, T. A., Church, D. R., Clower, C. C., Mehraein-Ghomi, F., Amlong, C. A., ... & Wilding, G.,** (2009). A small molecule polyamine oxidase inhibitor blocks androgen-induced oxidative stress and delays prostate cancer progression in the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model. *Cancer research*, 69(19), 7689-7695.
- Bluemn, E., & Nelson, P. S.,** (2012). The androgen/androgen receptor axis in prostate cancer. *Current opinion in oncology*, 24(3), 251.
- Byles, V., Zhu, L., Lovaas, J. D., Chmielewski, L. K., Wang, J., Faller, D. V., & Dai, Y.,** (2012). SIRT1 induces EMT by cooperating with EMT transcription factors and enhances prostate cancer cell migration and metastasis. *Oncogene*, 31(43), 4619.
- Chang, C., Su, H., Zhang, D., Wang, Y., Shen, Q., Liu, B., ... & Shen, H. M.,** (2015). AMPK-dependent phosphorylation of GAPDH triggers Sirt1 activation and is necessary for autophagy upon glucose starvation. *Molecular cell*, 60(6), 930-940.
- Chen, X., Huang, Z., Zhou, B., Wang, H., Jia, G., Liu, G., & Zhao, H.,** (2014). STEAP4 and insulin resistance. *Endocrine*, 47(2), 372-379.
- Dayyani, F., Gallick, G. E., Logothetis, C. J., & Corn, P. G.,** (2011). Novel therapies for metastatic castrate-resistant prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(22), 1665-1675.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Debelec-Butuner, B., Alapinar, C., Varisli, L., Erbaykent-Tepedelen, B., Hamid, S. M., Gonen-Korkmaz, C., & Korkmaz, K. S.,** (2014). Inflammation-mediated abrogation of androgen signaling: An in vitro model of prostate cell inflammation. *Molecular carcinogenesis*, 53(2), 85-97.
- Debelec-Butuner, B., Ertunc, N., & Korkmaz, K. S.,** (2015). Inflammation contributes to NKX3.1 loss and augments DNA damage but does not alter the DNA damage response via increased SIRT1 expression. *Journal of inflammation*, 12(1), 12.
- Deng, C. X.,** (2009). SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor?. *International journal of biological sciences*, 5(2), 147.
- Frohlich, D. A., McCabe, M. T., Arnold, R. S., & Day, M. L.,** (2008). The role of Nrf2 in increased reactive oxygen species and DNA damage in prostate tumorigenesis. *Oncogene*, 27(31), 4353.
- Fu, M., Liu, M., Sauve, A. A., Jiao, X., Zhang, X., Wu, X., ... & Pattabiraman, N.,** (2006). Hormonal control of androgen receptor function through SIRT1. *Molecular and cellular biology*, 26(21), 8122-8135.
- Grummt, I., & Ladurner, A. G.,** (2008). A metabolic throttle regulates the epigenetic state of rDNA. *Cell*, 133(4), 577-580.
- Haggstrom, M.,** (2014). Diagram of the pathways of human steroidogenesis. *WikiJournal of Medicine*, 1(1), 1.
- Heinlein, C. A., & Chang, C.,** (2004). Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine reviews*, 25(2), 276-308.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Ishikura, N., Kawata, H., Nishimoto, A., Nakamura, R., Tsunenari, T., Watanabe, M., ... & Emura, T.,** (2015). CH5137291, an androgen receptor nuclear translocation-inhibiting compound, inhibits the growth of castration-resistant prostate cancer cells. *International journal of oncology*, 46(4), 1560-1572.
- Jin, Y., Wang, L., Qu, S., Sheng, X., Kristian, A., Mælandsmo, G. M., ... & Alpay, N.,** (2015). STAMP2 increases oxidative stress and is critical for prostate cancer. *EMBO molecular medicine*, e201404181.
- Kaelin Jr, W. G., & McKnight, S. L.,** (2013). Influence of metabolism on epigenetics and disease. *Cell*, 153(1), 56-69.
- Korkmaz, C. G., Korkmaz, K. S., Kurys, P., Elbi, C., Wang, L., Klokk, T. I., ... & Saatcioglu, F.,** (2005). Molecular cloning and characterization of STAMP2, an androgen-regulated six transmembrane protein that is overexpressed in prostate cancer. *Oncogene*, 24(31), 4934.
- Kwon, H. S., & Ott, M.,** (2008). The ups and downs of SIRT1. *Trends in biochemical sciences*, 33(11), 517-525.
- Lim, J. H., Lee, Y. M., Chun, Y. S., Chen, J., Kim, J. E., & Park, J. W.,** (2010). Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1 α . *Molecular cell*, 38(6), 864-878.
- Lindstad, T., Qu, S., Sikkeland, J., Jin, Y., Kristian, A., Mælandsmo, G. M., ... & Saatcioglu, F.,** (2017). STAMP2 is required for human adipose-derived stem cell differentiation and adipocyte-facilitated prostate cancer growth in vivo. *Oncotarget*, 8(54), 91817.
- Liu, T. F., & McCall, C. E.,** (2013). Deacetylation by SIRT1 reprograms inflammation and cancer. *Genes & cancer*, 4(3-4), 135-147.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Manda, G., Isvoranu, G., Comanescu, M. V., Manea, A., Butuner, B. D., & Korkmaz, K. S.,** (2015). The redox biology network in cancer pathophysiology and therapeutics. *Redox biology*, 5, 347-357.
- Martinez-Pastor, B., & Mostoslavsky, R.,** (2012). Sirtuins, metabolism, and cancer. *Frontiers in pharmacology*, 3, 22.
- Moldes, M., Lasnier, F., Gauthereau, X., Klein, C., Pairault, J., Fève, B., & Chambaut-Guérin, A. M.** (2001). Tumor necrosis factor- α -induced adipose-related protein (TIARP), a cell-surface protein that is highly induced by tumor necrosis factor- α and adipose conversion. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33938-33946.
- Multhoff, G., Molls, M., & Radons, J.,** (2012). Chronic inflammation in cancer development. *Frontiers in immunology*, 2, 98.
- Nogueiras, R., Habegger, K. M., Chaudhary, N., Finan, B., Banks, A. S., Dietrich, M. O., ... & Tschöp, M. H.,** (2012). Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiological reviews*, 92(3), 1479-1514.
- Nowak, S. J., & Corces, V. G.,** (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *TRENDS in Genetics*, 20(4), 214-220.
- Ohgami, R. S., Campagna, D. R., McDonald, A., & Fleming, M. D.,** (2006). The Steap proteins are metalloreductases. *Blood*, 108(4), 1388-1394.
- Pang, S. T., Hsieh, W. C., Chuang, C. K., Chao, C. H., Weng, W. H., & Juang, H. H.,** (2009). Thioredoxin-interacting protein: an oxidative stress-related gene is upregulated by glucose in human prostate carcinoma cells. *Journal of molecular endocrinology*, 42(3), 205-214.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Paschos, A., Pandya, R., Duivenvoorden, W. C. M., & Pinthus, J. H.,** (2013). Oxidative stress in prostate cancer: changing research concepts towards a novel paradigm for prevention and therapeutics. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 16(3), 217.
- Prensner, J. R., Rubin, M. A., Wei, J. T., & Chinnaiyan, A. M.,** (2012). Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. *Science translational medicine*, 4(127), 127rv3-127rv3.
- Prigent, C., & Dimitrov, S.** (2003). Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for?. *Journal of cell science*, 116(18), 3677-3685.
- Ripple, M. O., Wilding, G., Henry, W. F., & Rago, R. P.,** (1997). Prooxidant-antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(1), 40-48.
- Scarl, R. T., Lawrence, C. M., Gordon, H. M., & Nunemaker, C. S.,** (2017). STEAP4: its emerging role in metabolism and homeostasis of cellular iron and copper. *Journal of Endocrinology*, 234(3), R123-R134.
- Shen, M. M., & Abate-Shen, C.,** (2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & development*, 24(18), 1967-2000.
- Siegel, R., DeSantis, C., Virgo, K., Stein, K., Mariotto, A., Smith, T., ... & Lin, C.,** (2012). Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 62(4), 220-241.
- Sikkeland, J., Sheng, X., Jin, Y., & Saatcioglu, F.,** (2016). STAMPing at the crossroads of normal physiology and disease states. *Molecular and cellular endocrinology*, 425, 26-36.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Sultan, C.**, (2002). Molecular action of androgens. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 198(15Á/24).
- Sun, X., Kanwar, J. R., Leung, E., Lehnert, K., Wang, D., & Krissansen, G. W.**, (2001). Gene transfer of antisense hypoxia inducible factor-1 α enhances the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy. *Gene therapy*, 8(8), 638.
- Ten Freyhaus, H., Calay, E. S., Yalcin, A., Vallerie, S. N., Yang, L., Calay, Z. Z., ... & Hotamisligil, G. S.**, (2012). Stamp2 controls macrophage inflammation through nicotinamide adenine dinucleotide phosphate homeostasis and protects against atherosclerosis. *Cell metabolism*, 16(1), 81-89.
- Velasco, A. M., Gillis, K. A., Li, Y., Brown, E. L., Sadler, T. M., Achilleos, M., ... & Zhang, Y.**, (2004). Identification and validation of novel androgen-regulated genes in prostate cancer. *Endocrinology*, 145(8), 3913-3924.
- Verze, P., Cai, T., & Lorenzetti, S.**, (2016). The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nature Reviews Urology*, 13(7), 379.
- Wellen, K. E., Fucho, R., Gregor, M. F., Furuhashi, M., Morgan, C., Lindstad, T., ... & Hotamisligil, G. S.**, (2007). Coordinated regulation of nutrient and inflammatory responses by STAMP2 is essential for metabolic homeostasis. *Cell*, 129(3), 537-548.
- Yap, T. A., Zivi, A., Omlin, A., & De Bono, J. S.**, (2011). The changing therapeutic landscape of castration-resistant prostate cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, 8(10), 597.

ÖZGEÇMİŞ

Serhan Turunç 1992 yılında Bursa'nın Mudanya ilçesinde doğmuştur. İlkokul ve lise öğrenimini Mudanya'da tamamladıktan sonra 2010 yılında Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümüne başlamıştır. 2015 yılında Biyoloji Bölümü'nün Moleküler Biyoloji ve Genetik opsiyonundan mezun olmuş ve Ege Üniversitesi Biyoteknoloji ana bilim dalında Prof. Dr. Kemal Sami Korkmaz danışmanlığında yüksek lisans eğitimine başlamıştır. Çalışma alanları Kanser moleküler biyolojisi ve gen ifadesinin düzenlenmesi üzerine yoğunlaşmıştır.

