

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CDK İNHİBİTÖRLERİNİN mTOR SUSTURMASI GERÇEKLEŞTİRİLEN
LNCaP, DU145 ve PC3 PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİNDE TERAPOTİK
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇAĞRI GÜMÜŞKAPTAN

1309241001

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. E. Damla ARISAN

Ağustos - 2015

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CDK İNHİBİTÖRLERİNİN mTOR SUSTURMASI GERÇEKLEŞTİRİLEN
LNCaP, DU145 ve PC3 PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİNDE TERAPOTİK
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇAĞRI GÜMÜŞKAPTAN

1309241001

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. E. Damla ARISAN
Diğer Juri Üyeleri: Prof. Dr. Narçin PALAVAN-ÜNSAL
Doç. Dr. Gizem Dinler DOĞANAY

Ağustos - 2015

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım ve lisans eğitimim süresince değerli fikirlerini ve tecrübelerini benden esirgemeyen, her aşamada yol gösterici olan ve yetişmemde çok büyük emeği geçen saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Elif Damla ARISAN' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında, başından sonuna kadar hep yanımda olan, değerli görüşlerini benimle paylaşan ve en önemlisi değerli zamanlarını bana ayıran Sayın Prof. Dr. Narçın Palavan ÜNSAL, Sayın Doç. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN, Sayın Yrd. Doç. Dr. Pınar OBAKAN, Sayın Araş. Gör. Pelin ÖZFİLİZ'e ve Sayın Araş. Gör. Özge BERRAK'a,

Hayatımın en güzel anlarını birlikte yaşadığım, desteğini her zaman kalbimde hissettiğim hayat arkadaşım Bengü ERGÜVEN'e,

Hem akademik hem de özel hayatımda desteklerini hissettiğim, zor zamanlarımda yüzümü güldüren Onur Sinan VATANSEVER, Erdiñç ÖZDEMİR, Barış TÜREYEN ve Uğur KURANLIOĞLU'na,

Tezim ve hayatım boyunca bana her anlamda destek olan ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili annem Tülay GÜMÜŞKAPTAN, babam Selçuk GÜMÜŞKAPTAN ve değerli aile üyelerimize, bu tezin hazırlanması sırasında her zaman desteklerini hissettiğim sevgili arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma bu çalışmamın uygulama kısmında 4/11/2013-23/03/2015 tarihleri arasında TUBİTAK ARBED 112T433 nolu proje ve 2210-C programı kapsamında 2014 yılı 3. Dönem bursiyeri olarak beni destekleyen ve kabul eden TÜBİTAK'a ve çalışmamın uygulama kısmını destekleyen İstanbul Kültür Üniversitesi'ne teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR LİSTESİ	iv
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Prostat Kanseri Epidemiyolojisi ve Patogenez İle İlgili Faktörler	1
1.1.1 Patogenezde Rol Oynayan Genetik Faktörler	3
1.1.2. Patogenezde Rol Oynayan Proteomik Faktörler	4
1.1.2.1. Prostat-spesifik Antijen (PSA)	4
1.2.1.2. Androjenler	5
1.1.3. Diyet ve Çevresel Faktörler	6
1.2. Prostat Kanseri Terapi Modelleri	7
1.2.1. Hormonal Terapi	7
1.2.2. Kemoterapi	8
1.2.3. Radyoterapi	8
1.3. Prostat Kanseri Oluşumu ve Tedavisinde Temel Moleküler Mekanizmalar	9
1.3.1. Hücre Döngüsü	9
1.3.1.1. Sikline bağlı kinazlar (CDKlar)	10
1.3.1.2. Siklinler	10
1.3.1.3. Doğal CDK inhibitörleri	12
1.3.2. Hücre Döngüsünü Durdurmaya Yönelik Stratejiler	14
1.3.2.1. Purin analogları roscovitine ve purvalanol	14
1.3.3. Hücre Sağ Kalım ve Ölüm Kararı	15
1.3.3.1. Programlı hücre ölümü, Apoptoz	15
1.3.3.2. Otofaji	19
1.3.4. mTOR Sinyal Yolağı	21
1.3.5. JAK/STAT Sinyal Yolağı	23
1.3.6. MAPK Sinyal Yolağı	25
1.4. Amaç	26
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	27
2.1. Materyal	27
2.1.1. Kullanılan Hücreler ve Özellikleri	27
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	27
2.1.3. Hücre Kültürü Donanımları	27
2.1.4. Kimyasal Maddeler	27
2.1.5. Kullanılan Çözeltiler	27
2.1.6. Kullanılan Antikor ve siRNA	28
2.2. Yöntemler	28
2.2.1. Hücre Kültürü	28
2.2.2. siRNA Yöntemi ile Gen Sessizleştirilmesi	28
2.2.2.1. Hücrelerin Hazırlanması	28
2.2.2.2. siRNA Transfeksiyonu	28
Lipozom Türevli Ajan Kullanılarak siRNA transfeksiyonu	28
Elektroporasyon Yöntemi ile siRNA transfeksiyonu	29

2.2.2.3. siRNA Transfeksiyon Verimliliğinin Kontrolü	29
2.2.3. Protein İfadesinin Belirlenmesi	29
2.2.3.1. Total Protein İzolasyonu	29
Nüklear/sitoplazmik Protein İzolasyonu	29
2.2.3.2. Bradford Yöntemiyle Protein Miktar Tayini	30
2.2.3.3. SDS-PAGE Jel Hazırlanması	30
2.2.3.4. Protein Örneklerin Hazırlanması	30
2.2.3.5. SDS-PAGE Jelin Yürümesi ve PVDF Membrana Transfer	31
2.2.3.6. Immunoblotlama İçin Birincil ve İkincil Antikorların Girilmesi ve Sonucun ChemiDoc™ Sistemi ile Görüntülenmesi	31
2.2.4. PathScan ELISA Yöntemi	31
2.2.4.1. Total Protein İzolasyonu	31
2.2.4.2. Bradford Yöntemiyle Protein Miktar Tayini	32
2.2.4.3. PathScan® Intracellular Signaling Array Kit Protokolü	32
2.2.4.4. Pathscan görüntülerinin kantitatif analizi	33
2.2.5. İmmünopresipitasyon Yöntemi	33
2.2.6. İstatistiksel Analiz	34
3. SONUÇLAR	35
4. TARTIŞMA	65
5. KAYNAKLAR	77
6. EKLER	85
Ek A: Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar	85
Ek B: Hücre Kültüründe Kullanılan Sarf Malzeme	86
Ek C: Kullanılan Kimyasal Maddeler	87
Ek D: Çözeltiler	89
% 70 Etanol: 100 ml	89
Yağsız süt tozu (% 5): 50 ml	89
0,5 M Tris-HCl (pH 6.8): 100 ml	89
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8): 150 ml	89
% 0,5 (w/v) Bromofenol mavisi: 10 ml	89
% 10 (w/v) APS (amonyum persulfat): 10 ml	89
10X TBS Hazırlanışı	90
IP Hücre Lizis Tamponu (30 ml)	90
TBS-Tween Hazırlanışı	90
Yürütme Tamponunun Hazırlanışı	90
Transfer Tamponunun Hazırlanışı	90
Yürütme Jelinin Hazırlanması	90
Ek E: Çalışma Kapsamında Kullanılan Antikorlar ve siRNA'lar	90
7. TEZ SÜRESİNCE ELDE EDİLEN AKADEMİK ÇIKTILAR	91
8. ÖZGEÇMİŞ	92

KISALTMALAR LİSTESİ

4E-BP: Ökaryotik başlatıcı faktör 4E bağlayıcı protein

ADT: Androjen baskılama terapisi

AIF: Apoptoz indükleyici faktör

Apaf-1: Apoptotik proteaz aktifleştirici protein 1

APS: Amonyum persülfat

AR: Androjen reseptörü

AREs: Androjen cevap elementleri

Atg: Otofaji ilişkili protein

ATP: Adenozin trifosfat

Bcl-2: B-hücre lenfoma 2

BH: Bcl-2 homoloji bölgesi

BSA: Sığır serum albumin

CDK: Sikline bağımlı kinaz

CDKi: CDK inhibitörü

Cip/Kip: CDK inhibitör protein/kinaz inhibitör protein

CO₂: Karbondioksit

DAPk: Ölüm-ilişkili protein kinaz

DES: Dietilstibestrol

DHT: Dihidrotestosteron

DISC: Ölüm indükleyici sinyal kompleksi

DK: Doğal katil hücreleri

DKT: Doğal katil T hücreleri

DMSO: Dimetilsülfoksit

DR: Ölüm reseptörü

DTT: Dikoloro difenol trikloroetan

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

EPT: Eksternal parçacık radyoterapisi

ESM: Ekstraselüler matriks proteinleri

FADD: Fas-ilişkili ölüm motifi

FDA: Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi

FKBP12: 12-kDa FK506-bağlayıcı protein

FoXO: Forkhead box O transkripsiyon faktörü

GDP: Guanozin difosfat
GRB2: Büyüme faktörü reseptörüne bağlanan protein 2
GSK-3 β : Glikojen sentaz kinaz-3beta
HDPK: Hormona dirençli prostat kanseri
HSP27: Isı şoku proteini 27
IAP: Apoptoz inhibitör protein
IFN- γ : İnterferon gama.
IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
IL-6: İnterlökin 6
JAK: Janus kinaz
JNK: c-Jun N-terminal kinaz
kDa: Kilodalton
LC3: Mikrotübül ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3
LHRH: Lüteinleştirici hormon salıcı hormon
MAPK: Mitojen aktive protein kinaz
MDMP: Mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu
miRNA: Mikro RNA
MPN: Klasik myeloproliferatif neoplazm
mTOR: Memeli rapamycin hedefi (Mammalian target of rapamycin)
NF κ B: Nuklear faktör kappa B.
PARP: Poli-ADP riboz polimeraz
PBS: Fosfat tampon çözeltisi
PhIP: 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo(4,5-b)piridin
PI: Propidyum iyodür
PI3K: Fosfoinositid 3-kinaz
PIA: Prostat intraepitelyal adenom
PIKK: Fosfoinositid 3-kinase-ilişkili kinaz
PIN: Prostat intraepitelyal neoplazm
PMSF: Fenilmetansülfonilflorid
PRAS40: 40 kDa'luk prolin bakımından zengin Akt/PKB substratı
pRB: Retinoblastoma protein
PSA: Prostat spesifik antijen
PTEN: Tümör baskılayıcı protein olan fosfataz ve tensin homolog
PVDF: Poliviniliden florid

RSK: 40S ribozomal protein S6 kinaz
S6K: p70-S6 kinaz
SDS-PAGE: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
SİN: Servikal intraepitelyal neoplazi
siRNA: Küçük interferans RNA
SNP: Tek nukleotid polimorfizmi
SOCS: Sitokin sinyal proteinleri baskılayıcı
SQSTM1: Sekuestozom 1
STAT: Sinyal iletici ve transkripsiyon aktive edici protein
T: Testosteron
TBS-T: Tris tampon çözeltisi-Tween
TEMED: Tetrametiletildiamin
TMPRSS2: Transmembrane proteaz serin 2
TNF α : Tümör nekroz faktör-alfa
TRADD: TNF reseptör ilişkili ölüm motifli protein
TRAIL: TNF ilişkili apoptoz indükleyici ligand
TSC: Tuberoz Skleroz Kompleks
TSP-1: Trombospondin 1
Tyk2: Tirozin kinaz 2
ULK1: Unc51 benzeri kinaz-1

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1. CDK inhibitörlerinin mTOR siRNA varlığında/yokluğunda PC3 prostat kanseri hücrelerinde sağ kalım sinyal kaskadları üzerine etkisinin modellenmesi. Yalnız purvalanol ve roscovitinein ilgili proteinlerin fosforilasyonu üzerindeki etkisi kontrol grubuna göre kıyaslanırken, bu ilaçların mTOR siRNA ile kombinasyonları, ilaçların tek başına olan etkilerine göre kıyaslanmıştır. NS (non-significant); değişim değerinin anlamlı olmadığını belirtmek için kullanılmıştır.	70
Tablo 4.2. CDK inhibitörlerinin mTOR siRNA varlığında/yokluğunda LNCaP prostat kanseri hücrelerinde sağ kalım sinyal kaskadları üzerine etkisinin modellenmesi. Yalnız purvalanol ve roscovitinein ilgili proteinlerin fosforilasyonu üzerindeki etkisi kontrol grubuna göre kıyaslanırken, bu ilaçların mTOR siRNA ile kombinasyonları, ilaçların tek başına olan etkilerine göre kıyaslanmıştır. NS (non-significant); değişim değerinin anlamlı olmadığını belirtmek için kullanılmıştır.	72
Tablo 6.1. Kullanılan cihazların listesi	85
Tablo 6.2. Hücre kültürü donanımları.....	86
Tablo 6.3. Kullanılan kimyasalların listesi	87

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Erkeklerde farklı kanser tiplerinde yıllık konulan teşhis oranları, Amerika Birleşik Devletleri, 1975-2011 (Siegel <i>ve ark.</i> 2015).	2
Şekil 1.2. Türkiye’de yerleşim yerlerine bağlı prostat kanseri insidansı ile ilişkili vaka sayılarının 100000 populasyon üzerinden gösterilmesi (1 Temmuz 2008 – 30 Haziran 2009) (Zorlu <i>ve ark.</i> 2014).	2
Şekil 1.3. PSA’nın üç boyutlu yapısı (Tomao <i>ve ark.</i> 2014).	5
Şekil 1.4. Hücre döngüsü fazları ve düzenleyici CDK/siklin komplekslerinin hücre döngüsündeki etkinlik noktaları (Vermeulen <i>ve ark.</i> 2003).	9
Şekil 1.5. Doğal CDK inhibitörleri ve hücre döngüsünü düzenleyici yolların interaksiyonu (Massague 2004).	13
Şekil 1.6. Roscovitine’in kimyasal yapısı (Doleckova <i>ve ark.</i> 2013).	14
Şekil 1.7. Purvalanolün kimyasal yapısı (Knockaert <i>ve ark.</i> 2002).	15
Şekil 1.8. Apoptotik hücre ile nekrotik hücrenin morfolojik olarak farkı. A, sağlıklı hücre; B, apoptotik hücre; C, nekrotik hücre (Krysko <i>ve ark.</i> 2008).	16
Şekil 1.9. Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz sinyal yolları (Ashkenazi 2008).	18
Şekil 1.10. Otofajik hücre morfolojisi. A, sağlıklı hücre; B, otofajik hücre (Nikoletopoulou <i>ve ark.</i> 2013).	20
Şekil 1.11. Memeli hücrelerinde otofaji aşamaları ve otofajide görev alan moleküler yapılar (Johansen ve Lamark 2014).	21
Şekil 1.12. mTOR sinyal kaskadı. mTORC1 ve mTORC2’nin yukarı ve aşağı yönünde rol oynayan elemanlar ve mTOR komplekslerinden iletilen sinyallerin yol açtığı hücresel aktiviteler gösterilmiştir. Rapamycin FKBP12’ye bağlanarak mTORC1 inhibisyonuna neden olurken, mTORC2 inhibisyonu için rapamycin dozunun ya da uygulama süresinin artırılması gerekmektedir (Xu <i>ve ark.</i> 2012).	23
Şekil 1.13. Şematik olarak JAK/STAT sinyal yolağının sunumu (Harrison 2012)..	25
Şekil 1.14. MAPK sinyal kaskadı ve diğer yollarla interaksiyonu (Santarpia <i>ve ark.</i> 2012).	26
Şekil 3.1. LNCaP, PC3 ve DU145 hücre hatlarına sırasıyla, 50 ve 75 nM mTOR siRNA I ve siRNA II lipozom türevli ajan ile 1:6 oranında 48 saat boyunca uygulaması gerçekleştirilmiştir.	35
Şekil 3.2. LNCaP hücre hattına mTOR siRNA I ve II 75 nM’den uygulanmış, lipozom türevli ajanla ve elektroporasyon yöntemiyle (50 nM) transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. *50 nM siRNA I ve II uygulanarak gerçekleştirilen elektroporasyon işlem sonucunu göstermektedir.	36
Şekil 3.3. DU145 hücre hattına mTORsiRNA I ve II 50 nM konsantrasyonda uygulanmış, elektroporasyon yöntemi ile transfeksiyon gerçekleştirilmiştir.	37
Şekil 3.4. PC3 hücre hattına 75 nM mTOR siRNA I ve II, 1:6 oranında lipozom türevli ajan ile 48 saat boyunca inkübe edilmiştir.	38
Şekil 3.5. LNCaP ve PC3 hücrelerinde elektroporasyon yöntemiyle sırasıyla 200 nM ve 100 nM siRNA miktarlarıyla gerçekleştirilen transfeksiyon işleminden 48 saat sonra mTOR proteini seviyesindeki değişimlerin immuno-blotlama yöntemiyle gösterimi. GAPDH yükleme kontrolü olarak yer almaktadır.	39
Şekil 3.6. PC3 hücrelerinde floresein etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA I için 1:3 ve 1:6 oranlarındaki transfeksiyon işleminden 48 saat sonra mTOR proteini seviyesindeki değişimlerin immuno-blotlama yöntemiyle gösterimi. GAPDH yükleme kontrolü olarak yer almaktadır.	40

Şekil 3.7. PC3 hücre hattında floresan etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA-I için 1:3 ve 1:6 oranında gerçekleştirilen transfeksiyon işleminden 48 saat sonra 10x, 20x ve 40x büyütmelemlerde alınan ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri.	41
Şekil 3.8. LNCaP hücrelerinde floresein etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA-I için 1:6 oranlarındaki transfeksiyon işleminden 48 saat sonra mTOR proteini seviyesindeki değişimin immuno-blotlama yöntemiyle gösterimi. β -Tubulin yükleme kontrolü olarak yer almaktadır.	42
Şekil 3.9. LNCaP hücrelerinde floresein etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA I için 1:6 oranında gerçekleştirilmiş transfeksiyon işleminden 48 saat sonra 10x, 20x ve 40x büyütmelemlerde alınan ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri.	43
Şekil 3.10. DU145 hücre hattında floresein etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA I için 1:3 ve 1:6 oranında gerçekleştirilen transfeksiyon işleminden 48 saat sonra 10x, 20x ve 40x büyütmelemlerde alınan ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri. Hücre ekim yoğunluğu %50 olup, transfeksiyon medyasında inkübasyon süresi 24 saattir.	44
Şekil 3.11. DU145 hücrelerinde floresein etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA I için 1:6 oranında gerçekleştirilen transfeksiyon işleminden 48 saat sonra 10x, 20x ve 40x büyütmelemlerde alınan ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri. Hücre ekim yoğunluğu %60 olup, transfeksiyon medyası 4. saat sonunda %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin'li RPMI medya ile değiştirilmiştir.	45
Şekil 3.12. DU145 hücrelerinde floresein etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA I için 1:6 oranında gerçekleştirilen transfeksiyon işleminden 48 saat sonra 10x, 20x ve 40x büyütmelemlerde alınan ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri. Hücre ekim yoğunluğu %60 olup, transfeksiyon medyasında inkübasyon süresi 18 saattir.	46
Şekil 3.13. DU145 hücrelerinde floresein etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA I için 1:3 oranında gerçekleştirilen transfeksiyon işleminden 48 saat sonra 10x, 20x ve 40x büyütmelemlerde alınan ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri. Hücre ekim yoğunluğu %60 olup, transfeksiyon medyasında inkübasyon süresi 18 saattir.	47
Şekil 3.14. DU145 hücrelerinde floresein etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA I için 1:6 oranlarındaki transfeksiyon işleminden 48 saat sonra mTOR proteini seviyesindeki değişimin immuno-blotlama yöntemiyle gösterimi. Hücre ekim yoğunluğu %60 olup, transfeksiyon medyası 4. saat sonunda %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin'li RPMI medya ile değiştirilmiştir. β -Tubulin yükleme kontrolü olarak yer almaktadır.	48
Şekil 3.15. DU145 hücrelerinde floresein etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA I için 1:6 oranlarındaki transfeksiyon işleminden 48 saat sonra mTOR proteini seviyesindeki değişimin immuno-blotlama yöntemiyle gösterimi. Hücre ekim yoğunluğu %60 olup, transfeksiyon medyasında inkübasyon süresi 18 saattir.	48
Şekil 3.16. DU145 hücrelerinde floresein etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA I için 1:3 oranlarındaki transfeksiyon işleminden 48 saat sonra mTOR proteini seviyesindeki değişimin immuno-blotlama yöntemiyle gösterimi. Hücre ekim yoğunluğu %60 olup, transfeksiyon medyasında inkübasyon süresi 18 saattir. GAPDH yükleme kontrolü olarak yer almaktadır.	49
Şekil 3.17. PC3 hücre hattında 1:6 oranındaki mTOR siRNA I transfeksiyonundan 24 saat sonra gerçekleştirilen 24 saatlik purvalanol, roscovitine ve rapamycin ilaçları uygulamasını takiben Pathscan® Intracellular Signalling Array Kit (Chemiluminescent Readout), CST kullanılarak elde edilen immuno-assay görüntüsü.	50
Şekil 3.18. CDK inhibitörleri ve mTOR inhibisyon/gen ifadesinin baskılanmasına yönelik PC3 hücrelerinde PATHSCAN ELISA yöntemi ile taranan mTOR üst ve alt	

sinyal yollarının ifade düzeylerinin yükleme kontrolü β -Actin ifadesine göre göreceli olarak belirlenmesi.	52
Şekil 3.19. CDK inhibitörleri ve mTOR inhibisyon/gen ifadesinin baskılanmasına yönelik PC3 hücrelerinde PATHSCAN ELISA yöntemi ile taranan mTOR alt sinyal yollarının ifade düzeylerinin yükleme kontrolü β -Actin ifadesine göre göreceli olarak belirlenmesi.	53
Şekil 3.20. CDK inhibitörleri ve mTOR inhibisyon/gen ifadesinin baskılanmasına yönelik PC3 hücrelerinde PATHSCAN ELISA yöntemi ile taranan MAPK ilişkili sinyal yollarının ifade düzeylerinin yükleme kontrolü β -Actin ifadesine göre göreceli olarak belirlenmesi.	53
Şekil 3.21. CDK inhibitörleri ve mTOR inhibisyon/gen ifadesinin baskılanmasına yönelik PC3 hücrelerinde PATHSCAN ELISA yöntemi ile taranan apoptoz ilişkili hedeflerin ifade düzeylerinin yükleme kontrolü β -Actin ifadesine göre göreceli olarak belirlenmesi.	54
Şekil 3.22. LNCaP hücre hattında 1:6 oranındaki mTOR siRNA I transfeksiyonundan 24 saat sonra gerçekleştirilen 24 saatlik purvalanol, roscovitine ve rapamycin ilaçları uygulamasını takiben Pathscan® Intracellular Signalling Array Kit (Chemiluminescent Readout), CST kullanılarak elde edilen immuno-assay görüntüsü.	54
Şekil 3.23. CDK inhibitörleri ve mTOR inhibisyon/gen ifadesinin baskılanmasına yönelik LNCaP hücrelerinde PATHSCAN ELISA yöntemi ile taranan apoptoz ilişkili hedeflerin ifade düzeylerinin yükleme kontrolü β -Actin ifadesine göre göreceli olarak belirlenmesi.	57
Şekil 3.24. CDK inhibitörleri ve mTOR inhibisyon/gen ifadesinin baskılanmasına yönelik LNCaP hücrelerinde PATHSCAN ELISA yöntemi ile taranan apoptoz ilişkili hedeflerin ifade düzeylerinin yükleme kontrolü β -Actin ifadesine göre göreceli olarak belirlenmesi.	57
Şekil 3.25. CDK inhibitörleri ve mTOR inhibisyon/gen ifadesinin baskılanmasına yönelik LNCaP hücrelerinde PATHSCAN ELISA yöntemi ile taranan apoptoz ilişkili hedeflerin ifade düzeylerinin yükleme kontrolü β -Actin ifadesine göre göreceli olarak belirlenmesi.	58
Şekil 3.26. CDK inhibitörleri ve mTOR inhibisyon/gen ifadesinin baskılanmasına yönelik LNCaP hücrelerinde PATHSCAN ELISA yöntemi ile taranan apoptoz ilişkili hedeflerin ifade düzeylerinin yükleme kontrolü β -Actin ifadesine göre göreceli olarak belirlenmesi.	59
Şekil 3.27. LNCaP hücrelerinde CDK inhibitörleri purvalanol, roscovitine ve mTOR inhibitörü rapamycin'in tek başlarına ve her birinin ayrı ayrı 48 saatlik mTOR siRNA I transfeksiyonunda 24 saatlik uygulamalarını takiben Stat1 ve Stat3 seviyelerindeki değişimin immuno-blotlama yöntemiyle gösterimi. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.	60
Şekil 3.28. LNCaP hücrelerinde CDK inhibitörleri purvalanol, roscovitine'nin 24 saatlik uygulamasıyla FoxO1-Stat3 interaksiyon profilindeki değişimin immunopresipitasyon yöntemiyle gösterimi.	61
Şekil 3.29. LNCaP hücre hattında 24 saatlik purvalanol ve roscovitine uygulamasını takiben Stat3-AR interaksiyonundaki ve Stat3 seviyesindeki değişimin immunpresipitasyon yöntemi ile gösterimi.	61
Şekil 3.30. DU145 hücre hattında CDK inhibitörleri purvalanol, roscovitine ve mTOR inhibitörü rapamycin'in tek başlarına ve herbirinin ayrı ayrı 48 saatlik mTOR siRNA I transfeksiyonunda 24 saatlik uygulamalarını takiben Stat1 ve Stat3 seviyelerindeki	

değişimin immuno-blotlama yöntemiyle gösterimi. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.	62
Şekil 3.31. DU145 hücrelerinde cdk inhibitörlerinden purvalanol ve roscovitine'nin 24 saatlik uygulamasını takiben p-Stat1 (Tyr701) proteini seviyesindeki değişimin immuno-presipitasyon yöntemi ile gösterimi. β-Tubulin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.	62
Şekil 3.32. DU145 hücre hattında CDK inhibitörleri purvalanol, roscovitine ve mTOR inhibitörü rapamycin'in tek başlarına ve herbirinin ayrı ayrı 48 saatlik mTOR siRNA I transfeksiyonunda 24 saatlik uygulamalarını takiben p-Stat3 (Ser727) seviyelerindeki değişimin immuno-blotlama yöntemi ile gösterimi. β-Tubulin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.	63
Şekil 3.33. DU145 hücrelerinde CDK inhibitörleri purvalanol, roscovitine ve mTOR inhibitörü rapamycin'in tek başlarına ve herbirinin ayrı ayrı 48 saatlik mTOR siRNA I transfeksiyonunda 24 saatlik uygulamalarını takiben ULK1, Atg7, Beclin-1, SQSTM1/p62 proteinlerinin anlatımlarında ve p-ULK1 (Ser555), p-p70S6K (Thr389), p-AMPKα (Thr172) düzeylerindeki değişimin immuno-blotlama yöntemi ile gösterimi. β-Tubulin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.	64
Şekil 4.1. LNCaP hücrelerinde hipotetik olarak Akt'ın FoxO1/FoxO3a-Stat3 kompleksine etkisi ve p-Stat3-AR ilişkisinin şematik olarak gösterimi. U-Stat3, defosforile durumdaki Stat3'ü ifade etmektedir.	74
Şekil 4.2. Tez kapsamında incelenen mTOR sinyal yolağı ilişkili proteinlerin regülasyonlarına mTOR siRNA ve CDK inhibitörlerinin AR negatif PC3, DU145 ve AR pozitif LNCaP hücrelerinde etkisinin şematik olarak gösterimi.	76

ÖZET

Prostat kanseri, prostat bezi hücrelerinde büyüme ve bölünme kontrolünün kaybıyla organ hacminde meydana gelen büyüme olarak tanımlanmaktadır. Prostat kanseri dünya genelinde en çok tanı konulan ikinci kanser türü olup, erkeklerde kanser nedeniyle ölüm vakalarında altıncı sırada yer almaktadır. Androjenler prostat kanseri gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte prostat kanserinin metastatik formlarının androjenlerden bağımsız olması nedeni ile yüksek mortalite oranları görülmektedir. Bu nedenle prostat kanseri tedavisine yönelik olarak yeni terapötik hedeflerin araştırılması halen araştırmacıların ilgi odağı olup, bu hedeflerin etkileşime girdikleri hücresel sinyal yolları aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

Anti-kanser stratejilerden bir tanesi kanserli hücrelerin aşırı çoğalma potansiyelinin indirgenmesine yönelik çalışmalardır. Bu mekanizmada önemli rol oynayan siklinler ve sikline bağımlı kinazlar (CDK) yer almaktadır. CDK protein ailesinin ana görevi hücre siklusunu yönetmek ve hücrelerin sağlıklı bir şekilde bölünmesini sağlamaktır. Kanser hücrelerinde CDK'ların aşırı aktivasyonu hücrelerin engellenemeyen bir şekilde sürekli olarak siklusa kalmalarını ve aşırı çoğalmalarını sağlar. Yeni nesil CDK inhibitörlerinden roscovitine (CYC202, seliciclib) ve purvalanol kendilerine özgü CDK hedeflerini inhibe ederek hücre çoğalmasına ket vururlar ve bu nedenle yüksek apoptotik potansiyele sahip ajanlar olarak literatürde yer almaktadırlar.

Bu tez kapsamında mTOR susturması gerçekleştirilmiş, androjen reseptörü pozitif LNCaP ve negatif DU145 ve PC3 prostat kanseri hücre hatlarında yeni nesil CDK inhibitörleri roscovitine ve purvalanol uygulamaları ile terapötik modelin apoptotik yetkinliğinin moleküler mekanizmasının anlaşılabilmesi, mTOR ile ilişkili çeşitli sinyal kaskadlarının tetiklenen apoptotik ve/veya mekanizmalarda rolünün gösterilmesi amaçlanmaktadır. mTOR siRNA uygulanmasına ihtiyaç duyulması, mTOR inhibitörü olan rapamycinin mTOR inhibisyonunu geri dönüşümlü şekilde gerçekleştirmesinden kaynaklanmaktadır. Rapamycin, mTOR kompleks 1'i inhibe

ederken, mTOR kompleks 2'ye duyarsızdır. Bu sebeple, mTOR siRNA kullanımı tüm mTOR komplekslerinin baskılanması açısından avantajlıdır.

PC3 ve LNCaP hücrelerinde CDK inhibitörleri purvalanol ve roscovitine'in tek başlarına ve mTOR yoksunluğunda, mTOR'un alt ve üst sinyal yollarına olan etkileri Pathscan ELISA analiziyle taranmıştır. Bu ilaçların CDK'den bağımsız etkilerinin bulunduğu; purvalanolün mTOR ve mTOR ilişkili farklı kinaz molekülleri üzerinde roscovitine'den daha yetkin olduğu görülmüştür. PC3 ve LNCaP hücre hatlarında mTOR yoksunluğunun CDK inhibitörlerinin apoptotik etkilerine ket vurduğu ve mTOR tarafından düzenlenen Stat1 ve Stat3 proteinlerinin purvalanol ve roscovitine'in terapötik etkileri üzerinde belirleyici olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, LNCaP hücrelerinde CDK inhibitörlerinin Stat3 Ser727 fosforilasyonunu arttırarak Stat3-FoXO1 ve ayrıca CDK5 aktivitesini inhibe ederek AR-Stat3 interaksiyonlarının azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, özellikle Stat3 anlatımının ve fosforilasyonunun hücre sağ kalımı ve hücre ölümüyle ilişkili yolların düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığı açığa çıkarılmıştır. DU145 hücrelerinde mTOR siRNA ile birlikte CDK inhibitörlerinin uygulanması, LNCaP ve PC3 hücrelerinden farklı Stat3 anlatım profiline neden olmaktadır. Bu nedenle, DU145 hücrelerinde mTOR yoksunluğu CDK inhibitörlerinin otofaji ya da apoptoz ilişkili olarak değil ama Stat proteinleri aracılığıyla CDK'lar üzerinden hücre siklusuna etki ettiği düşünülmektedir. mTOR protein ifadesini baskılayan CDK inhibitörleri farklı hücre sinyal yollarını da baskı altında tutarak apoptotik veya otofajik karara neden olabilmektedirler. mTOR proteinin bu nedenle belirli bir düzeyde hücrelerde bulunması her iki sinyal yolağı hedefleri açısından düzenleyici olup, CDK inhibitörleri erken cevap mekanizmasında terapötik etkiyi rapaloglar kadar etkili bir şekilde yansıtmamaktadırlar.

ABSTRACT

Prostate cancer is defined as loss of cell growth and proliferation control in prostate tissue cells lead to increased size of prostate gland. Prostate cancer is the second most frequently diagnosed cancer as well as the sixth leading cause of death in males with cancer worldwide. Androgens play a critical role in prostate cancer development. However prostate cancer cells may progress androgen-independently that causes higher mortality rates. Therefore, new therapeutic targets and clarification of their signaling pathways against these aggressive forms are required.

One of the anti-cancer strategies is inhibition of over-proliferation potential of cancer cells. In this mechanism, cyclins and cyclin-dependent kinases (CDKs) play important roles. Major effect of CDK protein family is regulate cell cycle and cell division. In cancer cells, over-activation of CDKs leads to cells continuously remain in cell cycle and causes cellular overproliferation. New generation CDK inhibitors roscovitine (CYC202, seliciclib) and purvalanol inhibits specific CDK targets and thus prevent cell proliferation.

In this study, purvalanol and roscovitine was used to expose the mechanism underlying mTOR-related apoptotic and/or autophagic response and to understand roles of mTOR depending on its signal cascades in the cell death processes via mTOR silenced androgen receptor (AR) negative PC3, DU145 and AR positive LNCaP prostate cancer cell lines. The purpose of using mTOR siRNA is due to a mTOR inhibitor rapamycin's effect on mTOR reversible. Rapamycin inhibits mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) however is not effective on mTORC2. Therefore, using mTOR siRNA has huge advantage on silencing both complexes.

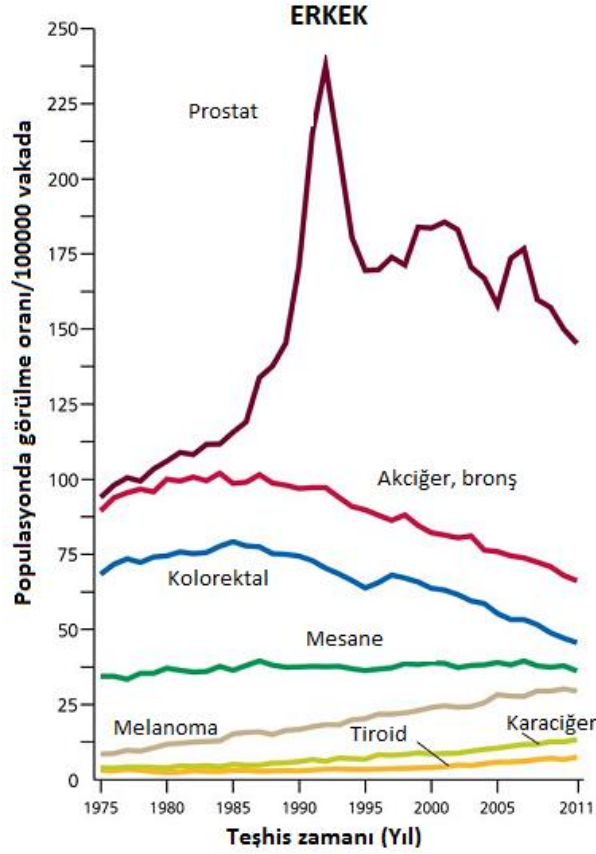
In PC3 and LNCaP cells, CDK inhibitors were used alone and with mTOR siRNA combination to scan and analyze differentiation upstream and downstream targets of mTOR using Pathscan ELISA Assay. CDK inhibitors purvalanol and roscovitine affects activation of mTOR and mTOR-related kinases in a CDK-independent manner. However purvalanol shows more potent inhibitory function than

roscovitine. In PC3 and LNCaP cell lines, mTOR deficiency causes blockage of apoptotic processes induced by CDK inhibitors. On the other hand, regulation of Stat1 and Stat3 proteins by mTOR seems to determine apoptotic effects of those drugs. Increased Stat3 Ser727 phosphorylation levels by CDK inhibitors leads to decrease Stat3-FoxO1 and CDK5 activity. Diminished CDK5 activity then causes AR-Stat3 dissociation. Therefore, especially differentiation in Stat3 expression and phosphorylation status play a vital role in the manner of regulation of cell survival and cell death pathways signalling. However, CDK inhibitors and their combination with mTOR siRNA leads to diverse Stat3 expression profiles in DU145 cell line. It shows that mTOR deprivation in DU145 cells affects Stat1 and Stat3 protein levels and thus alters CDK regulation in cell cycle rather than influences apoptotic and/or autophagic signalling pathways. CDK inhibitors suppress mTOR protein and different signalling pathways so that determine apoptotic or autophagic outcomes. The presence of mTOR in certain level is critical for both signalling pathways. In addition, CDK inhibitors is appeared to less effective than rapalogs in early response mechanism.

1. GİRİŞ

1.1. Prostat Kanseri Epidemiyolojisi ve Patogenez İle İlgili Faktörler

Prostat kanseri, prostat bezi hücrelerinde büyüme ve bölünme kontrolünün kaybıyla organ hacminde meydana gelen büyüme olarak tanımlanmaktadır. Prostat kanseri dünya genelinde en çok tanı konulan ikinci kanser türü olup, erkeklerde kanser nedeniyle ölüm vakalarında altıncı sırada yer almaktadır. Son çalışmalara göre Amerika Birleşik Devletleri'nde prostat kanseri, deri kanserinden sonra en yaygın görülen kanser türü olup, erkeklerde ölüme yol açan ikinci kanser türü olarak gösterilmiştir. Ayrıca Afrika kökenli erkeklerde prostat kanseri, en sık görülen ve en yüksek ölüm oranına sahip kanser türüken; Asya yerlilerinde en az sıklıkta görülen kanser tipi olduğu yönünde bulgular literatürde yer almaktadır. Bununla birlikte, bazı Asya ve Avrupa ülkelerinde prostat kanseri vakalarında ve bu kanser türüne bağlı ölümlerde artış görülmektedir (Verma *ve ark.* 2011). Amerika Birleşik Devletleri'nde 1975-1990 yılları arasındaki prostat kanseri teşhisinde yaşanan artış, ilk olarak transüretal prostatektominin ve ikincil olarak da genel prostat-spesifik antijen (PSA) testinin kullanımıyla asemptomatik hastalıkların tespitinde meydana gelen artış ile korelasyon göstermektedir (Siegel *ve ark.* 2015) (Şekil 1.1). Türkiye'de iller bazında elde edilen veriler ışığında, prostat kanserinin halk sağlığını tehdit eden önemli bir sağlık problemi olduğu ve görülme sıklığının devamlı olarak arttığı belirlenmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilen bir çalışmada, yaklaşık bir sene boyunca (1 Temmuz 2008 – 30 Haziran 2009) yeni 4150 prostat kanseri teşhisi konulduğu gösterilmiş ve yaşa bağlı olarak en sık görülen prostat kanseri vakası İstanbul iken, en az ise Edirne'de vaka sayısı saptanmıştır (Zorlu *ve ark.* 2014) (Şekil 1.2).



Şekil 1.1. Erkeklerde farklı kanser tiplerinde yıllık konulan teşhis oranları, Amerika Birleşik Devletleri, 1975-2011 (Siegel ve ark. 2015).

il	Görölme sıklığı	Yaşa bağı düzeltilmiş oran (WHO)
Adana	24.1	33.8
Ankara	35.2	42.6
Edirne	22.6	17.7
Erzurum	15.5	19.4
Eskisehir	24.4	21.6
Gaziantep	12.6	23.6
Istanbul	29.6	43.7
Izmir	25.7	25.1
Kayseri	23.6	28.7
Malatya	26.4	29.4
Trabzon	27.8	24.6
Zonguldak	27.2	26
Turkey	27.7	35

Şekil 1.2. Türkiye’de yerleşim yerlerine bağı prostat kanseri insidansı ile ilişkili vaka sayılarının 100000 populasyon üzerinden gösterilmesi (1 Temmuz 2008 – 30 Haziran 2009) (Zorlu ve ark. 2014).

1.1.1. Patogenezde Rol Oynayan Genetik Faktörler

Geniş hedefler açısından taranan genomik analizler, prostat kanserinde karsinogenez gelişimi ile ilişkili gen kopya sayısında değişikliklerin ve kromozomal yeniden düzenlenimlerin meydana geldiğini göstermektedir. Özellikle 8q kromozomal bölgede kazanımlar (insersiyon) meydana gelirken; 3p, 8p, 10q, 13q ve 17p bölgelerinde kayıpların (delesyon) olduğu gösterilmiştir. Prostat intraepitelyal neoplazm (PIN) ve prostat intraepitelyal adenom (PIA) lezyonları gibi genetik değişimlerin prostat kanseriyle ilişkili olduğu ve kanser gelişimde önemli bir rol oynadığı açığa çıkarılmıştır. Ayrıca kopya sayısı değişimleri geçiren kromozomal bölgelerde NKX3.1, PTEN ve MYC gibi önemli düzenleyici genler bulunmuştur. Buna zıt olarak, tümör baskılayıcı genlerden TP53'te meydana gelen somatik nokta mutasyonları prostat kanserinde bu tür mutasyonların kopya sayısı değişimlerine göre daha seyrek görüldüğünü göstermektedir (Shen ve Abate-Shen 2010).

Ayrıca MSMB, LMTK2 (BREK), KLK2 (hK2), KLK3 (PSA), SLC22A3, NUDT10 ve NUDT11 genlerinde meydana gelen tek nükleotid polimorfizmleri (TNP veya SNP) de prostat kanseri riskiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Kommu ve ark. 2013).

Prostat kanserinde genom düzeyinde bağlantı analizleriyle farklı hastalık genlerini (HPC1, PCAP, CABP, HPC2, HPC20 ve HPCX gibi) taşıyan muhtemel gen bölgelerini tanımlamıştır. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda, prostat kanserinin agresiflik derecesiyle ilişkili 5q31-33, 7q32, 19q12 kromozom bölgeleri bulunmuştur (Reese ve ark. 2012).

Ayrıca, epigenetik değişimler prostat kanserinde oldukça yaygın olup prostat karsinogenezinde ve hastalığın gelişiminde önemli rol oynadığı ifade edilmektedir. Anormal DNA metilasyonu, bu kanser tipinde en çok çalışılan kanser ilişkili epigenetik değişimler olsa da, güncel olarak kromatin yeniden modellenmesi ve mikro RNA (miRNA) düzenlenimi değişimi üzerinde yapılan çalışmalar prostat karsinogenezinde prostat kanseri epigenomuna, epigenetik ve genetik mekanizmalar arasındaki ilişkiye daha bütünsel bir bakış açısı kazandırmıştır (Jeronimo ve ark. 2011).

Prostat kanseri hücreleri genlerinin promotor bölgelerinde genellikle gen baskılama ve neoplastik fenotipin sağlanması anlamında hipermetilasyon görülmektedir. Bu modifikasyon hormon sinyali, DNA hasar tamiri, hücre adezyonu,

hücre döngüsü kontrolü ve apoptoz gibi birçok tümör baskılayıcı gen fonksiyonlarının sessizleşmesine neden olmaktadır. Bununla birlikte hipometilasyonun da c-MYC, H-RAS gibi onkogenlerin, gizli retrotranspozonların aktivasyonuna ve kromozom stabilitesinin bozulmasına neden olarak onkogeneizde rol oynadığı düşünülmektedir (Albany *ve ark.* 2011).

miRNA'lar küçük kodlanmayan tek-iplikli RNA'lar olup hedef mRNA'ların stabilitesini ve translasyon verimliliğini etkileyerek genlerin ifadesini düzenlemektedir (Kim ve Kim 2013). Prostat kanserinde miRNA regülasyonun bozulması epigenetik yeniden programlamayı, apoptozun durmasını, hücre siklusunun teşviğini, migrasyon ve invazyonu, androjen-bağımsız büyümeyi sağlayan alternatif mekanizmayı etkilemektedir. miRNA genlerinin yaklaşık %50'si kanser-ilişkili genomik bölgelerde bulunmaktadır (Pang *ve ark.* 2010, Jeronimo *ve ark.* 2011). Lenfoma hücrelerinde birçok kanser tipinde hücre proliferasyonunu teşvik ettiği ve apoptozu baskıladığı bilinen miR-17-92 ifadesi c-MYC tarafından direkt olarak aktive edilmektedir (Coppola *ve ark.* 2010).

1.1.2. Patogeneizde Rol Oynayan Proteomik Faktörler

1.1.2.1. Prostat-spesifik Antijen (PSA)

PSA 28430 moleküler ağırlığa sahip (28, 43 kDa), 237 amino asit ve bir karbonhidrat zincirinden oluşan kalikrein protez ailesi üye enzimdir. PSA, 261 amino asitlik preproprotein şeklinde sentezlenir. Proteinin, 17 amino asitlik sinyal peptidi ve 7 amino asitlik aktivasyon peptidi olgunlaşma ve salgılanma sürecinde kesilmektedir. PSA, katalitik üçlü Asp102/His57/Ser195 bölgesine ve diğer birçok kalikreinlerden farklı olarak tripsin-benzeri proteolitik spesifiklik yerine kimotripsin-benzeri substrat spesifikliği göstermektedir (Stenman *ve ark.* 1999, Tomao *ve ark.* 2014) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. PSA'nın üç boyutlu yapısı (Tomao ve ark. 2014).

PSA normal ve neoplastik prostatik dokuda çok miktarlarda sentezlenmektedir. Prostat kanserindeki ilerleyiş ile pozitif korelasyon gösteren serum PSA ifadesi klinikte kabul gören bir biyomarkır olmakla birlikte kansere özgü belirteçliğinin hassasiyeti açısından tartışmalı bir hedeftir. PSA prostat-spesifik olarak göz önüne alınsa da, düşük konsantrasyonlarda periüretal bezlerde ve meme dokusunda da sentezlenmektedir. PSA glandüler kanala salınmaktadır. Ancak prostat kanserinde prostatik epitelyum hücrelerinin yapısı ve polarizasyonu bozulduğundan PSA, ekstraselüler alana ve kan dolaşımına salınmaktadır. PSA plazmada proteaz inhibitörleri α -1-antikimotripsin ve α -2-makroglobulin ile kompleks oluşturur ve yalnızca %5-40'luk kısmı serbest olarak bulunur. İmmünolojik testlerde serbest PSA ve α -1-antikimotripsin'e bağlı PSA ölçülebilmektedir. Bu nedenle prostat kanseri vakalarında serumdaki PSA miktarı prostatik epitelyumdakinden 30 kat daha fazla miktarlarda tespit edilmektedir (Chiu ve ark. 2012).

1.2.1.2. Androjenler

Androjenler, prostat bezinde lümen epitel hücrelerinin proliferasyon ve farklılaşmasına etki ederek prostat gelişimi, olgunlaşması ve korunmasında önemli rol oynamaktadır (Platz ve Giovannucci 2004). Androjenler hedef prostat salgı epitellerini androjen reseptör (AR)'e bağlanarak gösterirler. Prostat bezinde testosteron (T),

serumdaki birincil androjen, 5 α -redüktaz enzimi tarafından 5 α -dihidrotestosteron (DHT)'a çevrilir. T ve DHT'nin her ikisi de AR'ye bağlanabilmektedir. Ancak DHT'nin AR'ye bağlanma ilgisi ve oluşturduğu AR kompleksinde stabilizasyonu testosterone göre oldukça fazladır (Eikenberry *ve ark.* 2010). Bağlanma gerçekleştiğinde Androjen-AR kompleksleri fosforillenip dimerize olarak nukleusa translokasyonları gerçekleştirir. Nukleusa transloke olan reseptör dimerleri, androjen cevap elementleri (AREs)'inde PSA, transmembrane proteaz serin 2 (TMPRSS2) gibi hedef genlerin promotor bölgelerine bağlanarak sağ kalım ve büyüme gibi cevapların oluşmasını sağlarlar (Tan *ve ark.* 2015).

Geleneksel olarak, prostat kanseri tedavisinde tümör gelişimini baskılamak için androjen yoksunluğu oluşturmaya çalışılır. Ancak bu yöntem prostat kanserinin ileriki safhalarında, hücrelerin androjenden bağımsız olarak büyüme ve bölünme yeteneği kazanmalarından dolayı etkinliğini kaybetmektedir (Khandrika *ve ark.* 2009).

1.1.3. Diyet ve Çevresel Faktörler

Sigara ve alkol kullanımı, yaşam tarzı, yaş, radyasyon, peptisitler ve diğer çevresel karsinojenler, bulaşıcı hastalıklar gibi etkenlerin prostat kanseri oluşumunda payı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, birçok çalışmada besinlerle ve takviye ilaçlarla kalsiyum (Ca⁺²) alımının da prostat kanseri hücrelerinin büyüme ve metastazını teşvik ederek prostat kanseri riskini arttırdığı tespit edilmiştir. Ancak, farklı çalışmalarda kalsiyumun ileri düzey prostat kanseri vakalarında ters etki gösterdiği; yalnızca düşük düzey prostat kanseri vakalarında kanser gelişimiyle pozitif ilişkili olduğu saptanmıştır (Ma ve Chapman 2009, Kristal *ve ark.* 2010). Yüksek derece pişirilen etin 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo(4,5-b)piridin (PhIP) gibi karsinojenlerin oluşmasına neden olur. Yapılan çalışmalar fazla et –özellikle işlenmiş ve fazla pişirilmiş et, tüketiminin prostat kanseri riskini arttırdığını işaret etmektedir. Ayrıca total yağ ve hayvansal yağların miktarındaki artış da prostat kanseri riskiyle pozitif korelasyon göstermektedir (Ma ve Chapman 2009).

Soya proteinleri, domates ve likopen, vitamin E, selenyum, balık yağı ve ω -3 yağ asitleri, turpgiller ve yeşil çay prostat kanserinde androjen metabolizması, hücre siklusu, mitokondriyal membrane potansiyelinin korunumu, insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF)-Akt sinyali ve oksidatif strese cevap gibi karsinojenik yollara etki ederek kemopreventif özellik gösterirler. Örneğin, domateste yüksek seviyelerde bulunan lipofilik bir karotenoid olan likopen LNCaP, DU145 ve PC3 prostat kanseri

hücre hatlarında siklin D, siklin E ve siklin-bağımlı kinazların seviyesini düşürerek mitozun durmasına neden olmaktadır (Venkateswaran ve Klotz 2010).

1.2. Prostat Kanseri Terapi Modelleri

1.2.1. Hormonal Terapi

Prostat kanseri vakalarında androjen baskılama terapisi (ADT) metastatik ve lokalize prostat kanseri vakalarında yaygınca kullanılan tedavi yöntemidir. Lokalize prostat kanserinde ADT, prostatektomi (prostat bezinin tamamının ya da bir kısmının ameliyatla çıkarılması) yönteminden sonra ikincil yöntem olarak kullanılmaktadır. ADT, prostat kanserinin ilk evrelerinde etkili olsa da, kanser hücreleri zamanla androjene dirençli hale gelebilmektedir (Hudes *ve ark.* 1995, Nomiya *ve ark.* 2013, Cetnar ve Beer 2014).

ADT’de en başlarda oral dietilstibesterol (DES) uygulaması kullanılmaktaydı. DES, androjenin etkisini nötralize etmektedir. Ancak serum seviyesinde ani testosteron yükselmesine ve cinsel işlev bozukluklarına yol açmaktadır. Takibinde löprolid (Lupron), goserelin (Zoladex) gibi lüteinleştirici hormon-salıcı hormon (LHRH) agonistleri kullanılmaya başlanmış ancak yan etkileri DES ile benzer olmuştur. Setroreliks (Setrotid), abareliks ve orgalutran (Ganireliks) gibi LHRH antagonistlerinin uygulanmaya başlamasıyla bu yan etkiler ortadan kaldırılrsa da LHRH agonistleriyle etkinliği benzemektedir.

Testosteron düşük miktarlarda adrenal bezlerden de salgılanmaktadır. Bu sebeple ADT’ye ve LHRH agonistlerine cevap vermeyen hastalarda adrenal steroidogenezi ve böylece androjen üretimini baskılayan ketokonazol düşük doz kortikosteroidlerle birlikte ikincil hormonal terapi olarak kullanılmaktadır.

Diğer bir ADT yöntemi olarak siproteron asetat gibi androjen reseptörü bloke edici steroid ajanların kullanımı libido kaybına ve karaciğerde hiperplaziye yol açabilmektedir. Bu tür yan etkiler oluşturmeyen flutamid, bikatulamid ve nilutamid gibi steroid olmayan anti-androjenler ise serum testosteronunda artışa neden olmaktadır. Bu anti-androjenlerin LHRH agonistleriyle kombine kullanımı bu türden yan etkilerin azalmasını sağlamaktadır (Denmeade ve Isaacs 2002).

1.2.2. Kemoterapi

Birçok hasta ADT'ye ilk aşamada cevap verse de prostat kanseri zamanla androjen-bağımsız gelişim göstermektedir. Hormona dirençli prostat kanseri (HDPK) oluşumu yeni ve daha spesifik hedeflere yönelik terapi modellerinin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır.

HDPK'de birincil terapide altın standart olan, taksan ailesine üye anti-kanser ajanlardan biri olan dositaksel (Taxotere) mikrotübül oluşumunu baskılayarak, hücre siklusunu durdurarak ve Bcl-2'nin fosforilasyonunu sağlayarak apoptozu indükler.

Dositaksele cevap vermeyen hasta gruplarında ise ikincil kemoterapi olarak ikinci-jenerasyon Tubulin inhibitörü kabazitaksel (Jevtana) ve abirateron asetat kullanılmaktadır. Her iki ilacın da faz III denemelerinde genel sağ kalımı arttırdığı gösterilmiş, bu ilaçlar Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'daki sağlık otoriteleri tarafından onaylanmıştır. Daha güncel olarak, oral AR-sinyal inhibitörü olan enzalutamid (Xtandi)'in dositaksele cevap vermeyen HDPK hastalarında kullanımı Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır (Saad ve Miller 2014).

Kemoterapötik ilaçlarla birlikte radyoterapi uygulaması, radyasyon verimliliğini arttırarak yüksek riskli prostat kanseri hastalarında genel sağ kalımı arttırabilmektedir (Gomez-Millan *ve ark.* 2015).

1.2.3. Radyoterapi

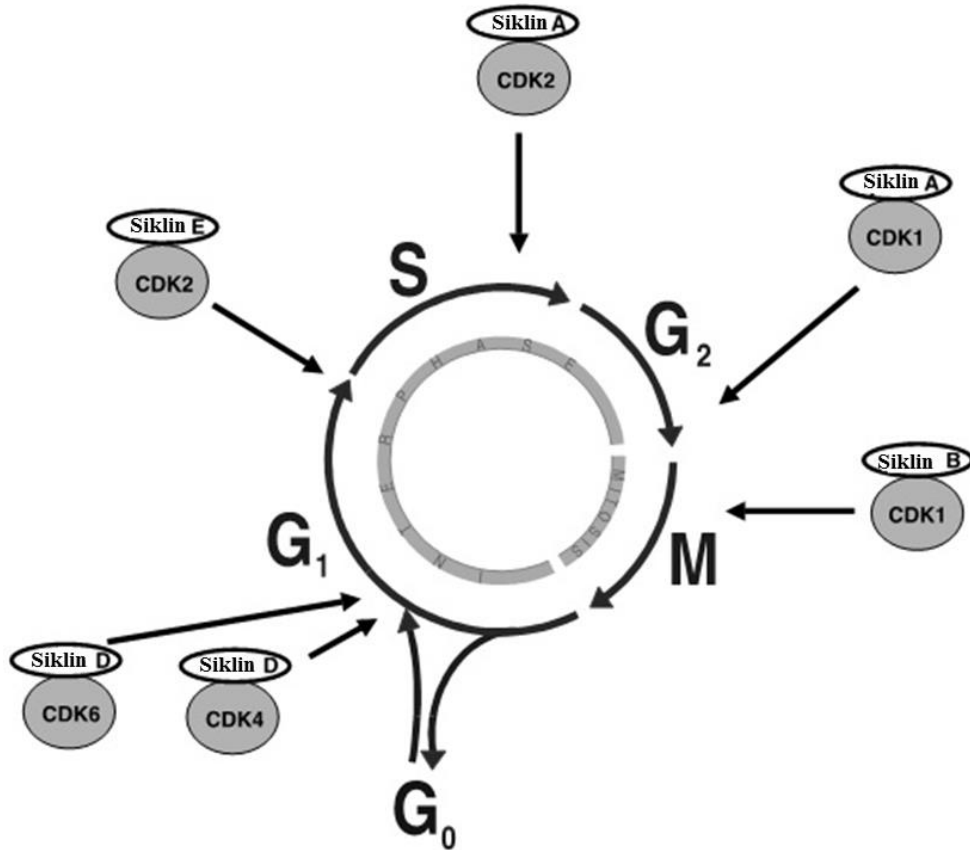
Prostat kanseri tedavisinde eksternal parçacık radyoterapisi (EPT) ve brakiterapi yöntemleri kullanılmaktadır. EPT yöntemi yüksek enerjili x-ray ışınlarının veya proton parçacıklarının dışardan tümör bölgesine verilmesiyle gerçekleştirilir. Bu yöntemde tümör dokularının lokasyonunun iyi tespit edilip normal dokularda iritasyona yol açmayacak şekilde uygulamanın planlanması önemlidir. Brakiterapi yöntemi ise radyoaktif materyallerin prostat dokusunun içine uygulanmasıyla gerçekleştirilir.

Son yapılan bazı çalışmalarda radyoterapinin ADT ile kombine uygulaması prostat kanserinin nüksetme aralığını uzattığı ve hastalarda sağ kalımı arttırdığı gösterilmiştir (Nomiya *ve ark.* 2013).

1.3. Prostat Kanseri Oluşumu ve Tedavisinde Temel Moleküler Mekanizmalar

1.3.1. Hücre Döngüsü

Hücre bölünmesi, DNA replikasyonu ve replike olmuş kromozomların iki ayrı hücreye ayrılması ile birbirini izleyen iki süreçten oluşmaktadır. Aslında hücre bölünmesi mitoz –nükleer bölünme süreci, ve interfaz evresi –iki mitoz fazı arasındaki ara faz, olarak iki aşamaya bölünmektedir. Mitoz evresi profaz, metafaz, anafaz ve telofaz aşamalarını içerirken; interfaz evresi de G₁, S, ve G₂ fazlarından oluşmaktadır (Şekil 1.4). DNA replikasyonu interfazın S fazında gerçekleşmektedir. G₁ aralığında, S fazı öncesi hücrede DNA sentezi için gerekli değişiklikler meydana gelir ve takibinde hücreyi mitoz hazırlayan G₂ aralığına girilir. G₁, S, G₂ ve M fazları standart hücre döngüsü aşamalarını oluşturmaktadır. G₁ aralığındaki hücreler anti-mitojenik sinyaller ya da doğru mitojenik sinyallerin yokluğunda, DNA replikasyonundan önce büyüme ve proliferasyonun durduğu dinlenme evresi G₀'a girebilmektedir (Vermeulen *ve ark.* 2003, Chen *ve ark.* 2008).



Şekil 1.4. Hücre döngüsü fazları ve düzenleyici CDK/siklin komplekslerinin hücre döngüsündeki etkinlik noktaları (Vermeulen *ve ark.* 2003).

1.3.1.1. Sikline bağılı kinazlar (CDKlar)

Hücre döngüsü fazları arasındaki farklı hücresel proteinler tarafından düzenlenmektedir. Serin/treonin protein kinaz ailesine üye siklin-bağımlı kinazlar (CDK) hücre döngüsünün belirli noktalarında (checkpoints) aktive olan anahtar düzenleyici proteinlerdir. Şimdiye kadar dokuz CDK tanımlanmış olup, bunlardan beş tanesi hücre döngüsü boyunca aktiftir. Örneğin; G1 fazında CDK4, CDK6 ve CDK2, S fazında CDK2, M fazında ise CDK1 aktive olmaktadır. CDK aktive olduğunda bazı downstream proteinleri fosforile etmektedir. CDK7, siklin H ile birlikte CDK aktive edici kinaz olarak davranır. CDK protein seviyeleri hücre döngüsü boyunca sabit kalırken, siklinlerin seviyeleri artıp azalarak CDK'ları periyodik olarak aktive eder. Farklı siklinler, hücre döngüsünün farklı fazlarında görev alırlar (Vermeulen *ve ark.* 2003) (Şekil 1.4).

Kanser, genellikle hücre bölünmesini kontrol eden mekanizmada meydana gelen bozulmayla ilişkilidir. Birçok kanser tipinde, özellikle G1/S fazı geçişinde kontrol mekanizmasında değişimler görülmektedir (Mohamed *ve ark.* 2013). Hücre içi ve hücre dışı proliferasyon inhibe edici sinyallerdeki bozukluklar hücre döngüsü kontrolünün kaybı ve kanserleşmeyle sonuçlanmaktadır (Nakayama *ve Nakayama* 2006).

1.3.1.2. Siklinler

Siklin D1 CDK4 ve CDK6 ile ilişkiye girerek retinoblastoma protein (pRB)'i fosforilleyip inaktive eder ve böylece proliferasyon-ilişkili E2F hedef genlerinin ifadesini sağlar. Siklin D1'in hücre döngüsüne pRB-bağımlı etkisinin yanısıra, siklin D1 hücresel migrasyonda, DNA hasar cevabında ve tamirinde, ve kromozom stabilitesinde rol oynamaktadır (Casimiro *ve ark.* 2012).

Filamin A ve Ral GEF Rgl2¹³ gibi proteinler siklin D1-CDK4 kompleksi tarafından fosforile olarak hücre motilitesinin artmasına neden olmaktadır. . Siklin D1^{K112E} mutantları CDK4 ve CDK6'yı aktive edememekte ve hücre migrasyonunun azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca siklin D1'in p27^{Kip1}'e bağlanması hücre migrasyonuna katkı sağlamaktadır (Jaffe *ve Hall* 2005, Villalonga *ve ark.* 2006, Satyanarayana *ve Kaldis* 2009). Siklin D1'in CDK4/CDK6'dan bağımsız olarak p27^{Kip1}'e bağlanması ve böylece Rho GTPaz'ını aktive etmesinin yanında ROCKII ve trombospondin 1 (TSP-1) transkripsiyonunu arttırmaktadır (Villalonga *ve ark.* 2006,

Chen *ve ark.* 2008). Siklin D1'in kanser hücrelerinde devamlı amplifikasyonu ve fazla anlatımı; mitojenik büyüme faktörleri, sitokinler, ekstraselüler matriks proteinleri (ESM) ve bazı genler tarafından ifadesinin artışı, Rho/ROCK sinyali ve TSP-1 ifadesini kontrol ederek kanser hücrelerinde invazyon ve metastazda önemli bir rol oynadığını işaret etmektedir. Siklin D1^{K112E} mutantları CDK4 ve CDK6'yı aktive edememekte ve hücre migrasyonunun azalmasına neden olmaktadır (Croft ve Olson 2006, Li *ve ark.* 2006, Casimiro *ve ark.* 2012).

Siklin A2'nin, hücre döngüsünde DNA replikasyonu sırasında CDK2'yi aktive etmesi ve G₂-M geçişinde CDK1'i aktive etmesi bakımından iki önemli rolü bulunmaktadır. Son yapılan çalışmalarda, siklin A2'nin aynı zamanda CDK'den bağımsız olarak sitoskeletal organizasyonu ve hücre migrasyonu düzenlediği gösterilmiştir. Siklin A2 ifadesinin azalması hücrede aktin filament dağılımının değişimine ve hücre migrasyonunun artmasına neden olur. Siklin A2, bir aktin düzenleyici olan RhoA'yla interaksiyona girerek hücre migrasyonunun azalmasına yol açar. Metastatik kanser hücrelerindeki siklin A2 ifadesi invaziv olmayan kanser hücrelerindeki kadar azdır (Provenzano ve Keely 2011)(Bach *ve ark.* 2005, Casimiro *ve ark.* 2012, Li *ve ark.* 2014).

Siklin E'nin CDK'den bağımsız olarak kromozomal instabilitede rol oynadığı düşünülmektedir. Siklin E indüksiyonu, sıçan fibroblastlarında ve insan epitel hücrelerinde anöploidide neden olmaktadır. Ayrıca birincil insan hücrelerinde düzensiz siklin E ifadesi ve yetersiz p53 anlatımı genetik instabiliteye yol açmaktadır. Fare akciğer modelinde, degradasyon-dirençli siklin E'nin yüksek anlatımı, servikal intraepitelyal neoplazi (SİN) sergileyen akciğerde dizplaziye, multipl akciğer adenokarsinoma ve tümörlere neden olduğu saptanmıştır (Hwang ve Clurman 2005).

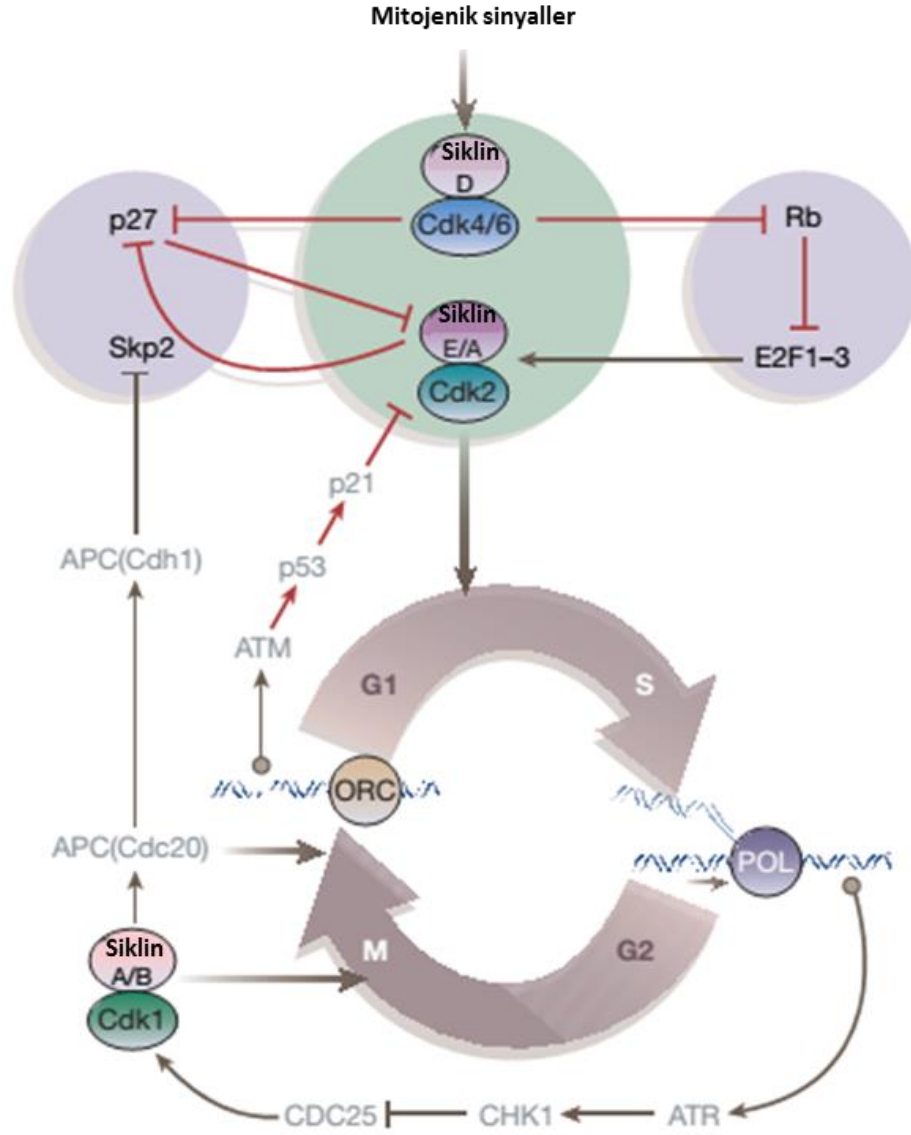
Siklin B1'in fazla ifadesinin arttığı kolorektal kanser, küçük olmayan akciğer kanseri, baş ve boyun skuamöz hücre karsinom gibi çeşitli insan tümörlerinde rapor edilmiştir. Buna ek olarak, siklin B1 fazla anlatımının anöploidide ve yüksek hücre proliferasyonu ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Song *ve ark.* 2008, Satyanarayana ve Kaldis 2009).

1.3.1.3. Doğal CDK inhibitörleri

CDK inhibitörleri (CKİ) INK4 ailesi ve WAF/KIP ailesi üyelerinden oluşmaktadır. INK4A (p16), INK4B (p15), INK4C (p18) ve INK4D (p19) CDK4 ve CDK6'ya bağlanarak bu kinazları inhibe ederken; WAF1 (p21), KIP1 (p27) ve KIP2 (p57) ise G₁/S CDK'leriyle heterotrimerik kompleks oluşturularak CDK'lerin inhibisyonunu sağlarlar (Malumbres ve Barbacid 2001)(Elmore 2007, Lim ve Kaldis 2013).

p16 geninin tümörlerin birçoğunda değişikliğe uğradığı ve delesyon, nokta mutasyonu ve hipermetilasyon gibi farklı mekanizmalarla inaktive olduğu gösterilmiştir. p16 geninde değişim gerçekleşen hücrelerde G₁ fazı geçişinin kontrolü sağlanamamaktadır. p16 proteini CDK-siklin D kompleksinin spesifik inhibitörü olup, pRB proteinin fosforilasyonunu engeller ve hücre döngüsünü G₁ fazında durdurur. p19, p53 stabilizasyonunu düzenlemektedir ve mutant p19, p53'ün düzensiz anlatımına neden olmaktadır. Bütün insan kanser hücrelerinde, yukarıda bahsi geçen bütün düzenleyicilerden en az birinin anlatımında değişiklik olduğu gösterilmiştir (Tannoch *ve ark.* 2000, Vermeulen *ve ark.* 2003).

Hücre proliferasyonuna aracılık eden Ras, MYC veya E2F sinyal yollarının aktivasyonu DNA hasar cevabını indükler. Bu nedenle, tümör hücrelerinde DNA hasar-cevap belirteçleri olarak ATM, CHK1 ve CHK2 kinazlarının; fosforillenmiş histon H2AX ve p53 proteinlerinin sürekli aktivasyonu görülmektedir. Kanser dokularında DNA hasar cevabı, erken pre-invaziv dönemde en yüksek seviyeye ulaşır. Temelde, ATM-CHK2-p53 düzenleyici yolağındaki spesifik mutasyonlar DNA hasar cevabının bozulmasına neden olur. p53-p21'in transkripsiyonel aktivatörü, yokluğunda CDK inhibitörü p21 ifadesinin azalması CDK'lerin fazla aktif olmasına yol açar. Ayrıca, CDK'lerin inhibitör bölgelerinin fosforilasyonunu kaldıran Cdc25 fosfatazın aktivasyonu da CDK'lerin hiper-aktivasyonuna sebep olmaktadır. Böylece hasarlı DNA varlığında hücre döngüsü devam ederek genomik instabilite meydana gelmiş olur. p21 ve bununla birlikte p27 yokluğu da, CDK1 aktivitesinin kontrol edilemediğinden malign tümörlerin oluşumuna katkı sağlamaktadır (Massague 2004)(Bloom ve Pagano 2003, Fan *ve ark.* 2005, Malumbres ve Barbacid 2009) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Doğal CDK inhibitörleri ve hücre döngüsünü düzenleyici yolların interaksiyonu (Massague 2004).

1.3.2. Hücre Döngüsünü Durdurmaya Yönelik Stratejiler

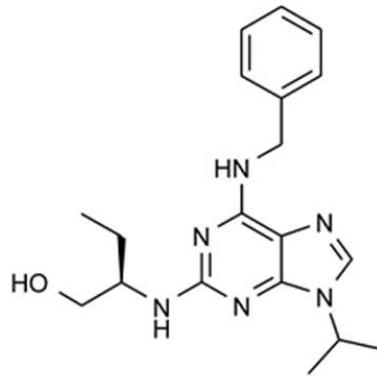
CDK'lerin hücre döngüsünde ve onun kontrol noktalarında oynadığı merkezi rol ve birçok kanser tipinde genetik ve epigenetik faktörlerin etkisiyle fazla anlatımlarının olması, hücre döngüsünü durdurmada CDK'leri birincil hedef haline getirmektedir (Park ve Lee 2003, Lapenna ve Giordano 2009, Satyanarayana ve Kaldis 2009).

CDK aktivitesine müdahalede direkt olmayan strateji –CDK aktivitesini düzenleyen proteinlerin hedeflenmesi, ve direkt strateji –CDK'lerin katalitik aktivitesinin inhibe edilmesi, olmak üzere iyi yaklaşım bulunmaktadır. Direkt olmayan strateji CKI'lerin fazla anlatımının sağlanması, CKI'leri taklit eden peptidlerin sentezlenmesi, siklin seviyesinin düşürülmesi, proteazomal mekanizmanın düzenlenmesi, CDK fosforilasyon durumunun ve onu düzenleyen enzimlerin modülasyonunu kapsarken; direkt strateji ATP'nin CDK'ya bağlanmasının yarışmalı olarak inhibisyonunu kapsamaktadır (Vermeulen ve ark. 2003).

1.3.2.1. Purin analogları roscovitine ve purvalanol

2,6,9-üçkonumlu purinler ilk kullanılan düşük moleküler ağırlıklı CDK inhibitörleri arasındadır. CDK inhibitörlerinin purin grubundan roscovitine ve purvalanol CDK1, 2, 4, 7 ve 9'un ATP bağlanma bölgelerine yarışmalı olarak bağlanarak bu kinazları inhibe etmektedir (Goodyear ve Sharma 2007).

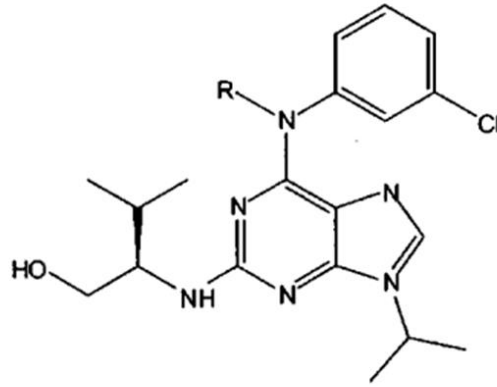
Roscovitine (CYC202, Selisiklib, Şekil 1.6) seçici olarak CDK2/siklin E, CDK1/siklin B, CDK5, CDK7/siklin H, CDK9/siklin T1'i ve ayrıca RNA polimeraz II-bağımlı transkripsiyonu inhibe eder (Yin ve ark. 2015). Roscovitine akciğer, meme ve nazofaringeal kanserinde faz 2; glomerulonefritte ise faz 1 klinik deneme safhasına ulaşmıştır (Bach ve ark. 2005, Bettayeb ve ark. 2008).



Roscovitine

Şekil 1.6. Roscovitine'in kimyasal yapısı (Doleckova ve ark. 2013).

Purvalanol, pürin türevi spesifik bir Cdk inhibitörü olup Cdk 1 ve 2'yi inhibe ederken diğer bir pürin CDK inhibitörü olomisine göre 1000 kat daha etkili bir ajandır (Şekil 1.7). Yapılan *in vitro* çalışmalarda Purvalanol hücre büyümesini azaltmakta ve G2/M'de hücre siklusunun durmasına neden olmaktadır. Bu durum, Cdk 1 inhibisyonu ve p42/p44 mitojen aktive protein kinazın (MAPK) inhibisyonu sonucunda meydana gelmektedir. Daha önce yapılan çalışmalara göre Purvalanol, kaspaz aktivasyonunu tetiklememekte, ancak doza bağlı olarak apoptotik mekanizmayı aktive etmektedir. (Dai 2003).



Purvalanol A

Şekil 1.7. Purvalanolün kimyasal yapısı (Knockaert ve ark. 2002).

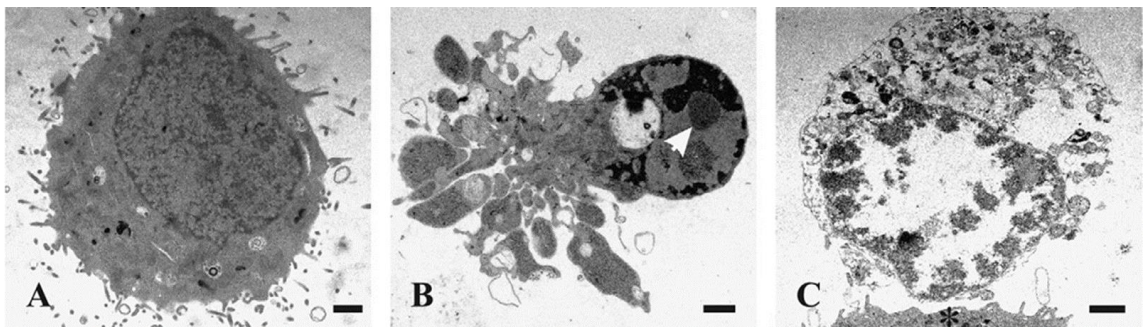
1.3.3. Hücre Sağ Kalım ve Ölüm Kararı

1.3.3.1. Programlı hücre ölümü, Apoptoz

Apoptoz terimi ilk defa 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından çıkarılan bir makalede kullanılmıştır ve bu terim bir diğer hücre ölümü şekli olan nekrozdan patolojik ve fizyolojik farklılığını belirtmektedir (Şekil 1.8). A-poe-to-sis (apoptoz) yunancada ağaçtan düşen yaprak veya çiçekten ayrılan petal anlamına gelmektedir (Watson 2006, Elmore 2007, Duiker ve ark. 2010, Hongmei 2012). Fizyolojik “programlı” hücre ölümü olarak apoptoz normal doku gelişimi ve morfogenezinde görülebildiği gibi, radyasyon, hipertermi, kalsiyum girişi, glukokortikoidler, sitotoksik ajanlar ve enfeksiyon gibi hücrel stres ve hasara yol açan durumlar tarafından da tetiklenebilmektedir. Nekrozda inflamatuvar cevap oluşurken, apoptozda bu cevap oluşmaz. Apoptoz TNF α (tümör nekroz faktör- α), Fas (CD95/APO1) ve TRAIL (TNF ilişkili apoptoz indükleyici ligand) gibi hücre yüzeyi ölüm reseptörleri üzerinden hücre dışı sinyallerden tetiklenebildiği gibi; hücre içi mitokondriyal yolak tarafından da tetiklenebilmektedir. Her iki durumda da sistein aspartil proteazları – kaspazlar, aktive olur ve sonuç olarak hücreyi yıkıma götüren mitokondriyal membran permeabilizasyonu, kromatin kondenzasyonu ve DNA

fragmentasyonu olayları meydana gelir. Bu süreçler hücre yuvarlaklaşması, nükleus fragmentasyonu, “apoptotik body” denen sitoplazma ve bozulmamış organelleri içeren vesiküllerin oluşumuna neden olarak hücreyi morfolojik olarak karakteristik bir değişime sokar (Fan *ve ark.* 2005, Nikolettou *ve ark.* 2013) (Şekil 1.8).

Ekstrinsik yolak, ekstraselüler ölüm ligandlarını belirli ölüm reseptörleri (DR) aracılığıyla hücrelerin apoptotik cevap oluşturmasını sağlar. TNF protein ailesine üye TNF α , FasL ve TRAIL en iyi tanımlanmış ölüm ligandları olup bu liganlar, ağırlıklı olarak T hücreleri, doğal katil (DK) hücreler, doğal katil T (DKT) hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından sentezlenir. Ligandlar ölüm reseptörlerine bağlandığında, reseptörler konformasyonel değişikliğe uğrayarak oligomerize olur. Bu oligomerizasyon sayesinde adaptör proteinleri Fas-ilişkili ölüm motifli protein (FADD) ve TNF reseptör-ilişkili ölüm motifli protein (TRADD), reseptörün ölüm motifine bağlanır. Böylece prokaspaz 8 ve 10 gibi düşük enzimatik aktiviteye sahip kaspazlar adaptör proteinlerin ölüm motiflerine toplanırlar ve kendi proteolitik kesimlerini gerçekleştirerek aktif öncü kaspazlar haline dönüşürler (Wang ve El-Deiry 2003, Sayers 2011). Ölüm liganları, reseptörleri, adaptör proteinleri ve öncü kaspazların oluşturduğu yapıya ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) denilmektedir. Bu kaspazlar, kaspaz kaskadı reaksiyonunu başlatarak efektör kaspazları (kaspaz 3, 6 ve 7)’ni aktive eder ve süreç apoptozla sonuçlanır. Bu süreç c-Flip tarafından ihhibe edilebilmektedir. c-Flip FADD’nin ölüm motifine bağlanarak kaspaz 8’in katılımını ve aktivasyonunu engeller (Song *ve ark.* 2003, Chaudhari *ve ark.* 2006) (Şekil 1.9).

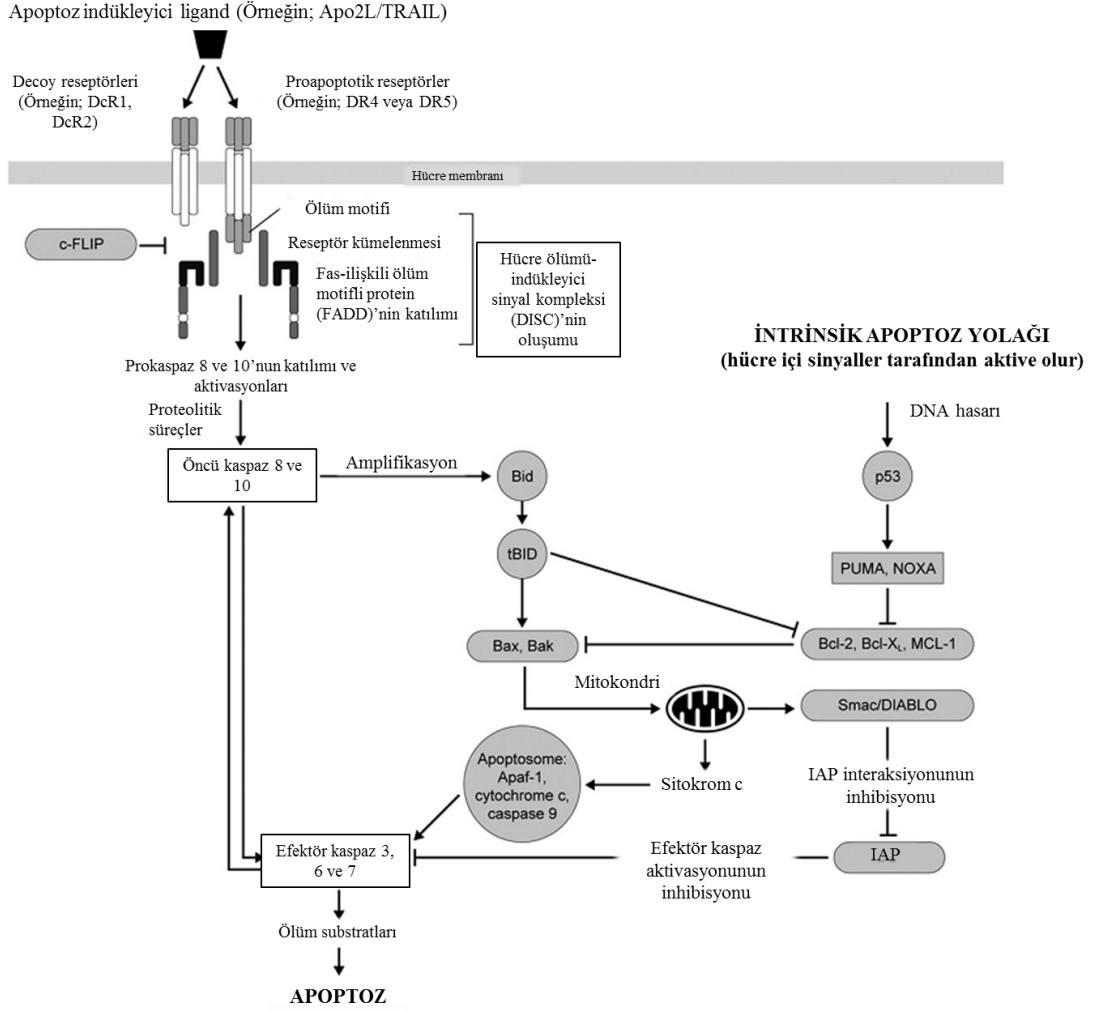


Şekil 1.8. Apoptotik hücre ile nekrotik hücrenin morfolojik olarak farkı. A, sağlıklı hücre; B, apoptotik hücre; C, nekrotik hücre (Krysko *ve ark.* 2008).

İntrinsik yolak, DNA hasarı ve oksidatif stres gibi faktörlere bağlı olarak mitokondri dış membranında lokalize Bcl-2 ailesi proteinleri üzerinden aktiflenir. Bcl-2 protein ailesi pro- ve anti-apoptotik proteinleri içerirler. Yaklaşık 20 üyesi bulunan bu protein ailesinde proteinler en az bir Bcl-2 homoloji (BH) motifi içerir (Yan ve Shi 2005)(Yan ve Shi 2005)(Yan ve Shi 2005). Pro-apoptotik proteinler yalnızca BH3

motifini paylaşırlar. BH3 proteinleri pro-apoptotik moleküllerin aktivasyonunu indükleyerek ya da anti-apoptotik proteinlere bağlanıp onları inhibe ederek fonksiyon gösterirler. Bid ve Bim BH3 proteinleri Bax ve Bak proteinlerinin aktivasyonunu ve böylece bu proteinlerin sitoplazmadan mitokondrinin dış membranına translokasyonunu indüklerler. Bax ve Bak proteinleri burada porlar oluşturur ve mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu (MDMP)'na neden olur (Youle ve Karbowski 2005)(Lalier *ve ark.* 2007). Bunu takiben mitokondriden sitokrom c, prokaspaz 9 ve Smac/DIABLO sitoplazmaya salınır. Sitozolda sitokrom c ve prokaspaz 9 Apaf-1 adaptör proteinine bağlanarak apoptozom kompleksini oluştururlar. Apoptozomda prokaspaz 9 aktif formu olan kaspaz 9'a dönüşerek kaspaz kaskadını başlatır ve kaspaz 3, 6 ve 7 efektör kaspazlarının aktivasyonu sonucunda apoptoz meydana gelir. Buna ek olarak, sitozole salınan Smac/DIABLO, anti-apoptotik protein apoptoz proteinleri inhibitör (IAP)'lerinden X-kromozuma bağlı apoptoz protein inhibitörü (XIAP) ile interaksyona girer. Bu sayede XIAP kaspaz 9, 3 ve 7'yi inhibe edemez ve apoptoz gerçekleşir (Cillessen *ve ark.* 2007, Brenner ve Mak 2009, Sayers 2011) (Şekil 9).

EKSTRİNSİK APOPTOZ YOLAĞI
(transmembran reseptörler üzerinden aktive olur)



Şekil 1.9. Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz sinyal yolları (Ashkenazi 2008).

Kanser hücrelerinde ekstrinsik yolak üzerinden indüklenen hücre ölümüne karşı farklı mekanizmalarla direnç oluşmaktadır. Ölüm reseptörü ligasyonu ile tetiklenen hücre ölümü başlıca olarak, anti-apoptotik proteinlerin anlatımlarının artmasıyla ya da pro-apoptotik proteinlerin ifadesinin azalması ya da yetersiz kalmasıyla inhibe olur. Örneğin; ilaca dirençli lösemi ve nöroblastomda CD95 anlatımında güçlü bir düşüş görülmektedir. Bununla birlikte TRAIL reseptörlerinin hücre membranına taşınmasındaki eksiklik kolon kanseri hücrelerinde tespit edilmiş; çeşitli hematolojik malignansilerde ise CD95 geninde mutasyonlar olduğu gösterilmiştir (Fulda ve Debatin 2006, Duiker *ve ark.* 2010).

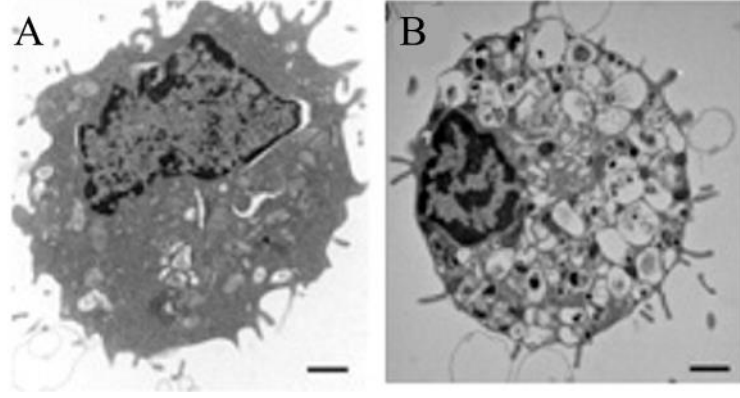
Apoptoz düzenlenimindeki bozukluklar kanser başlangıcı, gelişimi ve metastaz gibi onkogenез süreciyle bağlantılıdır. Hücre büyümesine yol açmayıp, farklı stres koşullarında hücre ölümünü engellemesinden dolayı Bcl-2 anti-apoptotik proteini atipikal onkogen olarak tanımlanmıştır. Foliküler lenfoma vakalarının %85'inde *bcl-2*

onkogeninin immüoglobulin ağır zincir gen lokusuna kromozomal translokasyonunun meydana geldiği tespit edilmiştir. Apoptoza karşı direncin artmasının farklı mekanizmalarla geliştiği birçok farklı kanser hücrelerinde gösterilmiştir. Somatik mutasyonlardan ve transkripsiyonel ya da post-transkripsiyonel düzenlemedeki anormalliklerden dolayı pro-apoptotik protein Bax ifadesinde ve ölüm reseptörlerinden gelen sinyaldeki azalma bu direnci oluşturan nedenlerdendir. Ancak, anti-apoptotik protein ifadelerinin artması, apoptozdan kaçışta en sık görülen durumdur (Portt *ve ark.* 2011).

Bcl-2 ailesi proteinlerinin yanı sıra, Apaf-1 aktivitesinin düşüşü de yumurtalık kanseri, melanom ve lösemi hastalıklarında tespit edilmiştir. Buna ek olarak, kanser vakalarında en sık görülen p53 mutasyonu intrinsik yolağı etkilemektedir. p53 aktivasyonu Puma, Noxa ve Bid gibi pro-apoptotik proteinlerin ifadesini artırır. Bu nedenle p53 stabilizasyonu mitokondriyal ölüm yolağının aktivasyonu için gereklidir. p53 aynı zamanda mitokondride Bcl-2 ve Bcl-xL anti-apoptotik proteinlerine bağlanarak mitokondriyal membran stabilizasyonunun bozulmasına neden olabilmektedir (Mustika *ve ark.* 2005, Fulda ve Debatin 2006).

1.3.3.2. Otofaji

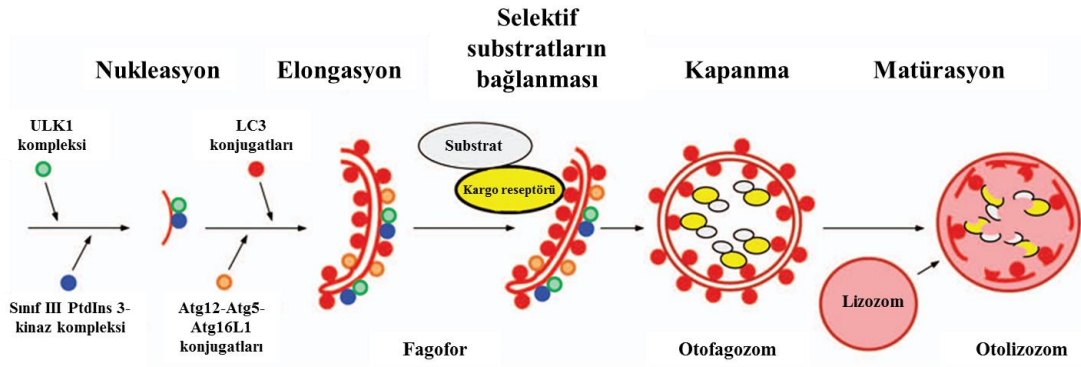
Otofaji ilk defa 1963 yılında Christian de Duve tarafından kullanılmıştır. “Otofaji” Yunancada “kendini-yeme” anlamına gelmektedir. Evrimsel olarak korunmuş bu sağ kalım yolağı besin eksikliği veya metabolik stres koşulları altında sitoplazmik bileşenlerin degradasyonu, ATP geri dönüşümü ve hücresel biyosentezin korunmasında rol oynamaktadır. Otofaji besin yetersizliği, hipoksi ve aktif onkogenler tarafından tetiklenebilmektedir. Ayrıca bu yolağın ikili rolü bulunmaktadır; hücresel bileşenlerin sindirimi sonucu hücre ölümü ve metabolik stres altındaki kanser hücrelerinin sağ kalımını sağlama ve radyoterapi ve kemoterapiye karşı direnç oluşturma (Pavlides *ve ark.* 2012) (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. Otofajik hücre morfolojisi. A, sağlıklı hücre; B, otofajik hücre (Nikoletopoulou ve ark. 2013).

Otofaji, hasarlı organellerin veya hücrel atıkların otofagozomlar tarafından çevrelenip bu otofagozomların içeriklerini degrade etmek üzere lizozomlarla birleşmesi süreçlerini kapsamaktadır. Otofaji, ULK1, Atg13 ve Atg17 proteinlerinden oluşan ULK1 (insan ATG1 homoloğu) kompleksinin mTORC1 (memeli rapamycin hedefi 1) kompleksi stres sinyalleri ile birleşmesiyle başlar (Chan 2009). mTORC1 kinaz aktivitesi inhibe edildiğinde otofagozom oluşumu meydana gelir. Bu olay Vsp34, PI3K (sınıf 3 fosfoinositid 3-kinaz) ve Beclin 1'in kompleks oluşturmasını kapsamaktadır (Funderburk ve ark. 2010). Beclin 1/Vsp34 tarafından PtIns3P'nin oluşumu, otofagozom oluşumunda görevli diğer Atg (otofaji-ilişkili gen) ürünlerinin sentezi için gereklidir. Başlangıç fazında Atg5-Atg12-Atg16 kompleksinin oluşması LC3-I (sitolik-ilişkili protein hafif zincir 3)'in membrana bağlanan lipid eklenmiş hali LC3-II'ye dönüşmesini sağlar. LC3, fosfatidiletanolamine konjuge olarak ve Atg7- ve Atg3-bağımlı aktivasyon ile otofagozom membranı ile birleşerek sistein proteaz Atg4 tarafından LC3 kesilimini, takip eden kaskadına transfer olur. Otofagozom oluşumu tamamlandığında, LC3-II lümenal membrana bağlı kalırken, Atg proteinleri sitozole geri döner. Olgunlaşmış otofagozomun lizozom ile füzyonu gerçekleşene kadar LC3-II otofagozom membranında kalır ve otofaji gözlemlerinde genellikle LC3-II'nin bu aktivitesi kullanılır (Mizushima 2007, Eskelinen ve Saftig 2009). Ayrıca LC3-II ubikuitinlenmiş protein agregasyonlarının otofajik degradasyonunu sağlayan adaptör protein p62/sekwestezom1 (SQSTM1)'e bağlanır. Normalde p62/SQSTM1 otofaji sürecinde degrade olur. Otofaji mekanizmasındaki bozukluklarda ise hücrede birikir. Son aşama, küçük RabGTPazlarına ve lizozom-ilişkili membran protein 2'ye gereksinim duyan otofagozomların, lizozomlarla birleşerek otolizozomları oluşturması ile tamamlanır (Bjorkoy ve ark. 2006)(Yang ve ark. 2011, Brundage ve ark. 2014).

Fare deneylerinde, otofajide meydana gelen bozuklukların metabolik stres, genomik hasar ve tümörögenезle ilişkili olduğu gösterilmiştir. İnsan prostat, meme ve over kanserlerinin %40-75'inde *beclin-1* geninde monoallelik kayıpların olduğu tespit edilmiştir (Yang ve ark. 2011). Bununla birlikte birçok insan kanser hücresinde görülen tümör baskılayıcı p53, PTEN, DAPk mutasyonları otofajiyi stimule ederken; sınıf I PI3K, Akt ve mTOR gibi onkogenik sinyal moleküllerinin otofajiyi baskıladığı tespit edilmiştir (Levine 2007)(Pattingre ve Levine 2006) (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. Memeli hücrelerinde otofaji aşamaları ve otofajide görev alan moleküler yapılar (Johansen ve Lamark 2014).

1.3.4. mTOR Sinyal Yolağı

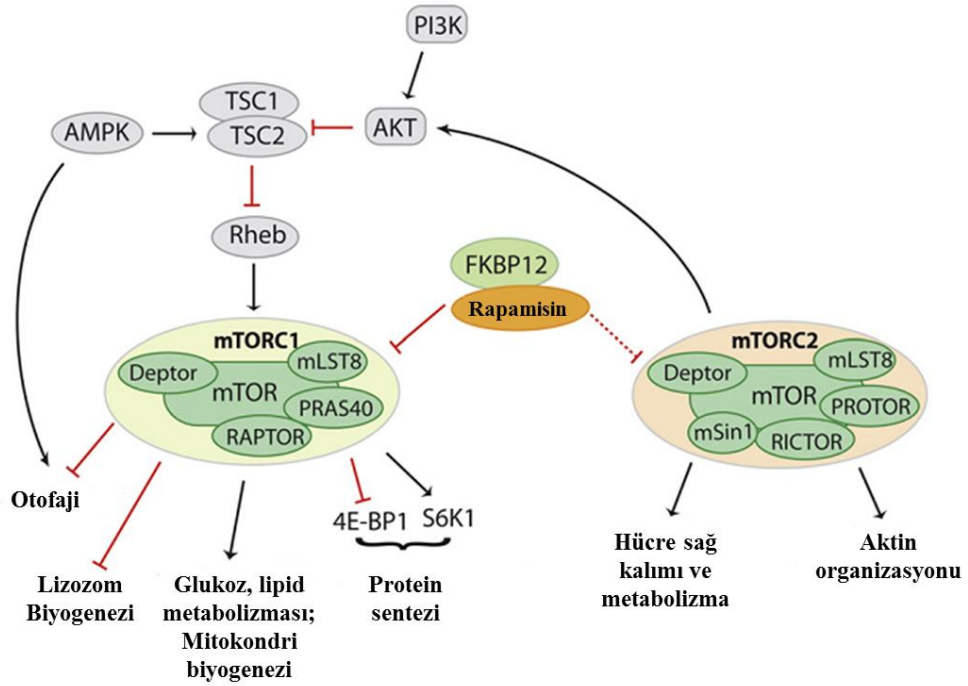
mTOR (memeli rapamycin hedefi) fosfoinositid 3-kinase-ilişkili kinaz (PIKK) ailesine bağlı, evrimsel olarak korunmuş bir serin-treonin kinazdır. mTOR sinyal yolağı birçok insan kanserlerinde sürekli aktif durumdadır (Hou ve ark. 2007). mTOR, farklı ekstraselüler ve intraselüler sinyaller tarafından uyarılan mTOR kompleks 1 (mTORC1) ve mTOR kompleks 2 (mTORC2) iki multi-moleküler sinyal kompleksi oluşturur (Şekil 1.12). mTORC1 Raptor, Deptor, mLST8 ve PRAS40 alt ünitelerini kapsarken; mTORC2 Rictor, mSIN1, Deptor, mLST8 ve Protor alt ünitelerini içerir (Zhou ve Huang 2010)(Oh ve Jacinto 2014).

mTORC1 sinyali, büyüme faktörleri, besin mevcudiyeti ve immün-düzenleyici sinyaller gibi çeşitli çevresel faktörlere cevaben hücrel büyüme ve proliferasyonu indükler. Büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer ko-stimulatör sinyaller PI3K'ün ve takibinde Akt aktivasyonunu sağlarlar. Akt, mTORC1 baskılayıcı faktör Tuberoz Skleroz Kompleks (TSC)'i inhibe eder (Ji ve Zheng 2010). Akt ayrıca, mTORC1'de inhibitör rol oynayan PRAS40'ı fosforile ederek, bu proteinin kompleksten ayrılmasını sağlar. TSC inaktivasyonu sayesinde GTP-bağlı Rheb proteini mTORC1 ile interaksiyona girer; bu sayede mTORC1, p70-S6 kinaz (S6K) ve ökaryotik başlatıcı

faktör 4E bağlayıcı protein (4E-BP)'nin fosforilasyonuna neden olarak hücre büyüme ve proliferasyonunu sağlayan protein translasyonunun indüklenmesini sağlar. mTORC2 de hücre sağ kalımı ve hücre iskeleti organizasyonunda görev almaktadır (Xu ve ark. 2012).

Anti-fungal ajan olan rapamycin 12-kDa FK506 bağlayıcı protein (FKBP12)'e bağlanarak mTORC1'i inhibe eder. Ancak rapamycin, mTORC2 inhibisyonunda aynı etkinliğe sahip değildir (Malik ve ark. 2013) (Şekil 1.12). Ayrıca bazı tümör modellerinde, rapamycinin apoptozu ya da otofajiyi indüklediği gösterilmiştir. mTOR inaktivasyonu sonucunda, S6K1 hedefi olan pro-apoptotik Bad proteini aktive olarak apoptotik cevap oluşabilmektedir. Bununla birlikte besin yetersizliği ve amino asit yoksunluğu gibi faktörler mTOR inhibisyonuna yol açarak otofaji tetiklerler (Faivre ve ark. 2006).

Rapamycin ve analoglarının klinikteki başarısı lenfoma, böbrek hücreli kanser ve TSC-ilişkili tümörlerle sınırlı kalmıştır. Bu ilaçlara terapötik direncin gelişmesinde Akt kinazı üzerinden geribesleme sinyalleri, paralel sinyal yolları ve kısıtlı ilaç hedeflenmesi rol oynamaktadır. Bu nedenle mTORC1/2 komplekslerinin veya mTOR/PI3K proteinlerinin ikili olarak hedeflenmesi gibi stratejiler kapsamında BEZ235 gibi ikinci jenerasyon ilaçlar geliştirilmiştir. Ancak BEZ235'in PI3K- veya MYC-bağımlı tümör direncine yol açtığı bildirilmiş ve bu direnç mekanizmasında, mTOR kompleksleriyle interaksiyonu olan JAK/STAT yolağının aşağı yönlü bileşenlerinden Stat3'ün rol oynadığı tespit edilmiştir (Jin ve ark. 2014).



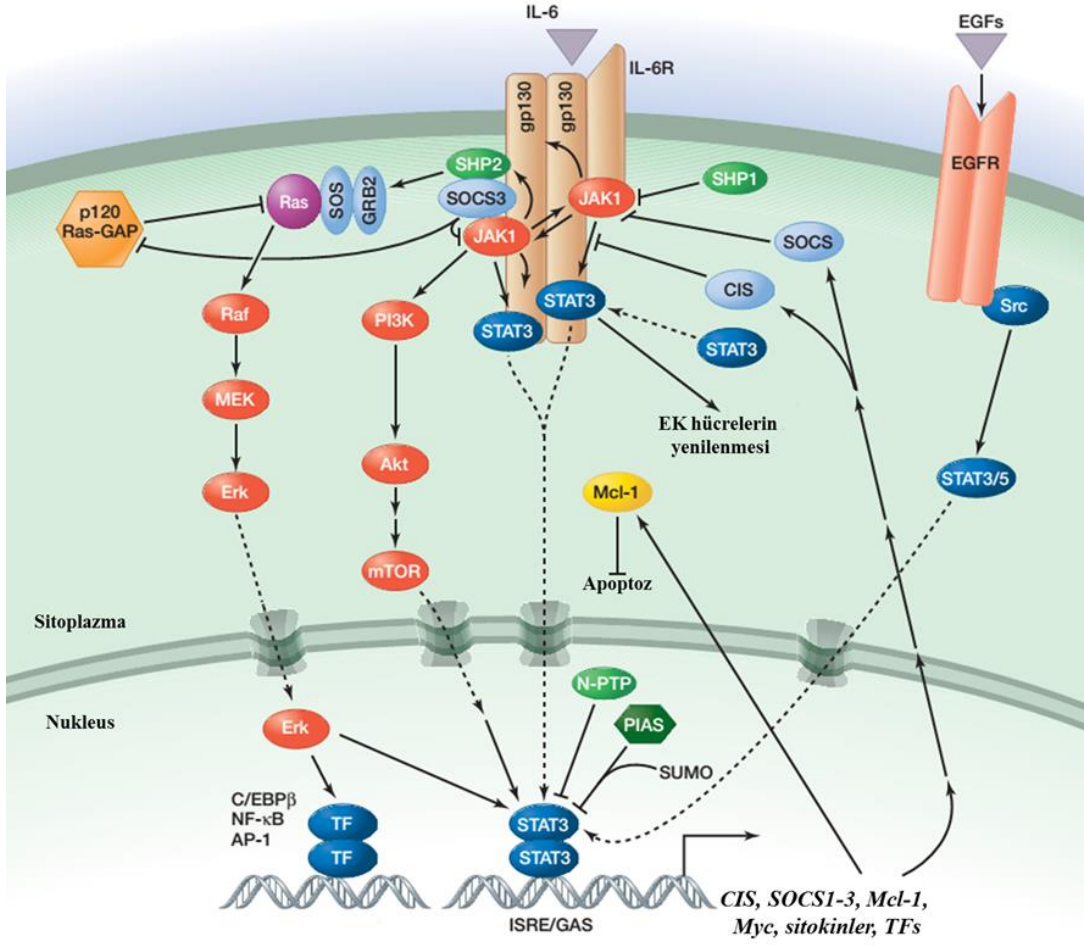
Şekil 1.12. mTOR sinyal kaskadı. mTORC1 ve mTORC2'nin yukarı ve aşağı yönünde rol oynayan elemanlar ve mTOR komplekslerinden iletilen sinyallerin yol açtığı hücresel aktiviteler gösterilmiştir. Rapamycin FKBP12'ye bağlanarak mTORC1 inhibisyonuna neden olurken, mTORC2 inhibisyonu için rapamycin dozunun ya da uygulama süresinin artırılması gerekmektedir (Xu ve ark. 2012).

1.3.5. JAK/STAT Sinyal Yolağı

Memelilerde STAT 1, 2, 3, 4, 5A, 5B ve 6 olarak 7 farklı STAT proteini vardır. Janus kinaz (JAK) ailesi ise JAK1, 2, 3 ve Tirozin kinaz 2 (Tyk2) proteinlerini kapsamaktadır. Hücrelerin interlökin-6 (IL-6) veya interferon-gamma (IFN- γ) gibi sitokinlere maruz kalmasıyla JAK ilişkili sitokin reseptörleri aktif hale geçer ve STAT'ları fosforile eder. STAT'lar homo- ya da heterodimer oluşturur ve nukleusa transloke olurlar. Burada hedef gen sekanslarına bağlanarak bu genlerin transkripsiyonunu başlatırlar (Dutta ve Li 2013). JAK/STAT sinyal yolağı, sitokinlerin varlığında hücre proliferasyonunun, sağ kalımının, farklılaşma ve immün cevabın düzenlenmesinde merkezi bir rol oynamaktadır (Vainchenker ve Constantinescu 2013). Bu sinyal yolağının onkogeneze de önemli bir rolü vardır STAT aktivasyonuna ek olarak JAK sinyalleri, mitojen-aktive protein kinaz (MAPK), PI3K ve Akt/mTOR yolaklarını da aktive etmektedir. Buna ek olarak, STAT proteinleri Src ailesi kinazları gibi diğer kinazlar tarafından da aktive edilebilmektedir. STAT3 ve STAT5 aktivasyonu lenfoid ve myeloid malignansilerde önemlidir. Klasik myeloproliferatif neoplazm (MPN)'ların %50'sinden fazlasında JAK2 geninde tekrarlayan aktive edici somatik mutasyonlar tespit edilmiştir. Ayrıca, hematolojik

malignansilerde JAK2, JAK1, JAK3 genleri ve JAK düzenleyicilerinin genlerinde değişimler saptanmıştır (Dutta ve Li 2013).

Prostat kanserinde Cdk5'in metastazı düzenlediği bilinmektedir. Son yapılan çalışmalarda Cdk5'in, STAT3'ü Ser727'den fosforile ederek STAT3 aktivasyonunu sağladığı ve protein-protein interaksyonu ile androjen reseptör (AR) aktivasyonunu teşvik ettiği gösterilmiştir (Hsu ve ark. 2013) (şekil 1.13).



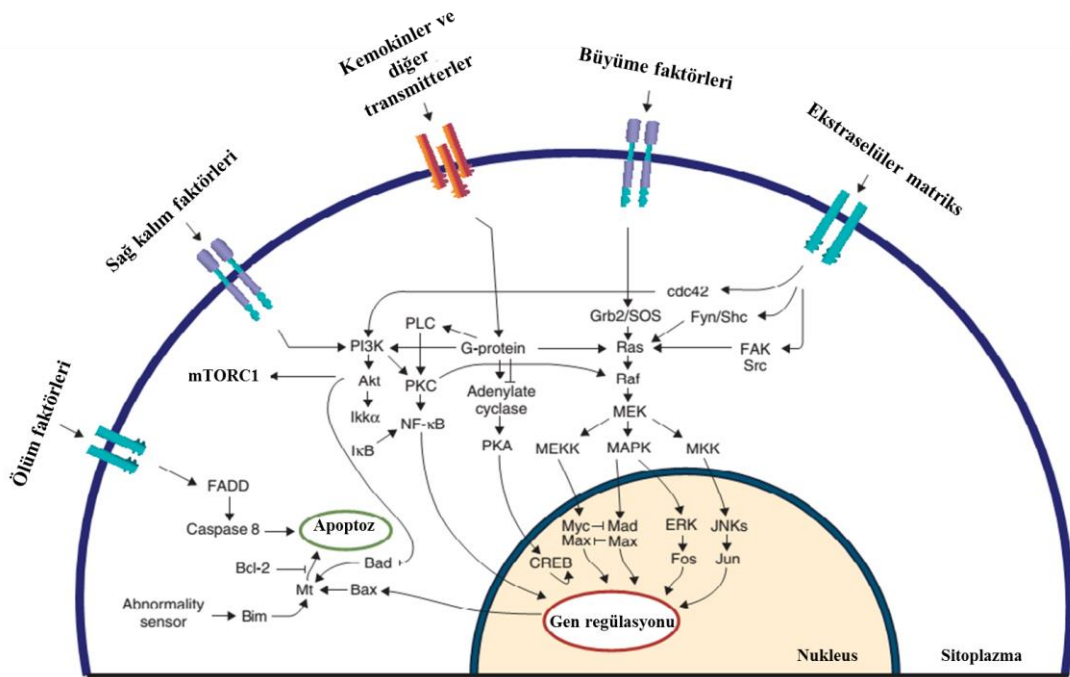
Şekil 1.13. Şematik olarak JAK/STAT sinyal yolağının sunumu (Harrison 2012).

1.3.6. MAPK Sinyal Yolağı

Mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) yolağı ekstraselüler sinyalleri büyüme, proliferasyon, farklılaşma, migrasyon ve apoptoz gibi hücrel mekanizmalar iletir (Şekil 1.14). Membran reseptörlerine (örneğin bir tirozin kinaz reseptörü olan EGFR) ligandların bağlanmasıyla reseptörün sitoplazmik bölgesinde tirozin kalıntıları fosforile olur ve adaptör protein GRB2 (büyüme faktörü reseptörü-bağlanma proteini 2) fosfotirozin kalıntılarında bu bölgelere bağlanır. Guanin nükleotid değişim faktörü SOS ise GRB2'ye bağlanarak aktif hale geçer (Gobert Gosse *ve ark.* 2005, Modi *ve ark.* 2011). Aktifleşmiş SOS Ras alt-ailesi proteinlerinden (H-Ras veya K-Ras) GDP (Guanozin difosfat) koparır. Ras bu sayede GTP bağlayıp aktif hale geçer. Ras, Raf proteini aktif hale geçirir. Raf, MEK (MAPKK) ve MAPK sırasıyla fosforile olur ve MAPK, c-Myc, 40S ribozomal protein S6 kinaz (RSK), c-Fos gibi transkripsiyon

faktörlerinin fosforilasyonunu sağlar (Dhillon *ve ark.* 2007, Junttila *ve ark.* 2008) (Şekil 14).

MAPK sinyal yolağı kanser gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır. Bu sinyal yolağı, ekstraselüler uyarana bağlı olarak PI3K/Akt/mTOR yolağı gibi büyüme ve proliferasyondan sorumlu farklı sinyal yolaklarıyla konuşmaktadır (Brundage *ve ark.* 2014) (Şekil 14). Yapılan bazı çalışmalarda prostat kanseri gelişiminde Akt/mTOR ve ERK MAPK sinyal yolaklarının regülasyonlarının koordine olarak bozulduğu tespit edilmiştir (Santarpia *ve ark.* 2012).



Şekil 1.14. MAPK sinyal kaskadı ve diğer yolaklarla interaksiyonu (Santarpia *ve ark.* 2012).

1.4. Amaç

Bu çalışmanın amacı, mTOR susturması gerçekleştirilmiş androjene bağımlı LNCaP ve androjenden bağımsız DU 145 ve PC3 prostat kanseri hücre hatlarında CDK inhibitörleri olan roscovitine ve purvalanol'ün terapötik etkilerinin hücre sağ kalım ve ölüm sinyal yolakları ile ilişkili olarak irdelenmesidir. Bu amaçla tez çalışması kapsamında, mTOR'un alt ve üst sinyal yolaklarındaki kilit moleküllerin hücre ölümü ve sağ kalımı cevaplarında oynadığı roller bu moleküllerin aktivasyon ve ifade düzeyleri üzerinden incelenmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Hücreler ve Özellikleri

LNCaP (ATCC CRL1740), birincil tümörden türevlenen iyi farklılaşmış prostat kanseri hücre hattıdır. Karakteristik biyokimyasal bir belirleyici olan, prostat spesifik antijen salgılar ve buna bağlı fonksiyonel androjen reseptörü açısından olarak androjene duyarlıdır. p53 ifadesi doğal tip olarak tanımlanmıştır.

DU 145 (ATCC HTB81), beyine metastaz yapan adenokarsinomlardan türevlenen ve kısmen farklılaşmış, hormona duyarlı ve PSA eksprese etmeyen prostat kanseri hücre hattıdır.

PC3 (ATCC CRL1435), kemiğe metastaz yapan adenokarsinomlardan türevlenen, diğer prostat kanseri hücre hatlarıyla ilgili birçok klinik vakadan farklı olarak yüksek agresif davranış gösteren p53, AR ve PSA ifadesinden yoksun bir prostat kanseri hücre hattıdır.

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Ek A'da yer almaktadır.

2.1.3. Hücre Kültürü Donanımları

Hücre kültüründe kullanılan materyaller Ek B'de yer almaktadır.

2.1.4. Kimyasal Maddeler

Çalışma kapsamında kullanılan kimyasal maddeler Ek C'de yer almaktadır.

2.1.5. Kullanılan Çözeltiler

Çalışma kapsamında kullanılan çözeltiler Ek D'de yer almaktadır.

2.1.6. Kullanılan Antikor ve siRNA

Çalışma kapsamında kullanılan antikor ve siRNA'lar Ek E'de yer almaktadır.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Hücre Kültürü

LNCaP (ATCC CRL 1740), DU 145 (ATCC HTB81) ve PC3 (ATCC CRL1435) prostat kanseri hücreleri önerilen besiyerlerinde % 5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik etüvde RPMI 1640 besiyerine % 10 fetal sığır serumu ve 100U/ml Penisilin/Streptomisin eklenmesi ile elde edilen tam besiyerinde büyütülmüşlerdir. Her 2-3 günde bir, hücre yoğunluğuna ve deneysel ihtiyaçlara bağlı olarak pasajları gerçekleştirilmiştir.

2.2.2. siRNA Yöntemi ile Gen Sessizleştirilmesi

2.2.2.1. Hücrelerin Hazırlanması

3×10^5 LNCaP, $2,5 \times 10^5$ DU 145 ve 2×10^5 PC3 hücresi 6 kuyucuklu petri kaplarına ekilerek bir gece petri kabına yapışmaları beklendikten sonra hücrelere SignalSilence® mTOR siRNA I, SignalSilence® mTOR siRNA II ve SignalSilence® Control siRNA (Florescein Conjugate), CST transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. İlgili ilaçların uygulanımları, transfeksiyon işleminden 24 saat sonra taze medyumlarda hazırlanarak 24 saatlik inkübasyonlar şeklinde gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.2. siRNA Transfeksiyonu

Lipozom Türevli Ajan Kullanılarak siRNA transfeksiyonu

İlgili hücre hatlarında lipozom türevli ajan ile transfeksiyon işlemleri Qiagen RNAiFect Transfection Reagent® ile 25, 30, 50 ve 75 nM'larda 1:6 oranında; Lipofectamine 2000, invitrogen ile 50 ve 75 nM için 1:6 oranında, XtremeGENE siRNA Transfection Reagent, Roche® ile 100 nM için 1:6 ve 1:3 oranlarında gerçekleştirilmiştir.

Elektroporasyon Yöntemi ile siRNA transfeksiyonu

LNCaP, DU145 ve PC3 hücre hatlarında elektroporasyon işlemi 250 kV, 10 ms'de 2 pulse şeklinde Micropulser™ Electroporator, Bio-Rad ile 100 nM için 1:6 oranında gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.3. siRNA Transfeksiyon Verimliliğinin Kontrolü

İlgili hücre hatlarında XtremeGENE siRNA Transfection Reagent, Roche® ile gerçekleştirilen mTOR siRNA I uygulamasının verimi floresan ışığa verebilen SignalSilence® Control siRNA (Florescein Conjugate), CST kullanılarak belirlenmiştir. 6 kuyucuklu petrilere ekilen hücrelerin medyası transfeksiyon işleminden 24 saat sonra yenilenecek hücreler 24 saat daha inkübe edilmiştir. Hücrelerdeki siRNA transfeksiyonunun yoğunluğu ve sitotoksositeye karşı oluşan cevap, Olympus IX71 mikroskobu aracılığıyla mavi floresan ve beyaz ışıkta gözlemlenmiştir.

2.2.3. Protein İfadesinin Belirlenmesi

2.2.3.1. Total Protein İzolasyonu

Toplam protein izolasyonu için hücreler 3×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekilmiş; siRNA ve ilaç uygulamalarını takiben hücreler kazıyıcılar ve 1X PBS yardımıyla petri yüzeyinden kaldırılmıştır. Soğuk santrifüjleme işlemiyle hücre pelleti elde edilip, toplam protein içeriği eldesi için PhosSTOP, Roche® fosfataz inhibitör koktail ve cOmplete EDTA-free, Roche® proteaz inhibitör koktail tabletleri çözdürülmüş cOmplete Lysis-M, Roche® lizis tamponu içerisine alınan hücreler 20 dakika oda ısısında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. 20 dakika 13200 rpm'de +4°C'de santrifüjlenen örneklerin üst sıvısı yeni bir tüpe alınarak -80°C'de saklanmıştır.

Nüklear/sitoplazmik Protein İzolasyonu

Hücreler nüklear/sitoplazmik protein izolasyonu için 7×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 60 mm'lik petrilere ekilmiş; ilaç uygulamalarını takiben kazıyıcılar ve 1X PBS yardımıyla petri yüzeyinden kaldırılmıştır. Soğuk santrifüjleme işlemiyle hücre pelletleri elde edilip her bir tüpteki hücre pelleti üzerine önceden soğutulmuş 100 µl CER I tamponu (NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents) eklenmiştir. Tüpler 15 saniye vortekslendikten sonra 10 dakika buzda bekletilmiştir.

Bunu takiben tüplere CER II (NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents) tamponu eklenmiştir. 5 saniye boyunca vortekslenen tüpler, buzda 1 dakika boyunca bekletilmiştir. Tüpler daha sonra 5 saniye daha vortekslenmiş ve 16000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatantlar yeni tüplere alınarak sitoplazmik içerikler elde edilmiştir. Pellete ise önceden soğutulmuş 50 µl NER (NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents) tamponu eklenmiş, tüpler 40 dakika boyunca 10'ar dakikalık aralıklarla 15 saniye vortekslenmiştir. Daha sonra örnekler 16000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatantta kalan nuklear proteinler yeni tüplere alınarak -80°C'ye konulmuştur.

2.2.3.2. Bradford Yöntemiyle Protein Miktar Tayini

Protein miktar analizi Bradford yöntemi kullanılmıştır (Bio-Rad). Burada proteinler Coomassie brilliant blue G-250'ye bağlanmakta ve bir renk değişimi oluşturmaktadır. Normalde protone halde kırmızı/kahverengi renkte olan boya, proteinle bağlanınca mavi renkte görülür. Bu değişim mikropilaya okuyucusu ya da spektrofotometre ile 595 nm de absorbans ölçerek belirlenir. BSA (Bovine Serum Albumin) 1,5 µg- 7,5 µg aralığında alınarak standartlar oluşturulur. Daha sonra 96 kuyucuklu petrilere örnekler her bir kuyucuğa 1 µl olacak şekilde eklenir ve üzerlerine 200 µl Bradford solüsyonu eklenip karanlıkta 5 dakika beklendikten sonra 595 nm de ölçüm yapılır.

2.2.3.3. SDS-PAGE Jel Hazırlanması

SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektroforez) proteinlerin moleküler büyüklüğünü analiz etmek için kullanılmıştır. Poliakrilamid jellerle yapılan elektroforez, hem moleküler ayırım hem de elektroforetik harekete dayandığından örnekteki bileşenlerin daha iyi ayrışmalarına yol açmaktadır.

2.2.3.4. Protein Örneklerin Hazırlanması

Immunoblotlama yöntemi için her bir örnekten alınan protein miktarı Bradford sonuçlarından elde edilen standart eğriye göre protein örnekleri 5x Laemmli yükleme tamponu ile 1:5 oranında karıştırılarak 95°C' de 5 dakika tutulup, buza alınmıştır.

2.2.3.5. SDS-PAGE Jelin Yürümesi ve PVDF Membrana Transfer

Örnekler protein belirteçler ile birlikte 75 Volt'da 2,5 saat SDS içeren yürütme tamponunda (Ek D) yürütülmüştür. Jel üzerinde olan protein örnekleri PVDF membrana transfer edildikten sonra (% 15 Metanol içeren 1x Transfer Tamponu), yağsız süt tozu ile 2 saat oda sıcaklığında çalkalanmıştır (100 ml % 0,001 Tween-20 içeren Tris Tuz Solüsyonu için 5g süt tozu).

2.2.3.6. Immunoblotlama İçin Birincil ve İkincil Antikorların Girilmesi ve Sonucun ChemiDoc™ Sistemi ile Görüntülenmesi

Membranlar, uygun birincil antikorla (1:1000; antikor: % 5 süt solüsyonu) gece boyu +4°C'de yatay döndürücülere koyulmuş, 15'er dakikalık üç kez TBS-T ile yıkama sonrasında uygun ikincil antikorla (1:5000; antikor: % 5 süt solüsyonu) gece boyu +4°C yatay döndürücülerde inkübe edilmiştir. Bu uygulamaların ardından 15'er dakikalık TBS-T ile iki kez yıkama ve 15 dakikalık TBS ile yıkama sonrasında örnekler oda sıcaklığındaki kemiluminesans madde ile 1 dakika boyunca muamele edilmiştir. Kemiluminesans ışımalar, ChemiDoc™ Imaging System, Bio-Rad ile görüntülenmiştir. Sonuçlar β -Actin, β -Tubulin, GAPDH yükleme kontrolleri ile karşılaştırılarak tartışılmıştır.

2.2.4. PathScan ELISA Yöntemi

2.2.4.1. Total Protein İzolasyonu

Toplam protein izolasyonu için hücreler 3×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekilmiş; siRNA ve ilaç uygulamalarını takiben hücreler kazıyıcılar ve 1x PBS yardımıyla petri yüzeyinden kaldırılmıştır. Soğuk santrifüjleme işlemiyle hücre pelleti elde edilip, toplam protein içeriği eldesi için PhosSTOP, Roche® fosfataz inhibitör koktail ve cOmplete EDTA-free, Roche® proteaz inhibitör koktail tabletleri çözdürülmüş cOmplete Lysis-M, Roche® lizis tamponu içerisine alınan hücreler 20 dakika oda ısısında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. 20 dakika 13200 rpm'de +4°C'de santrifüjlenen örneklerin üst sıvısı yeni bir tüpe alınarak -80°C'de saklanmıştır.

2.2.4.2. Bradford Yöntemiyle Protein Miktar Tayini

Protein miktar analizi Bradford yöntemi kullanılmıştır (Bio-Rad). Burada proteinler Coomassie brilliant blue G-250'ye bağlanmakta ve bir renk değişimi oluşturmaktadır. Normalde protone halde kırmızı/kahverengi renkte olan boya, proteinle bağlanınca mavi renkte görülür. Bu değişim mikropłaka okuyucusu yada spektrofotometre ile 595 nm de absorbans ölçerek belirlenir. BSA (Bovine Serum Albumin) 1,5 µg- 7,5 µg aralığında alınarak standartlar oluşturulur. Daha sonra 96 kuyucuklu petrilere örnekler her bir kuyucuğa 1 µl olacak şekilde eklenir ve üzerlerine 200 µl Bradford solüsyonu eklenip karanlıkta 5 dakika beklendikten sonra 595 nm de ölçüm yapılır.

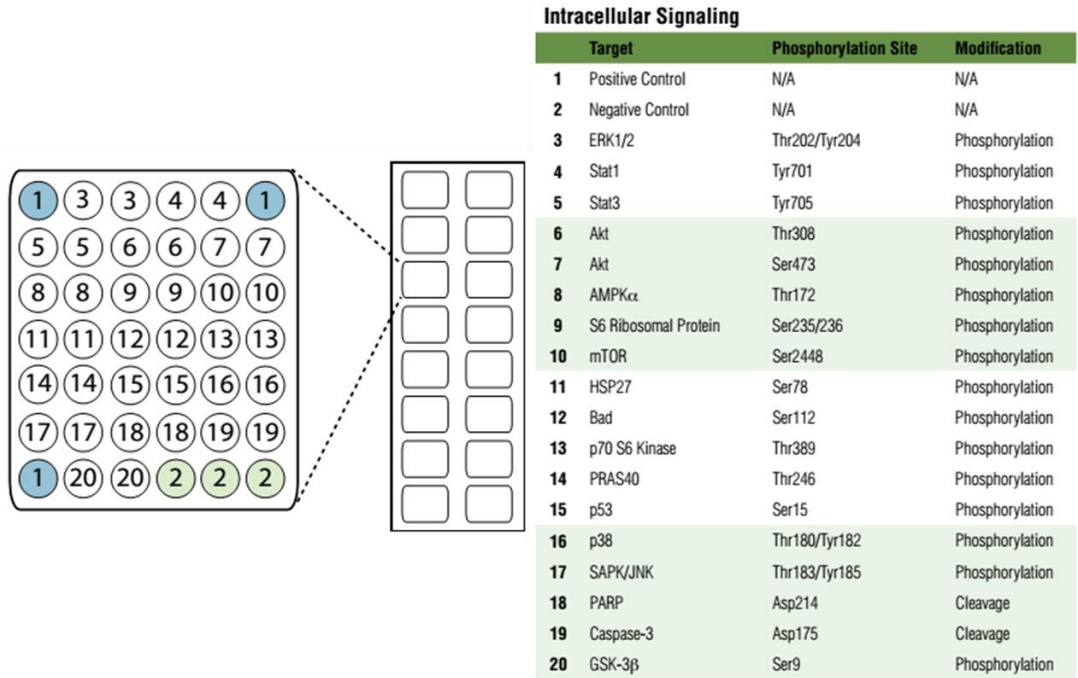
2.2.4.3. PathScan® Intracellular Signaling Array Kit Protokolü

Protokole başlamadan önce cam slaytlar ve bloklama tamponu oda sıcaklığına getirilmiş; 20X Array Wash Buffer, 10X Detection Antibody Coctail ve 10x HRP-linked Streptavidin'den 1X tamponlar hazırlanmıştır. Solüsyonlar prosedür boyunca buzda muhafaza edilmiştir. Çok kuyucuklu örnek yükleme preparatı silikon tabaka ve metal kısıkaçlar yardımıyla cam slaytla uygun şekilde birleştirilmiştir. Oluşturulan her bir kuyucuğa 100 µl 1X Array Blocking Buffer eklenerek slayt, 15 dakika boyunca orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Daha sonra 1X Array Blocking Buffer atılmış, 200 µg/µL'den hazırlanan protein lizatları total hacimleri 75 µl olacak şekilde Array Diluent Buffer ile dilüe edilmiş örnekler kuyucuklara yüklenip oda sıcaklığında 2 saat orbital çalkalayıcıda bekletilmiştir. Kuyucuklar boşaltılarak, 1X Array Wash Buffer ile 4 kez 5'er dakika oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda yıkanarak kuyucuklar tekrar boşaltılmıştır. Daha sonra her bir kuyucuğa 75 µl 1X Detection Antibody Coctail konularak slayt sistemi 1 saat boyunca oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Takiben 4 kez 5'er dakikalık yıkama aşaması tekrarlanmıştır. 75 µl 1X HRP-linked Streptavidin her bir kuyucuğa eklenerek sistem 30 dakika oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda bekletilmiş ve sonrasında 1X Array Wash Buffer ile yıkama aşamaları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra cam slayt sistemden çıkarılarak yine 1X Array Wash Buffer ile kısa bir süre yıkanmıştır. 20X LumiGLO® and 20X Peroksit kombine olarak her biri 1X olacak şekilde distile suyla dilüe edilerek 10 ml'lik kemilüminesans ajan hazırlanmıştır. Cam slayt hazırlanan kemilüminesans ajanla

kaplanmış ve 30 saniye içerisinde ChemiDoc™ Imaging System, Bio-Rad cihazına yerleştirilmiş, kemilüminesans ışımalar 2 ile 120 saniye içerisinde görüntülenmiştir.

2.2.4.4. Pathscan görüntülerinin kantitatif analizi

Pathscan slaytında elde edilen kemilüminesans ışımaya görüntüleri Image J programında kantitatif verilere dönüştürülmüş; bu verilere iki yönlü ANOVA analizi Bonferroni çoklu veri karşılaştırma testi uygulanmıştır. PathScan® Intracellular Signaling Array Kit için hedef haritası Şekil 2. 1’de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Çoklu veri analizi için kullanılan PathScan® Intracellular Signaling Array Kiti için hedef genlerin isimleri ve lam üzerinde yerleşim şeması.

2.2.5. İmmünopresipitasyon Yöntemi

Hücreler immünopresipitasyon için 5×10^6 hücre/kuyu olacak şekilde 100 mm’lik petrilere ekilmiş; ilaç uygulamalarını takiben medyalar petrilere uzaklaştırılarak petrilere soğuk 0,5 ml IP hücre lizis tamponu (Ek D) eklenmiştir. Petrilere 5 dakika boyunca buzda bekletildikten sonra kazıyıcı yardımıyla hücreler yüzeyden kazınmıştır. Tüplere aktarılan örnekler buz içerisinde alınarak sonikatörde 5 dakika boyunca 3 sikluslu %64 güç derecesinde bekletilmiştir. Bunu takiben tüpler $+4^{\circ}\text{C}$ ’de 14000 g’de 10 dakika santrifuj edilmiş ve supernatantlar yeni tüplere alınmıştır. Bradford testi yapıldıktan sonra her bir örnek için 500 μg protein lizati

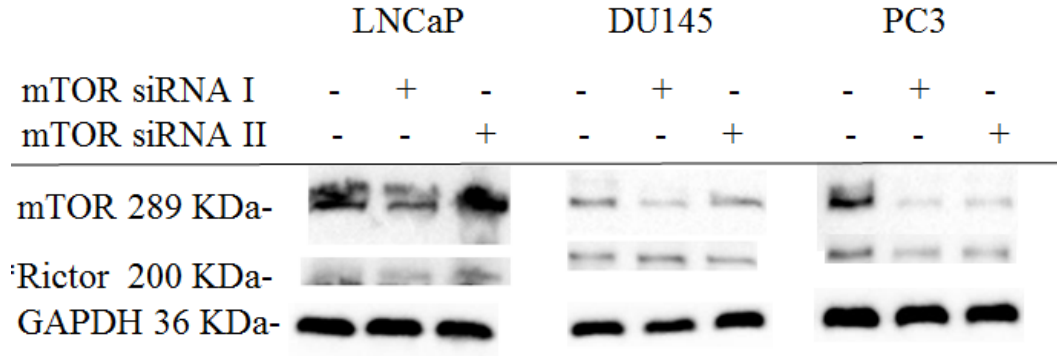
alınmıştır. Uygun primer antikorlar, protein lizatlarının hacimleriyle -Cell Signalling Technology'nin önerdiği, 1:100 oranında örnekler eklenmiştir. Daha sonra örnekler +4°C'de gece boyu çalkalayıcıda bekletilmiştir. Her bir örnek için 50 µl Dynabeads® Protein G (Invitrogen) manyetik parçacık 500 µl IP hücre lizis tamponuna aktararak 15 saniye boyunca vortekslenmiştir. Manyetik portüpe konulan örnek supernatantlarından temiz bir görüntü elde edildikten sonra supernatantlar dökülmüştür. Lizat ve antikor karışımı manyetik parçacıkların bulunduğu tüpe aktararak 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra manyetik portüpe alınarak 15 saniye bekletilmiştir. Pelletler 3 kez 500 µl IP hücre lizis tamponuyla yıkanmış, pelletlere daha sonra 5x laemmlı tamponu eklenmiştir. 95°C'de 5 dakika boyunca bekletilen örnekler +4°C'de 14000 g'de 1 dakika santrifuj edilmiştir. Manyetik portüp yardımıyla manyetik parçacıklar ve antikor-protein konjugatları birbirinden ayrılmıştır. Örnekler SDS-PAGE jelde yürütülmüş, immünoblotlama ve kemilüminesans görüntüleme ile sonuçlar elde edilmiştir.

2.2.6. İstatistiksel Analiz

Pathscan ELISA lamında kemilüminesans ışına görüntüleri Image J programıyla kantitatif verilere dönüştürüldükten sonra istatistiksel analizlerin yapılabilmesi amacı ile veriler GraphPad Prism 6 programı aracılığı ile Bonferroni çoklu karşılaştırmalı veri analizi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen p değerleri ilgili verilerin karşılaştırıldığı sonuçlar kısmında belirtilmiştir.

3. SONUÇLAR

LNCaP, DU145 ve PC3 prostat hücre hatlarında, mTOR gen fonksiyonlarının susturulması amacı ile mRNA'yı iki farklı bölgeden hedefleyen mTOR siRNA I ve mTOR siRNA II uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, petrilere 3×10^5 hücre yoğunluğunda ekim yapıldıktan 24 saat sonra; purvalanol ($20 \mu\text{M}$) ve roscovitine ($30 \mu\text{M}$) uygulamaları 24 saat boyunca gerçekleştirilmiş ve böylece mTOR siRNA I ve mTOR siRNA II etki süresi toplamda 48 saat olacak şekilde test edilmiştir.

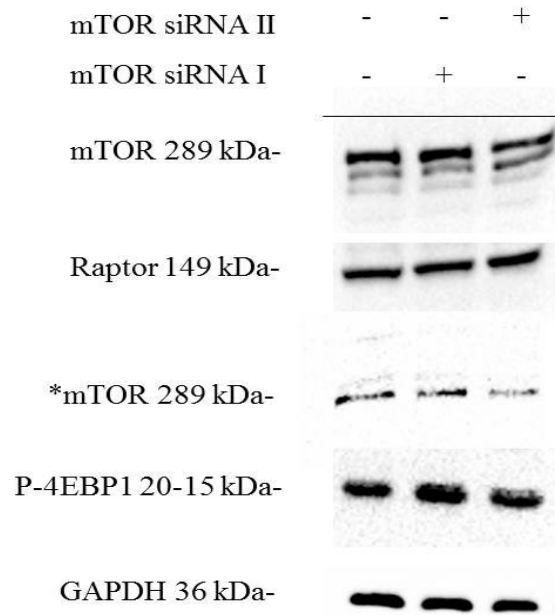


Şekil 3.1. LNCaP, PC3 ve DU145 hücre hatlarına sırasıyla, 50 ve 75 nM mTOR siRNA I ve siRNA II lipozom türevli ajan ile 1:6 oranında 48 saat boyunca uygulaması gerçekleştirilmiştir.

İlgili hücre hatlarındaki transfeksiyon işlemi 1:6 –siRNA : transfeksiyon ajanı oranı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. LNCaP, DU145 ve PC3 prostat kanseri hücre hatlarına uygulanan mTOR siRNA I ve II derişimleri artan konsantrasyonlarda; 25 nM'den başlayıp 75 nM'ye kadar çıkarılarak optimize edilmiştir. Bu uygulamalar sonucunda, lipozom türevli ajan aracılığı ile aktarılan 50 nM siRNA transfeksiyonu LNCaP ve DU145 hücre hatlarında mTOR ifadesini azaltırken, PC3 hücre hatlarında 75 nM siRNA uygulamasının etkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1). Bunun tersine, mTOR siRNA II aktarımı LNCaP prostat kanseri hücre hatlarında etkili olmamıştır.

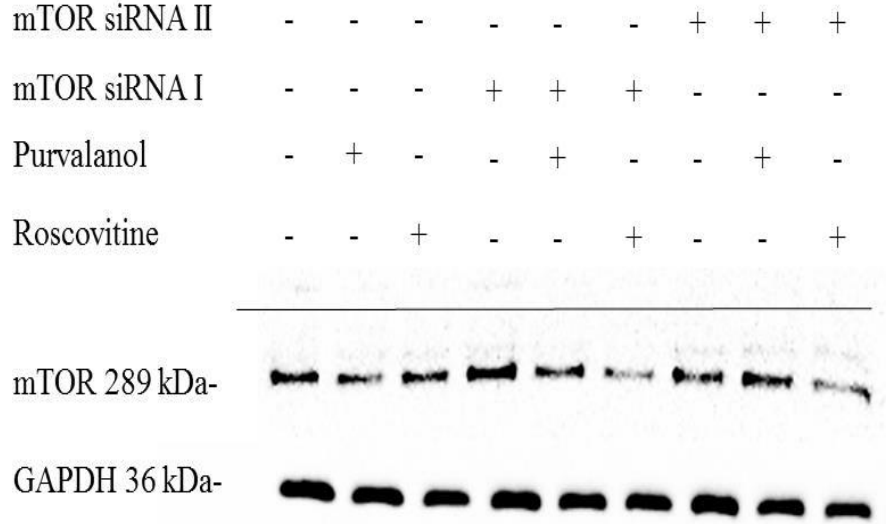
mTOR kompleks 2'de yer alan Rictor protein ifadesi, mTOR susturulması sonucunda LNCaP ve PC3 hücrelerinde mTOR siRNA I, DU145 prostat kanseri hücrelerinde ise mTOR siRNA II uygulanması sonucunda azalmıştır (Şekil 3.1).

LNCaP prostat kanseri hücrelerinde mTOR siRNA etkinliğinin artırılabilmesi amacı ile iki farklı lipozom türevli ajan; RNAifect, Lipofectamine 2000 ile yapılan transfeksiyon sonuçları karşılaştırılmış ve ek olarak optimizasyonda elektroporasyon yöntemi de kullanılmıştır. DU145 ve PC3 hücre hatlarında transfeksiyon ajanları ile sırasıyla 50 ve 75 nM siRNA kullanılarak etkin bir susturma işlemi gerçekleştirildiğinden, elektroporasyon işlemi sadece LNCaP hücrelerinde denenmiştir. LNCaP hücre hattında, 50 nM mTOR siRNA I'in lipozomal vektör veya direk elektroporasyon yöntemi ile hücrelerde mTOR ifadesini baskılamadığı belirlenmiştir. Susturma etkinliğinin yetersizliği, mTOR kompleksinde yer alan Raptor ifadesinin değişmemesi ile de gösterilmiştir. Ek olarak, mTOR alt sinyal yolağında bulunan ve translyasyon mekanizmasında görev alan 4EBP1 fosforilasyon düzeyinde de mTOR siRNA I uygulaması değişime neden olmamıştır. Ancak, elektroporasyon ile transfeksiyon işlemi sonucu 50 nM mTOR siRNA II ile susturma gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).



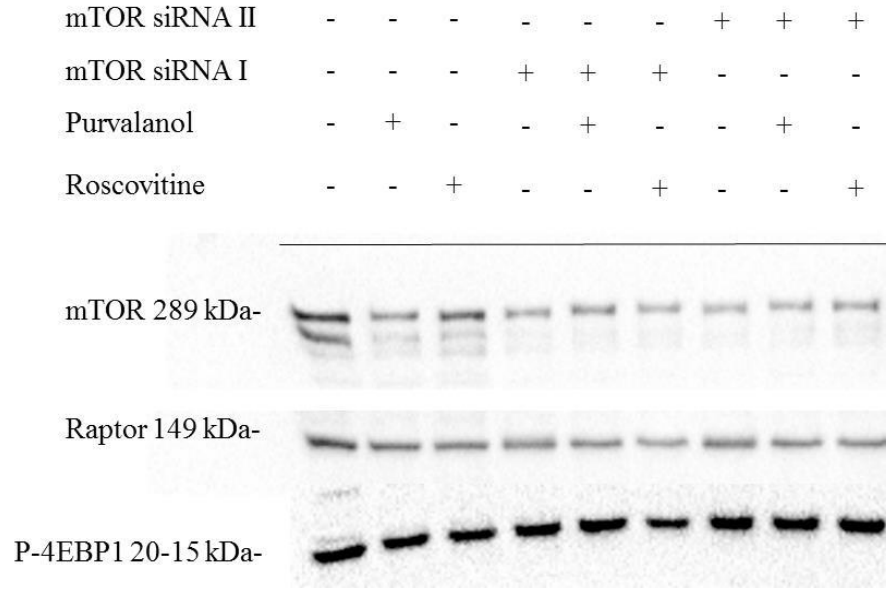
Şekil 3.2. LNCaP hücre hattına mTOR siRNA I ve II 75 nM'dan uygulanmış, lipozom türevli ajanla ve elektroporasyon yöntemiyle (50 nM) transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. *50 nM siRNA I ve II uygulanarak gerçekleştirilen elektroporasyon işlem sonucunu göstermektedir.

DU145 hücre hattında da elektroporasyon yöntemi 50 nM mTOR siRNA I ve II için denenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre lipozom türevli ajan kullanımının elektroporasyona oranla daha etkin susturmaya neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ilaçlar mTOR ifadesini azaltmakla birlikte, mTORsiRNA II transfeksiyonu ile birlikte sadece roscovitine uygulamasının mTOR protein düzeyini purvalanole kıyasla daha etkin şekilde bir şekilde azalttığı görülmüştür (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. DU145 hücre hattına mTORsiRNA I ve II 50 nM konsantrasyonda uygulanmış, elektroporasyon yöntemi ile transfeksiyon gerçekleştirilmiştir.

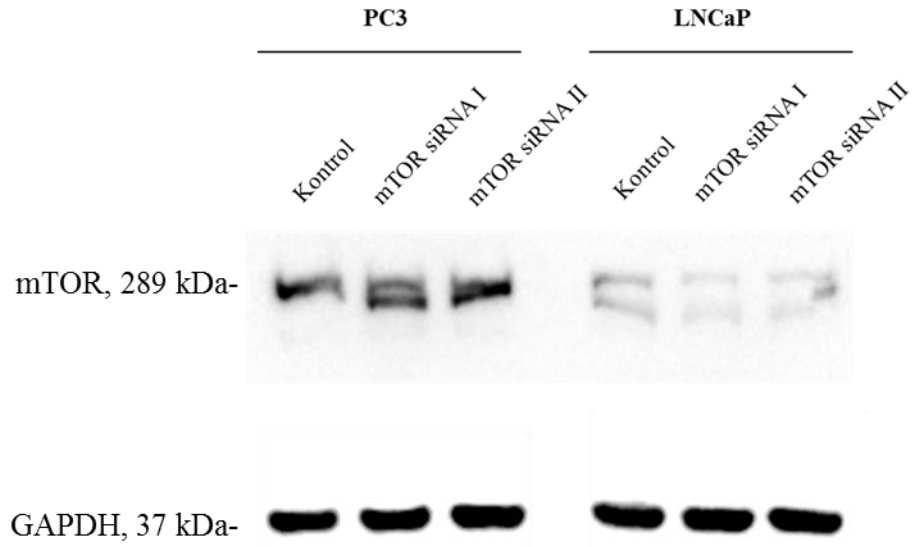
PC3 prostat kanseri hücrelerinde 75 nM mTOR siRNA I ve II, 1:6 oranında lipozom türevli ajan ile 48 saat boyunca inkübe edilmesinin ardından, purvalanol veya roscovitine ile muamele edilmiştir. PC3 hücrelerinde purvalanol'un, roscovitine'e kıyasla mTOR ifade düzeyini daha etkili bir şekilde azalttığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, mTOR siRNA I ve II başarılı bir şekilde mTOR ifadesini PC3 hücrelerinde azaltmıştır. mTOR siRNA ile birlikte purvalanol uygulaması, sadece purvalanol uygulamasına göre daha etkili bir şekilde mTOR ifadesini azaltmıştır. Raptor ifadesi, mTOR ile orantılı olarak siRNA ve ilaç uygulamaları ile azalma göstermiştir. 4EBP1 fosfoilasyon düzeyi ise mTOR siRNA I ve roscovitine uygulaması ile azalma gösterirken, diğer uygulamalarda kontrole oranla değişmemiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. PC3 hücre hattına 75 nM mTOR siRNA I ve II, 1:6 oranında lipozom türevli ajan ile 48 saat boyunca inkübe edilmiştir.

LNCaP, DU145 ve PC3 prostat kanseri hücre hatlarında elektroporasyon ve lipozom türevli transfeksiyon ajanıyla gerçekleştirilen mTOR siRNA I ve mTOR siRNA II transfeksiyon uygulamalarının iyileştirilmesi amacı ile daha yüksek konsantrasyonda siRNA komplekslerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla her bir hücre hattında 100 nM siRNA kullanılarak transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. siRNA konsantrasyonundaki artışın sitotoksik etkileride göz önüne alınarak, lipozom türevli transfeksiyon ajanı yerine elektroporasyon yöntemi kullanılarak, mTOR siRNA transfeksiyonu LNCaP hücrelerinde 200 nM olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Kontrol amacı PC3 hücrelerinde ile daha önceki optimize edilen siRNA değerlerine oranla daha yüksek konsantrasyonda siRNA transfeksiyonu (100 nM) yapılmıştır.

Elde edilen immunoblotlama sonuçları ışığında, mTOR siRNA I'in, mTOR siRNA II'ye göre her iki hücre hattında da daha efektif bir mTOR susturmasına neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.5). Bu nedenle tezin ileriki deneylerinde tüm hücre hatlarında doza bağımlı etkin susturma sağlayan mTOR siRNA I ajanı tercih edilmiştir.



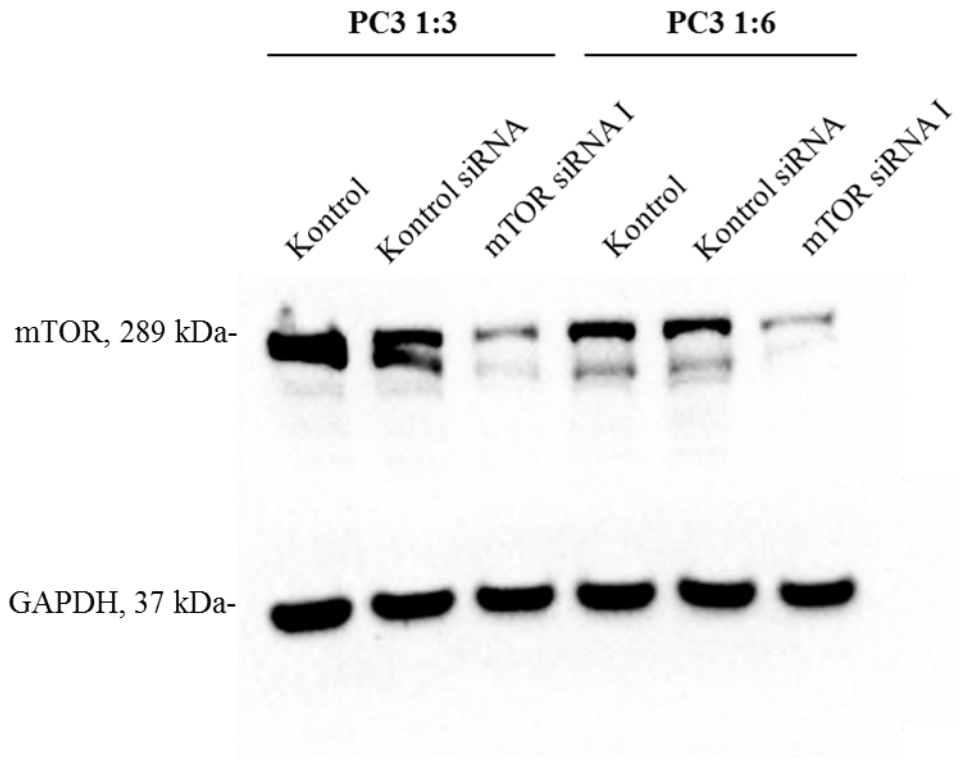
Şekil 3.5. LNCaP ve PC3 hücrelerinde elektroporasyon yöntemiyle sırasıyla 200 nM ve 100 nM siRNA miktarlarıyla gerçekleştirilen transfeksiyon işleminden 48 saat sonra mTOR proteini seviyesindeki değişimlerin immuno-blotlama yöntemiyle gösterimi. GAPDH yükleme kontrolü olarak yer almaktadır.

Lipozomal ajan kullanımına yönelik gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında, mTOR siRNA I transfeksiyonu, LNCaP ve DU145 PC3 prostat kanseri hücreleri için uygun siRNA ve transfeksiyon ajanı konsantrasyonları belirlenerek gerçekleştirilmiştir.

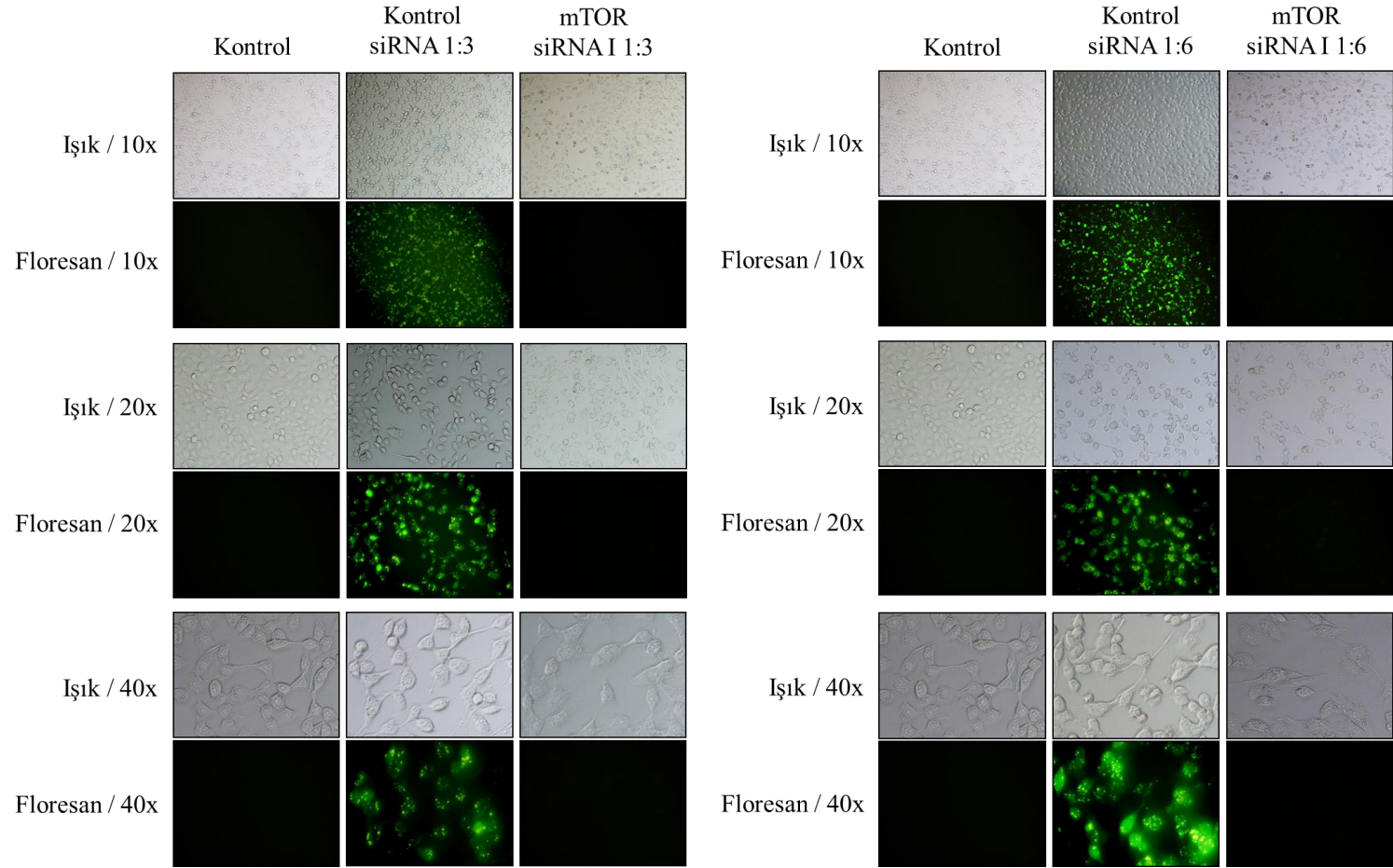
XtremeGENE siRNA Transfection Reagent, Roche®'ta başlangıç için önerilen 1 (siRNA (µg)) : 6 (transfeksiyon ajanı (µl)) oranı 0,5 µg (100 nM): 3 µl ve 1:3 oranı 0,5 µg (100 nM) : 1,5 µl şeklinde PC3, LNCaP ve DU145 hücre hatlarında denenmiştir. Hücreler, 6-kuyucuklu petrilere %50-60 yoğunlukta ekilmiş; transfeksiyon süresi, transfeksiyon sonrası 24 saatlik ilaç uygulamaları göz önüne alınarak her bir hücre hattı için 48 saat olarak belirlenmiştir. İlgili hücre hatlarında oluşan cevaplar SignalSilence® Control siRNA (Florescein Conjugate), CST kullanılarak floresan mikroskopunda görüntülenmiş; takibinde immuno-blotlama yöntemiyle mTOR proteini (289-kDa) seviyeleri kontrol, kontrol siRNA ve mTOR siRNA-I gruplarında gösterilmiştir.

PC3 hücre hattında, hücreler %50 yoğunlukta 6-kuyucuklu petrilere ekilmiş, 1:3 ve 1:6 oranlarında 48 saatlik NS ve mTOR siRNA I transfeksiyonu, transfeksiyon işleminden 24 saat sonra %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin'li RPMI medya

değişimi neticesinde hücrelerde sitotoksik bir etki oluşturmamış (Şekil 6), mTOR proteini seviyelerinde ise anlamlı bir azalma sağlamıştır (Şekil 3.6). Floresan mikroskobu görüntülerinde floresan etiketli kontrol siRNA transfeksyonu (1:6 oranında) gözlemlenen floresan ışımaya yoğunluğunun 1:3 oranına göre daha fazla olması ve yine immuno-blotlama sonucunda gösterilen mTOR proteini seviyesindeki azalmanın mTOR siRNA-I 1:6 grubunda 1:3 grubuna göre daha fazla oluşu, PC3 hücre hattı için uygun oranın 1:6 olarak belirlenmesiyle sonuçlanmıştır (Şekil 3.7).

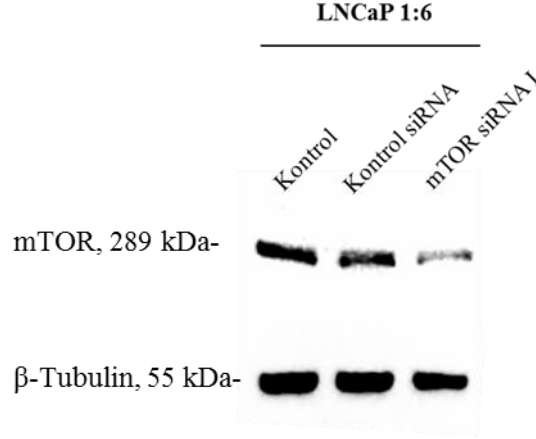


Şekil 3.6. PC3 hücrelerinde floresein etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA I için 1:3 ve 1:6 oranlarındaki transfeksiyon işleminden 48 saat sonra mTOR proteini seviyesindeki değişimlerin immuno-blotlama yöntemiyle gösterimi. GAPDH yükleme kontrolü olarak yer almaktadır.



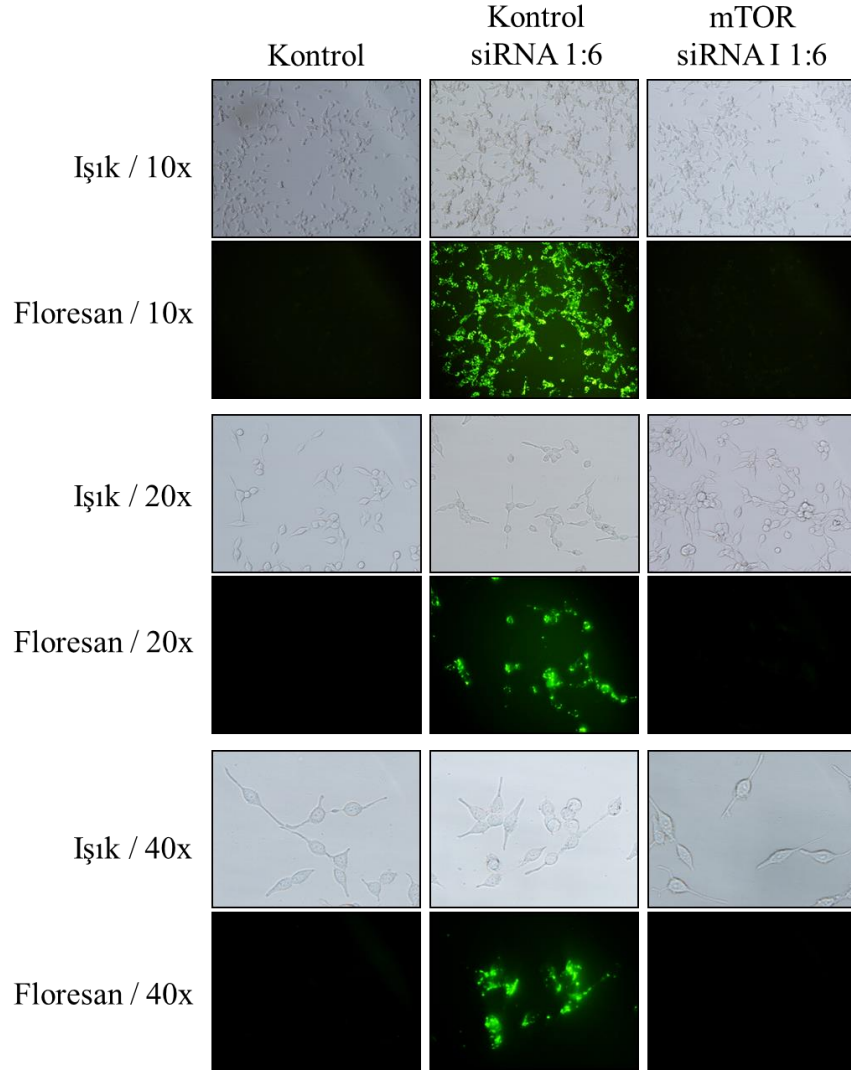
Şekil 3.7. PC3 hücre hattında floresan etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA-I için 1:3 ve 1:6 oranında gerçekleştirilen transfeksiyon işleminden 48 saat sonra 10x, 20x ve 40x büyütmelerde alınan ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri.

LNCaP hücrelerinde, PC3 hücreleri için belirlenen 1:6 transfeksiyon oranı denenmiş (3.8), yine hücreler %50 yoğunlukta ekilip 48 saatlik transfeksiyon sürecinde transfeksiyon besiyeri 24 saat sonra % 10 FBS, %1 penisilin/streptomisin’li RPMI medya ile değiştirilmiş ve floresan ve ışık mikroskobu görüntüleri ışığında sitotoksik bir etkinin oluşmadığı ve immuno-blotlama sonuçları ile de mTOR susturmasının gerçekleştiği gösterilmiştir (Şekil 3.9).



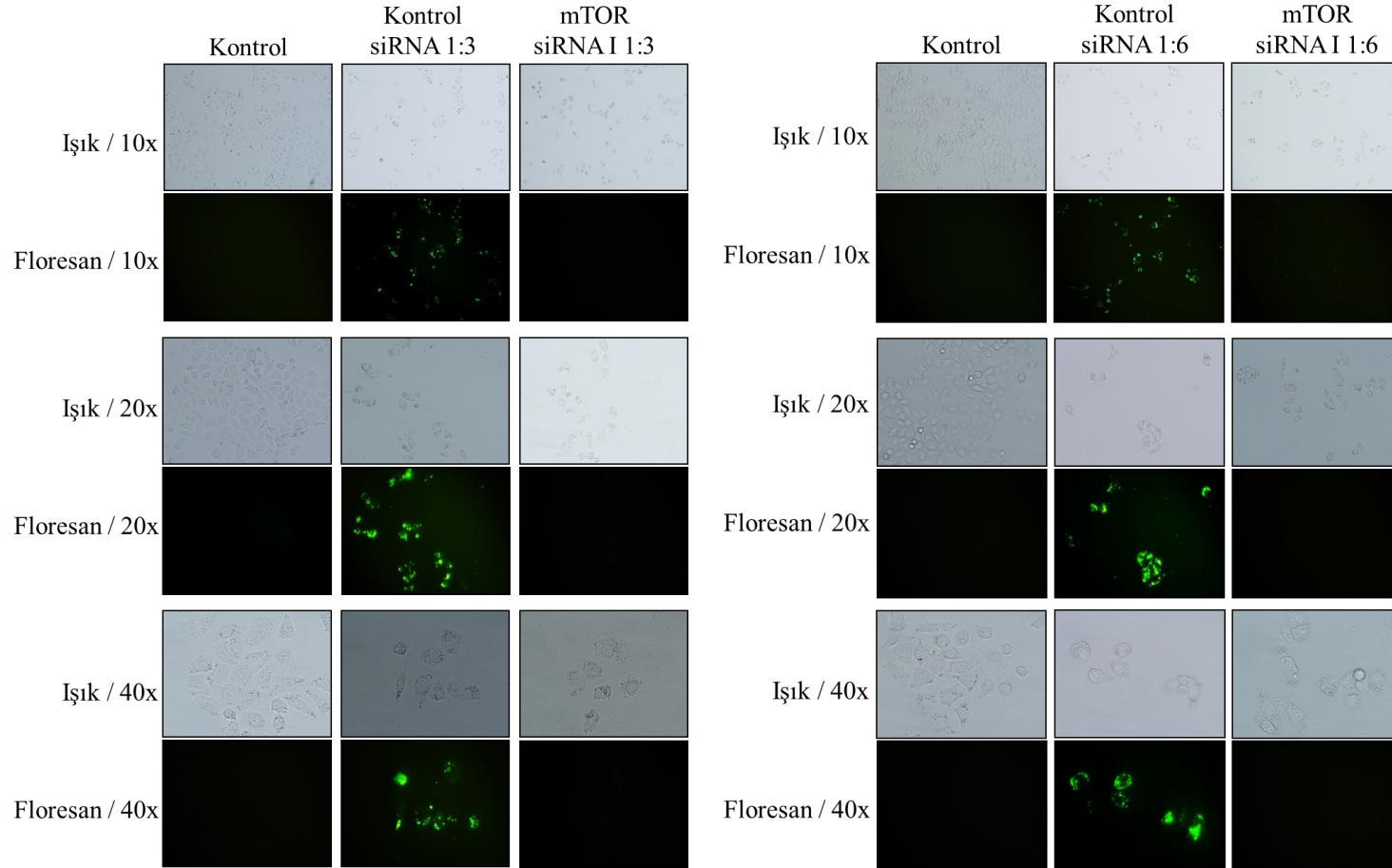
Şekil 3.8. LNCaP hücrelerinde floresein etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA-I için 1:6 oranlarındaki transfeksiyon işleminden 48 saat sonra mTOR proteini seviyesindeki değişimin immuno-blotlama yöntemiyle gösterimi. β-Tubulin yükleme kontrolü olarak yer almaktadır.

DU145 hücre hattında %50 yoğunlukta 6-kuyucuklu petrilere ekilen hücrelerde 1:6 transfeksiyon oranının ağır sitotoksik etki oluşturması sonucunda 1:3 oranı denenmiş; ancak transfeksiyon toksisitesi azaltılamamıştır (Şekil 3.10). Hücrelerin transfeksiyon medyasında inkübasyon süresi, 24 saatten 4 saate indirilmiş; 4 saatlik inkübasyon süresinin de, floresan mikroskobu görüntüleri ve immuno-blotlama sonuçları (Şekil 3.11 ve Şekil 3.14) göz önüne alındığında, mTOR susturmasında anlamlı bir cevap oluşturmadığını göstermiştir.

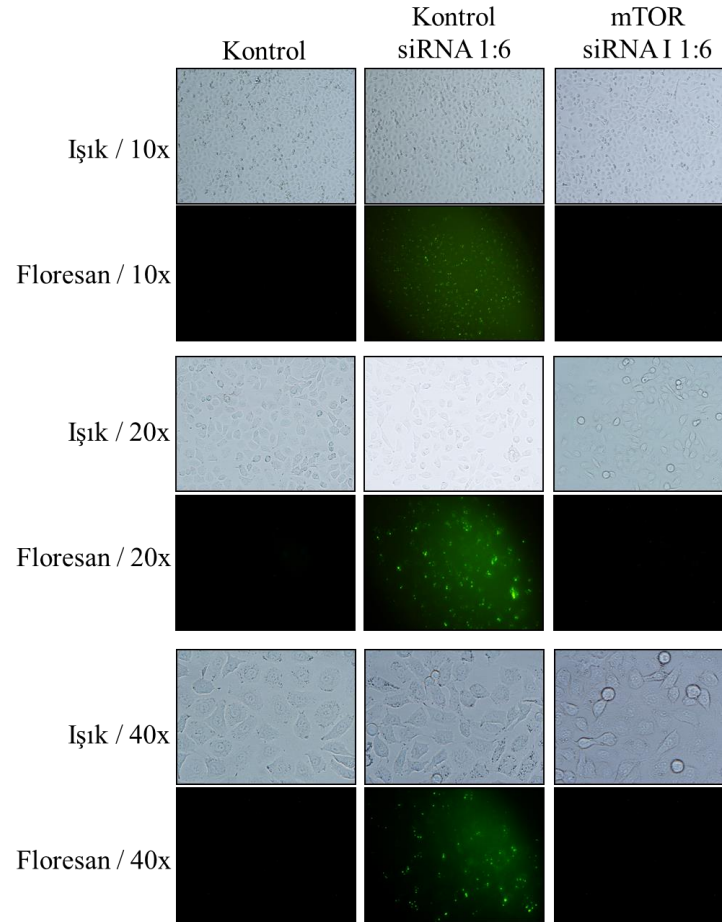


Şekil 3.9. LNCaP hücrelerinde floresein etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA I için 1:6 oranında gerçekleştirilmiş transfeksiyon işleminden 48 saat sonra 10x, 20x ve 40x büyütmelerde alınan ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri.

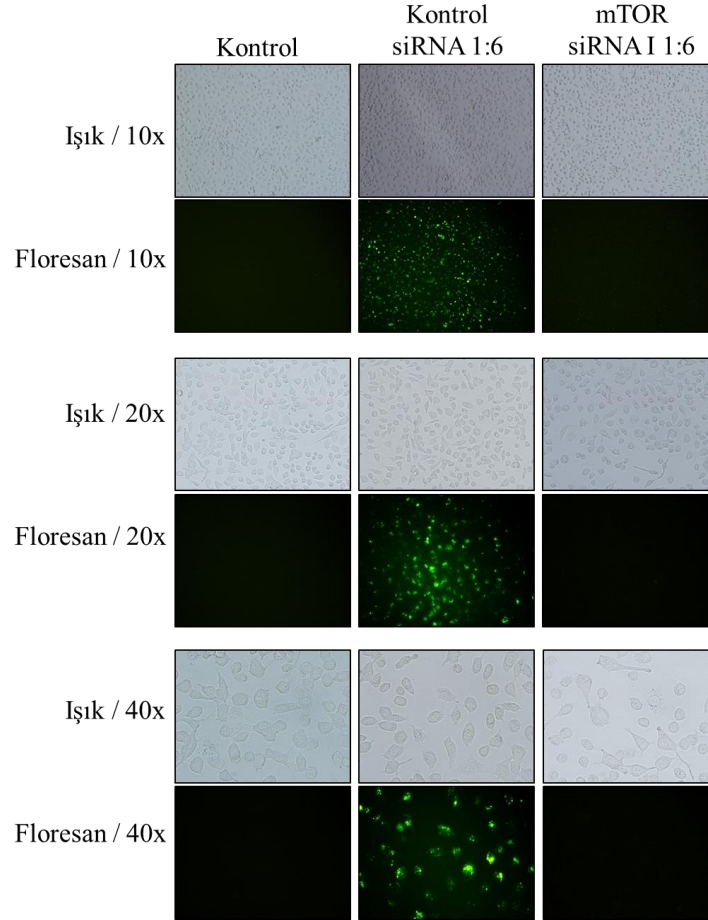
Bu nedenle, hücrelerin %60 yoğunlukta ekilip, transfeksiyon işleminden 18 saat sonra medya yenilenmesine gidilerek 1:3 ve 1:6 transfeksiyon oranları için sitotoksitenin önüne geçilmeye çalışılmıştır. %60 yoğunluktaki hücre ekimi ve hücrelerin 18 saatlik transfeksiyon medyasında inkübasyon süresi sonucunda 1:3 oranında gerçekleştirilen transfeksiyon işleminin 1:6 oranına göre daha az sitotoksik etki yaptığı ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri ele alınarak belirlenmiştir (Şekil 3.12 ve Şekil 3.13). Ayrıca aynı kondisyonlarda 1:3 oranının 1:6 oranına göre mTOR protein seviyelerinde daha anlamlı bir azalma sağladığı immuno-blotlama sonuçları ile gösterilmiştir (Şekil 3.15 ve Şekil 3.16).



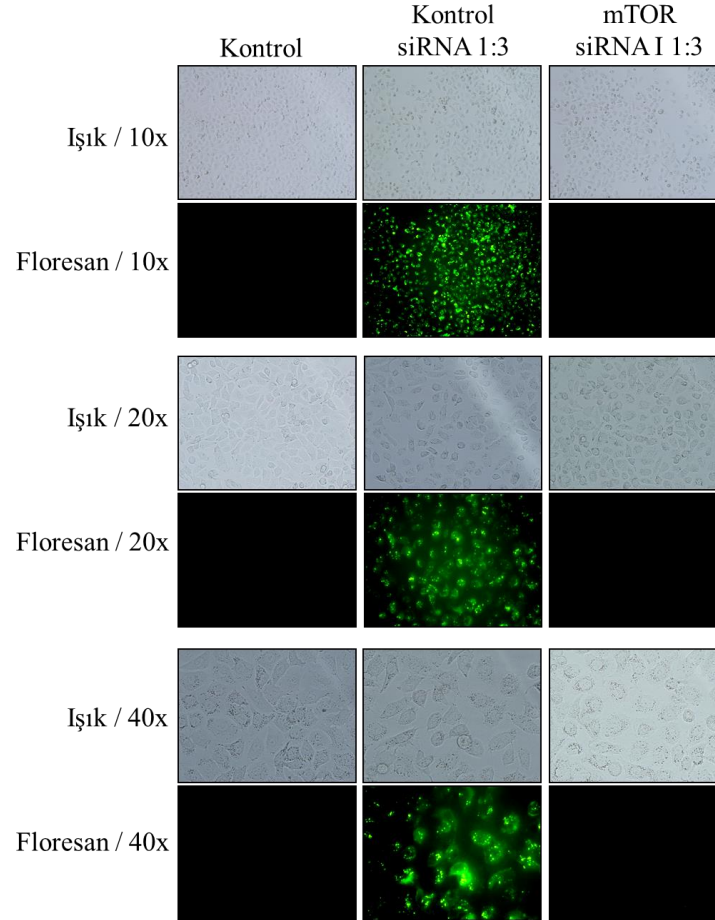
Şekil 3.10. DU145 hücre hattında floresein etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA I için 1:3 ve 1:6 oranında gerçekleştirilen transfeksiyon işleminden 48 saat sonra 10x, 20x ve 40x büyütmelerde alınan ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri. Hücre ekim yoğunluğu %50 olup, transfeksiyon medyasında inkübasyon süresi 24 saattir.



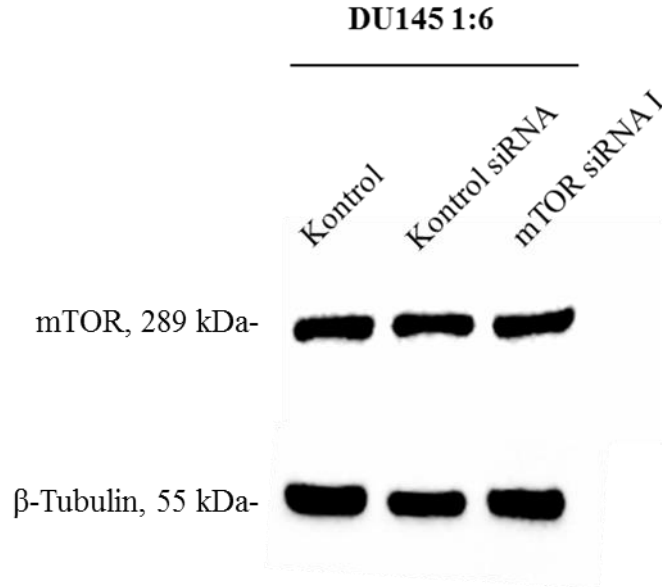
Şekil 3.11. DU145 hücrelerinde floresein etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA I için 1:6 oranında gerçekleştirilen transfeksiyon işleminden 48 saat sonra 10x, 20x ve 40x büyütmelemlerde alınan ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri. Hücre ekim yoğunluğu %60 olup, transfeksiyon medyası 4. saat sonunda %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin'li RPMI medya ile değiştirilmiştir.



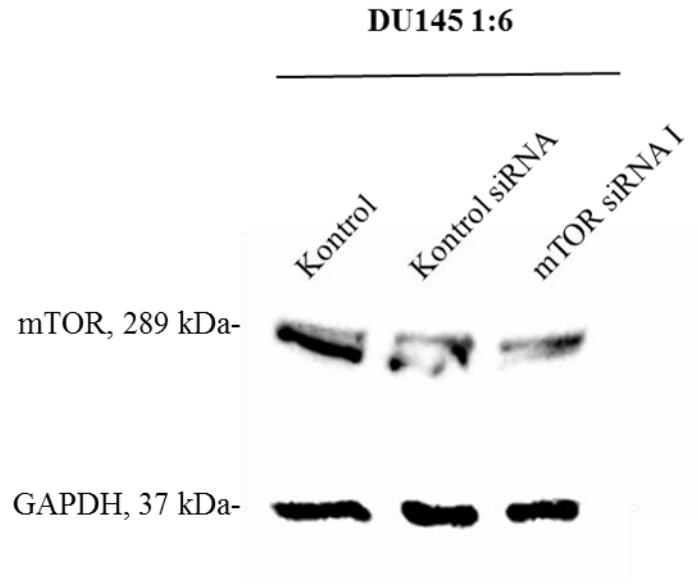
Şekil 3.12. DU145 hücrelerinde floresein etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA I için 1:6 oranında gerçekleştirilen transfeksiyon işleminden 48 saat sonra 10x, 20x ve 40x büyütmelerde alınan ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri. Hücre ekim yoğunluğu %60 olup, transfeksiyon medyasında inkübasyon süresi 18 saattir.



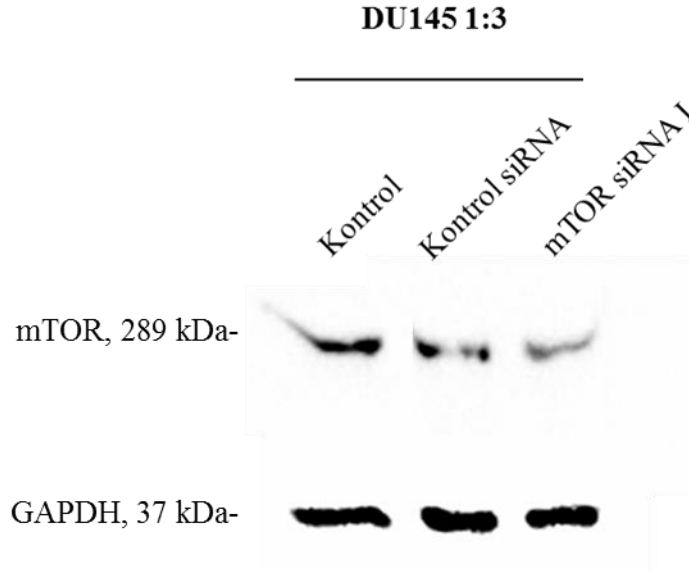
Şekil 3.13. DU145 hücrelerinde floresein etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA I için 1:3 oranında gerçekleştirilen transfeksiyon işleminden 48 saat sonra 10x, 20x ve 40x büyütmelerde alınan ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri. Hücre ekim yoğunluğu %60 olup, transfeksiyon medyasında inkübasyon süresi 18 saattir.



Şekil 3.14. DU145 hücrelerinde floresein etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA I için 1:6 oranlarındaki transfeksiyon işleminden 48 saat sonra mTOR proteini seviyesindeki değişimin immuno-bloklama yöntemiyle gösterimi. Hücre ekim yoğunluğu %60 olup, transfeksiyon medyası 4. saat sonunda %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin'li RPMI medya ile değiştirilmiştir. β-Tubulin yükleme kontrolü olarak yer almaktadır.

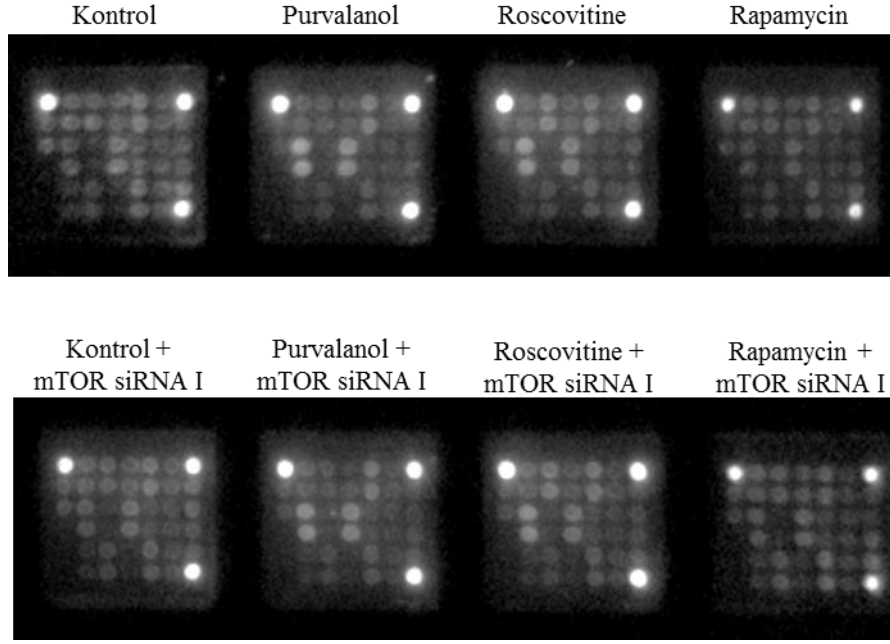


Şekil 3.15. DU145 hücrelerinde floresein etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA I için 1:6 oranlarındaki transfeksiyon işleminden 48 saat sonra mTOR proteini seviyesindeki değişimin immuno-bloklama yöntemiyle gösterimi. Hücre ekim yoğunluğu %60 olup, transfeksiyon medyasında inkübasyon süresi 18 saattir.



Şekil 3.16. DU145 hücrelerinde floresein etiketli kontrol siRNA ve mTOR siRNA I için 1:3 oranlarındaki transfeksiyon işleminden 48 saat sonra mTOR proteini seviyesindeki değişimin immuno-blotlama yöntemiyle gösterimi. Hücre ekim yoğunluğu %60 olup, transfeksiyon medyasında inkübasyon süresi 18 saattir. GAPDH yükleme kontrolü olarak yer almaktadır.

mTOR sinyal yolağının üst ve alt sinyal hedefleri ile ilişkili etkileşimi Pathcan Intracellular Signalling Array Kit, CST aracılığı ile taranmıştır. Bu amaçla susturma etkinliğinin en iyi olduğu PC3 hücrelerinde 1:6 oranındaki mTOR siRNA I transfeksiyonunu takiben CDK inhibitörleri purvalanol (20 μ M), roscovitine (30 μ M) veya mTOR inhibitörü rapamycin (10 nM) uygulaması 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Çoklu veri analizi için her bir uygulama grubundan toplamda 200 μ g/örnek olacak şekilde protein içerikleri elde edilmiştir. İlgili proteinler Pathscan® Intracellular Signalling Array Kit (Chemiluminescent Readout), CST lamına yüklenmiş ve gerekli prosedür izlendikten sonra ChemiDoc™ XRS+ System, Biorad® cihazı kullanarak kemiluminesans ışımalar görüntülenmiştir (Şekil 3.17). Elde edilen veriler Image J ile analiz edilerek, yükleme kontrollerine göre göreceli protein ifadesi olarak sunulmuştur.

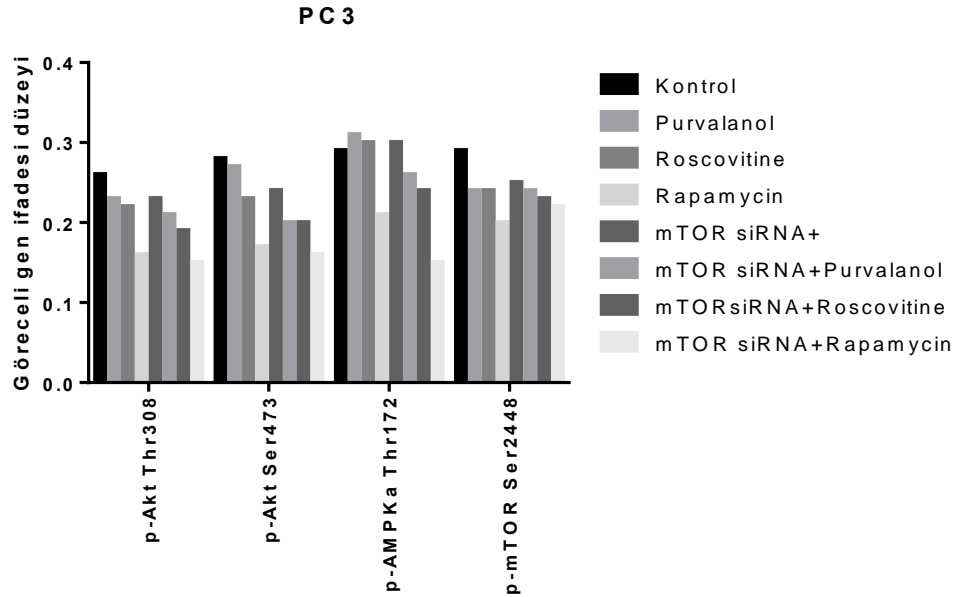


Şekil 3.17. PC3 hücre hattında 1:6 oranındaki mTOR siRNA I transfeksiyonundan 24 saat sonra gerçekleştirilen 24 saatlik purvalanol, roscovitine ve rapamycin ilaçları uygulamasını takiben Pathscan® Intracellular Signalling Array Kit (Chemiluminescent Readout), CST kullanılarak elde edilen immuno-assay görüntüsü.

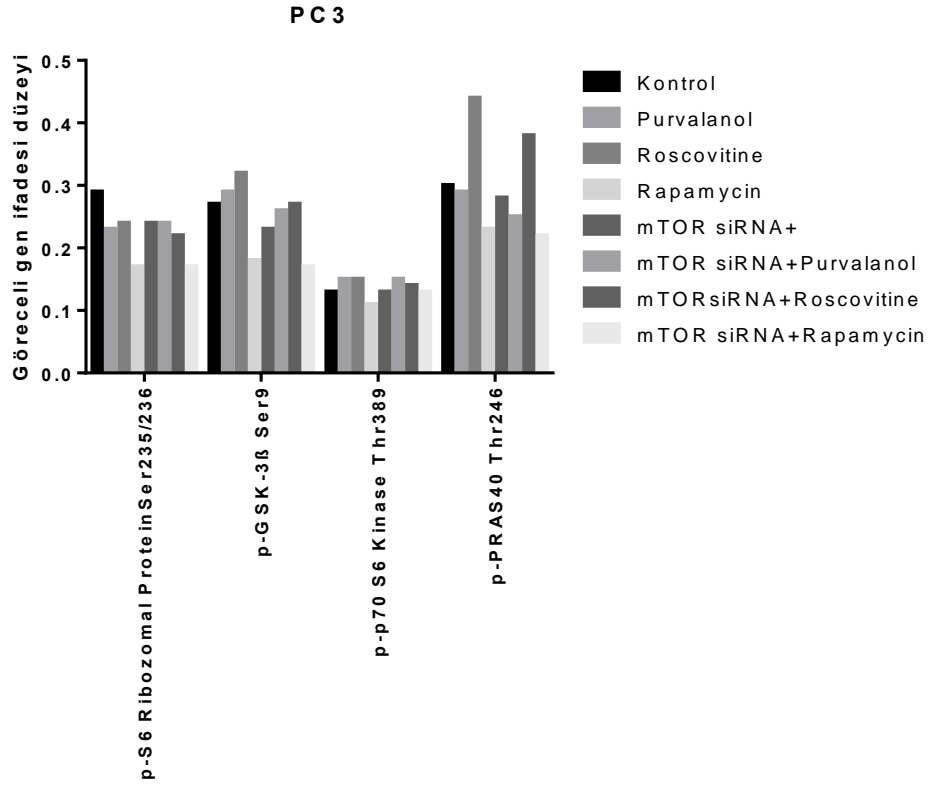
PC3 hücre hattında her bir örneğin değerlendirilmesi esnasında mTOR yoksunluğunda CDK inhibitörlerinin etkisinin istatistiksel olarak analiz edilebilmesi amacı ile iki yönlü ANOVA analizi gerçekleştirilmiş ve Bonferroni çoklu veri karşılaştırma testi uygulanmıştır. Bir kinaz molekülü olan mTOR'un fonksiyonu üst ve alt sinyal yolaklarında yer alan AKT Thr308, Ser473 fosforilasyon bölgeleri aracılığı ile test edilmiştir. Rapamycin uygulaması AKT Thr308 ve Ser473 bölgelerinde fosforilasyonu azaltıcı etki göstermiştir. Ancak purvalanol veya roscovitine uygulaması rapamycin kadar etkili olmamıştır. mTOR siRNA I uygulamasına takiben CDK inhibitörleri ise üst sinyal yolağında yer alan AKT'ı inhibe etmektedir (Şekil 3.18). AMPK α Thr172 fosforilasyon bölgesi mTOR fonksiyonlarının tanımlanabilmesi için taranmış ve CDK inhibitörlerinin tek başlarına AMPK α fosforilasyonunu arttırdığı saptanmıştır. Ancak mTOR siRNA I ile kombine edilen CDK inhibitörleri etkili bir şekilde AMPK α aktivitesini indirmemiştir (Şekil 3.18). Bununla birlikte, mTOR Ser2448 fosforilasyonu purvalanol ve roscovitine tarafından indirgenmiş, mTOR siRNA ile roscovitine kombinasyonu roscovitine'in mTOR üzerindeki etkinliğini arttırmıştır. Ancak purvalanol + mTOR siRNA uygulaması purvalanole karşın mTOR Ser2448 fosforilasyonunda anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır.

ERK1/2 aktivitesi CDK inhibitörleri tarafından indirgenirken, CDK inhibitörlerinin mTOR siRNA ile kombinasyonları bu ilaçların ERK1/2 Thr202/Tyr204 fosforilasyonu üzerindeki etkinliklerini arttırmıştır. Ayrıca rapamycin mTOR siRNA'ya karşı ERK1/2 Thr202/Tyr204 fosforilasyon düzeyini azaltmıştır ($p < 0,0001$). SAP/JNK Thr183/Tyr185 fosforilasyonu purvalanol ve roscovitine uygulamasıyla artarken, mTOR siRNA + roscovitine uygulaması SAP/JNK aktivitesini roscovitine'e karşı azaltmıştır. Bununla birlikte, mTOR siRNA'nın purvalanol ile beraber uygulanması yalnız purvalanol uygulamasına karşı SAP/JNK aktivitesinde anlamlı bir değişim oluşturmamıştır. Stat1 Tyr701 fosforilasyon düzeyleri CDK inhibitörleri ile azalmış, mTOR siRNA uygulaması purvalanolün Stat1 defosforilasyonu üzerindeki etkinliğini arttırmıştır. mTOR susturmasıyla birlikte roscovitine yalnız roscovitine'in neden olduğu Stat1 Tyr701 defosforilasyonunu geri çekmiştir. Stat3 Tyr705 fosforilasyonu mTOR susturmasına karşı rapamycin uygulamasıyla azalmış ($p = 0,0082$) ve rapamycinin mTOR siRNA I ile birlikte uygulanması Stat3 aktivitesini daha etkin bir şekilde azaltmıştır ($p < 0,0001$). CDK inhibitörleri ise tek başlarına Stat3 Tyr705 fosforilasyonunu arttırırken, bu ilaçların mTOR siRNA ile birlikte uygulanması yalnız roscovitine ve purvalanol uygulanmasına karşı Stat3 defosforilasyonuna neden olmuştur. Purvalanol ve roscovitine p38 Thr180/Tyr182 ve p70S6 kinaz fosforilasyon düzeylerini arttırmıştır. Purvalanol + mTOR siRNA yalnız purvalanole karşı bu proteinlerin fosforilasyonu üzerinde anlamlı bir değişim oluşturmazken, roscovitine'e karşı mTOR siRNA + roscovitine uygulaması p38 ve p70S6K fosforilasyonlarını indirmişdir. GSK-3 β Ser9 fosforilasyonu CDK inhibitörleriyle azalırken, bu ilaçların mTOR siRNA ile birlikte uygulanması purvalanol ve roscovitine'in neden olduğu Ser9 defosforilasyonunu geri çekmiştir. Purvalanol PRAS40 Thr246 fosforilasyonunu indirgerken, roscovitine ise PRAS40 fosforilasyonunu arttırmıştır. Purvalanol veya roscovitine'in mTOR siRNA ile kombine olarak uygulanması bu ilaçların tek başlarına PRAS40 fosforilasyonu üzerindeki etkinliğini arttırmıştır. p-S6 ribozomal proteinin Ser235/236 bölgelerinden fosforilasyonu mTOR siRNA'ya karşı rapamycin tarafından indirgenmiştir ($p = 0,0335$). Bununla birlikte, CDK inhibitörleri tek başlarına p-S6 ribozomal protein aktivitesini inhibe etmiştir. Purvalanol + mTOR siRNA uygulaması yalnız purvalanol uygulamasına karşı p-S6 ribozomal protein fosforilasyonunu arttırırken, roscovitine mTOR siRNA ile beraber uygulanması roscovitine'in p-S6 ribozomal proteini üzerindeki etkinliğini arttırmıştır (Şekil 3.19 ve Şekil 3.20)

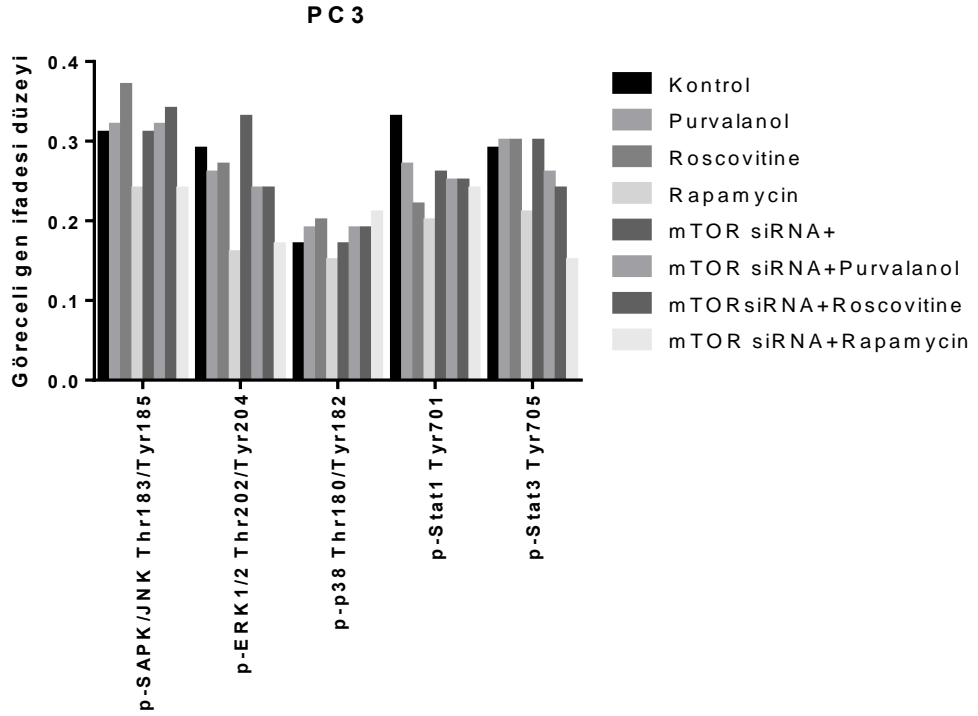
PARP Asp214 ve Bad Ser112 fosforilasyonu CDK inhibitörleri purvalanol ve roscovitine ile anlamlı şekilde artarken ($p < 0,0001$), mTOR siRNA uygulaması bu CDK inhibitörlerinin PARP ve Bad fosforilasyonu üzerine olan etkilerini geri çekmiştir ($p < 0,0001$). Purvalanol HSP27 Ser78 fosforilasyonunu azaltırken, roscovitine ise arttırmıştır. Ancak bu ilaçların mTOR siRNA ile kombine olarak uygulanması HSP27 fosforilasyonunu geri çekmiştir. Kaspaz-3 aktivitesi her iki CDK inhibitörü ile anlamlı olarak artarken, mTOR siRNA + roscovitine yalnız roscovitine uygulanmasına karşın Kaspaz-3 Asp175 fosforilasyonunu inhibe etmiştir. Purvalanolün mTOR siRNA ile birlikte uygulanması ise yalnız purvalanol uygulamasına karşın Kaspaz-3 aktivitesi üzerinde anlamlı bir değişim oluşturmamıştır (Şekil 3.21).



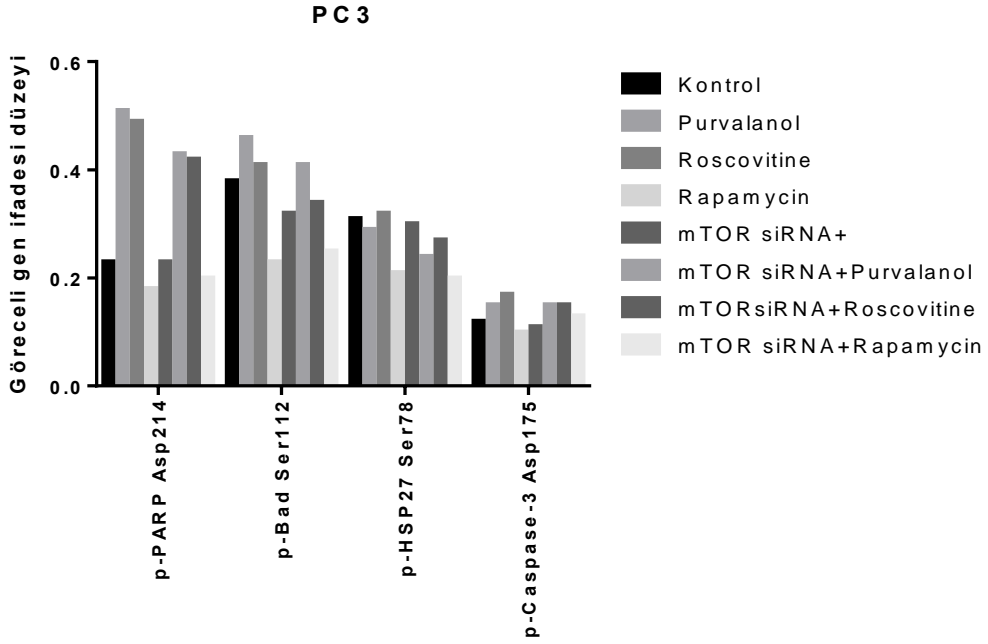
Şekil 3.18. CDK inhibitörleri ve mTOR inhibisyon/gen ifadesinin baskılanmasına yönelik PC3 hücrelerinde PATHSCAN ELISA yöntemi ile taranan mTOR üst ve alt sinyal yollarının ifade düzeylerinin yükleme kontrolü β -Actin ifadesine göre göreceli olarak belirlenmesi.



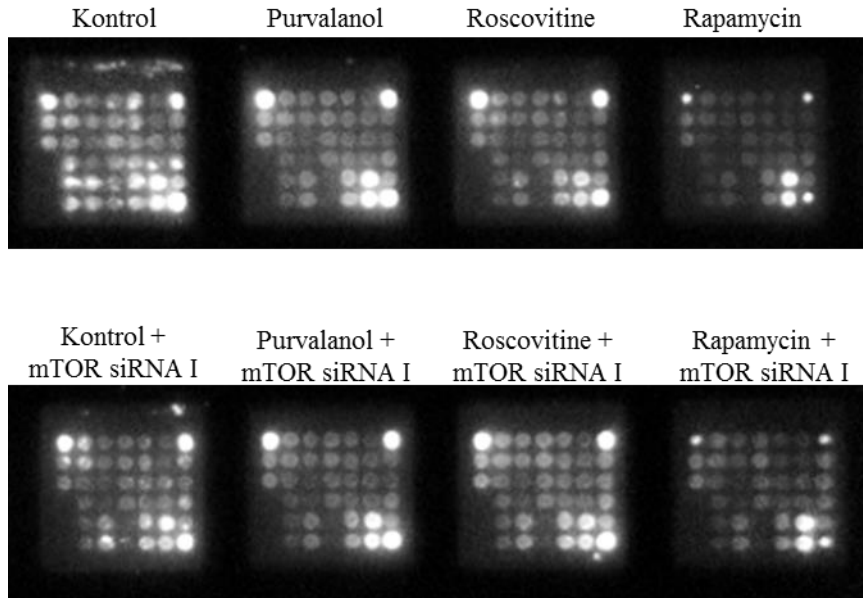
Şekil 3.19. CDK inhibitörleri ve mTOR inhibisyon/gen ifadesinin baskılanmasına yönelik PC3 hücrelerinde PATHSCAN ELISA yöntemi ile taranan mTOR alt sinyal yollarının ifade düzeylerinin yükleme kontrolü β -Actin ifadesine göre göreceli olarak belirlenmesi.



Şekil 3.20. CDK inhibitörleri ve mTOR inhibisyon/gen ifadesinin baskılanmasına yönelik PC3 hücrelerinde PATHSCAN ELISA yöntemi ile taranan MAPK ilişkili sinyal yollarının ifade düzeylerinin yükleme kontrolü β -Actin ifadesine göre göreceli olarak belirlenmesi.



Şekil 3.21. CDK inhibitörleri ve mTOR inhibisyon/gen ifadesinin baskılanmasına yönelik PC3 hücrelerinde PATHSCAN ELISA yöntemi ile taranan apoptoz ilişkili hedeflerin ifade düzeylerinin yükleme kontrolü β -Actin ifadesine göre göreceli olarak belirlenmesi.



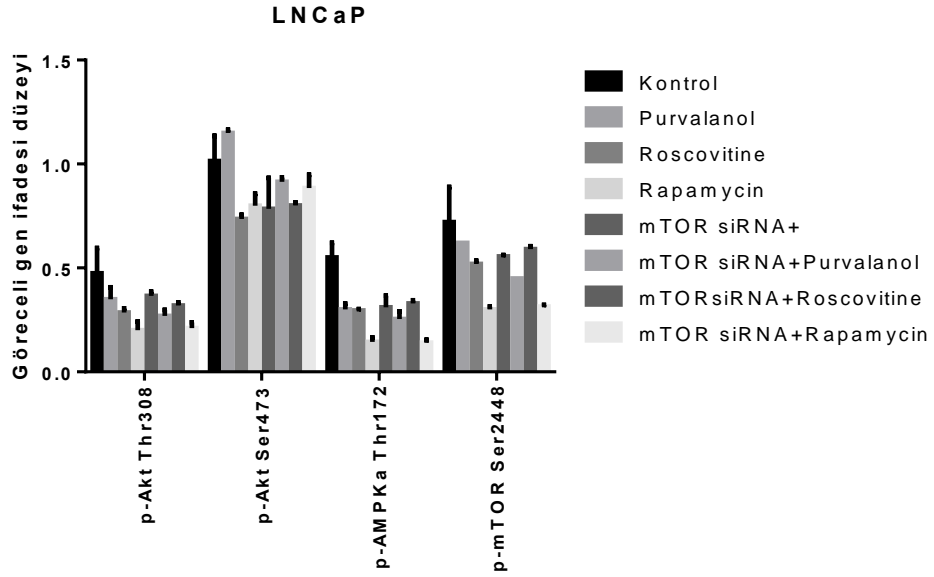
Şekil 3.22. LNCaP hücre hattında 1:6 oranındaki mTOR siRNA I transfeksiyonundan 24 saat sonra gerçekleştirilen 24 saatlik purvalanol, roscovitine ve rapamycin ilaçları uygulamasını takiben Pathscan® Intracellular Signalling Array Kit (Chemiluminescent Readout), CST kullanılarak elde edilen immuno-assay görüntüsü.

LNCaP prostat kanseri hücrelerinde rapamycin mTOR siRNA'ya karşın AKT Thr308 fosforilasyonu değiştirmiştir. AKT Ser473 fosforilasyonu ise mTOR susturması ile anlamlı bir şekilde azalmaktadır ($p < 0,0001$). AKT Thr308 fosforilasyonu purvalanol ve roscovitine uygulaması ile indirgenmiştir. Bu ilaçların mTOR siRNA ile uygulanması her bir ilacın tek başlarına uygulanmasına göre AKT Thr308 fosforilasyonunda anlamlı bir değişim meydana getirmemiştir. AKT Ser473 fosforilasyonu ise purvalanol uygulaması ile artarken, roscovitine uygulanması bu proteinin Ser473 fosforilasyonunu inhibe etmiştir. Bununla birlikte purvalanolđn mTOR siRNA ile birlikte uygulanması yalnız purvalanolün AKT Ser473 üzerindeki etkisini geri çekmiştir. mTOR susturması AMPK α Thr172, mTOR Ser2448 ve p70S6K Thr389 fosforilasyonunu anlamlı derecede azaltmıştır. Purvalanol ve roscovitine AMPK α 'nın aktivasyonunu indirgemiştir. Bu ilaçların mTOR siRNA ile birlikte uygulanması, ilaçların tek başlarına olan etkinliklerine göre anlamlı bir değişim oluşturmamıştır. Purvalanol mTOR Ser2448 fosforilasyonunda anlamlı bir değişim meydana getirmezken, roscovitine bu bölgedeki fosforilasyonu indirgemiştir. mTOR siRNA'nın roscovitine ile kombine olarak uygulanması yalnız roscovitine uygulamasına göre anlamlı bir değişim oluşturmamıştır. Bununla birlikte purvalanol, mTOR siRNA ile birlikte uygulandığında mTOR Ser2448 fosforilasyonunu anlamlı derecede indirgemiştir. mTOR siRNA uygulaması tek başına p70S6 kinaz aktivitesini $p = 0,0183$ anlamlılık derecesinde azaltmıştır. Rapamycin ise mTOR siRNA kombinasyonu ile yalnız mTOR siRNA uygulamasına karşın p70S6K Thr389 fosforilasyon düzeyini indirgemiştir ($p = 0,0256$). CDK inhibitörleri purvalanol ve roscovitine ise p70S6K Thr389 fosforilasyonunu azaltırken, bu ilaçların mTOR siRNA ile birlikte uygulanması sadece ilaç uygulamalarına göre anlamlı bir değişim meydana getirmemiştir. mTOR siRNA p-S6 ribozomal protein Ser235/236 fosforilasyonunu anlamlı olarak azaltmıştır ($p = 0,0063$). Bununla birlikte mTOR siRNA'ya karşın rapamycin ve rapamycin + mTOR siRNA kombinasyonu p-S6 ribozomal protein aktivitesini azaltmıştır (sırasıyla; $p = 0,0063$ ve $p = 0,009$). Purvalanol ve roscovitine p-S6 ribozomal protein fosforilasyonunu indirgemiştir. mTOR siRNA uygulaması bu ilaçların p-S6 ribozomal protein üzerindeki etkinliğini değiştirmemiştir. PRAS40 Thr246 fosforilasyonu ilgili uygulama grupları tarafından etkilenmemiştir. GSK-3 β Ser9 fosforilasyonu mTOR siRNA'ya karşın rapamycin ve rapamycin + mTOR siRNA uygulamasıyla indirgenmiştir (şekil 3.23 ve şekil 3.24). GSK-3 β aktivitesi CDK inhibitörleri tarafından etkilenmemiştir. Ancak, purvalanolün mTOR siRNA ile birlikte uygulanması GSK-3 β Ser9 fosforilasyonunu azaltmıştır. Roscovitine + mTOR siRNA kombinasyonu GSK-3 β aktivitesi üzerinde anlamlı bir değişim oluşturmamıştır.

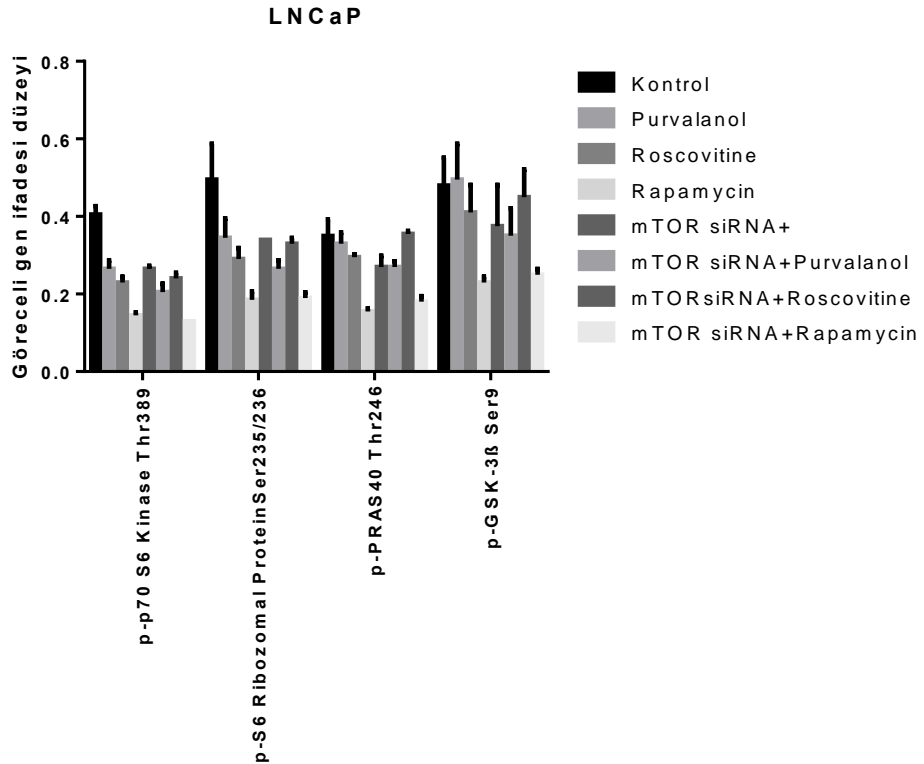
SAPK/JNK Thr183/Tyr185 fosforilasyonu yalnızca mTOR susturmasına karşın rapamycin ($p<0,0001$) ve rapamycin + mTOR siRNA ($p<0,0001$) uygulamasıyla değişmiştir. CDK inhibitörlerinin tek başlarına ve mTOR siRNA ile birlikte SAP/JNK aktivitesi üzerinde bir etkinliği tespit edilmemiştir. ERK1/2 Thr202/Tyr204 fosforilasyon düzeyi mTOR susturmasına karşın rapamycin uygulamasıyla indirgenmiştir ($p<0,0001$). Bununla birlikte CDK inhibitörleri tek başlarına ERK1/2 aktivitesi üzerinde anlamlı bir etkide bulunmamıştır. Purvalanolün değil ama roscovitine'in mTOR siRNA ile birlikte uygulanması ERK1/2 Thr202/Tyr204 fosforilasyon düzeyini arttırmıştır. Rapamycinin tek başına p38 aktivitesini azaltıcı etkisi, rapamycin + mTOR siRNA kombinasyonu ile geri çekilmiştir. Purvalanol ve roscovitine p38 Thr180/Tyr182 fosforilasyonunu inhibe ederken, bu ilaçların mTOR siRNA ile birlikte uygulanması her iki ilacın p38 fosforilasyonu üzerindeki etkinliğinde anlamlı bir değişim oluşturmamıştır. mTOR siRNA tek başına Stat1 Tyr701 fosforilasyonunu anlamlı ölçüde azaltmıştır ($p=0,0043$). Rapamycin, mTOR siRNA'ya karşın Stat1 fosforilasyon seviyesini azaltırken, rapamycinin bu etkisi mTOR siRNA uygulamasıyla birlikte geri çekilmiştir. CDK inhibitörleri Stat1 Tyr701 fosforilasyonunu indirgemmiştir. Ancak mTOR siRNA uygulaması purvalanolün Stat1 fosforilasyonu üzerindeki etkisini değiştirmemiştir. Stat1'in roscovitine tarafından defosforilasyonu, mTOR siRNA + roscovitine uygulamasıyla geri çekilmiştir. Stat3 Tyr705 fosforilasyonu rapamycin tarafından indirgenirken, rapamycinin Stat3 defosforilasyonu üzerindeki etkinliği mTOR siRNA kombinasyonu ile artmıştır ($p=0,0256$). Diğer uygulama grupları Stat3'ün Tyr705 bölgesindeki fosforilasyonunda anlamlı bir değişim oluşturmamıştır (Şekil 3.25).

PARP Asp214 mTOR susturması ile $p=0,0004$ anlamlılık derecesinde azalmıştır. Ayrıca rapamycin, mTOR siRNA'ya karşın Bad defosforilasyonu üzerinde daha etkin bir rol oynamıştır ($p=0,0491$). PARP Asp214 fosforilasyonu CDK inhibitörleri tarafından indirgenirken mTOR siRNA, CDK inhibitörleri etkinliğinde anlamlı bir değişim meydana getirmemiştir. Bad Ser112 fosforilasyonu mTOR susturması ile $p=0,009$ anlamlılık derecesinde azalmıştır. Bad Ser112 defosforilasyonunda purvalanol da etkili olmuş, mTOR siRNA varlığı ise her iki CDK inhibitörünün etkinliğini değiştirmemiştir. HSP27 Ser78 fosforilasyonu mTOR siRNA uygulamasıyla $p=0,0356$ anlamlılık derecesinde azalırken, rapamycinin mTOR siRNA'ya karşın HSP27 defosforilasyonunda anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p=0,0491$). CDK inhibitörleri tek başlarına ya da mTOR siRNA ile kombine durumlarında HSP27 Ser78 fosforilasyonunu etkilememiştir. p53 aktivasyonu ise ilgili

gruplarda anlamlı bir değişim göstermemiştir. Kaspaz-3 Asp175 fosforilasyon düzeyi, mTOR susturmasıyla ve CDK inhibitörleriyle anlamlı ölçüde artsa da ($p<0,0001$), CDK inhibitörlerinin mTOR siRNA ile birlikte uygulanması bu ilaçların tek başlarına Kaspaz-3 aktivasyonuna olan etkilerini değiştirmemiştir (Şekil 3.26).

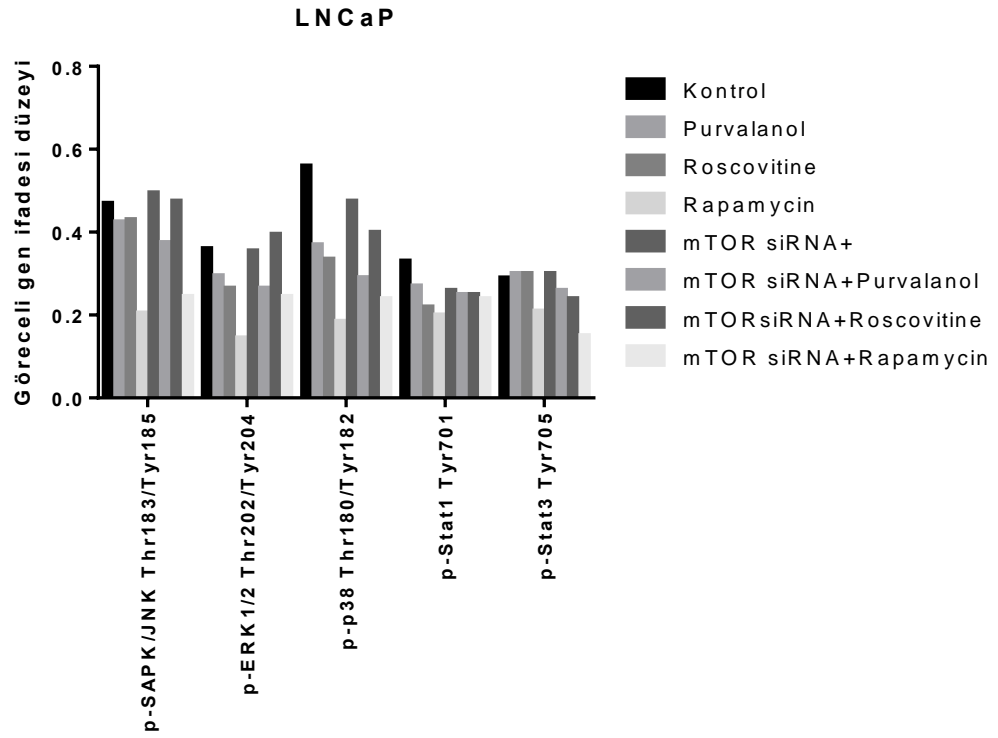


Şekil 3.23. CDK inhibitörleri ve mTOR inhibisyon/gen ifadesinin baskılanmasına yönelik LNCaP hücrelerinde PATHSCAN ELISA yöntemi ile taranan apoptoz ilişkili hedeflerin ifade düzeylerinin yükleme kontrolü β -Actin ifadesine göre göreceli olarak belirlenmesi.

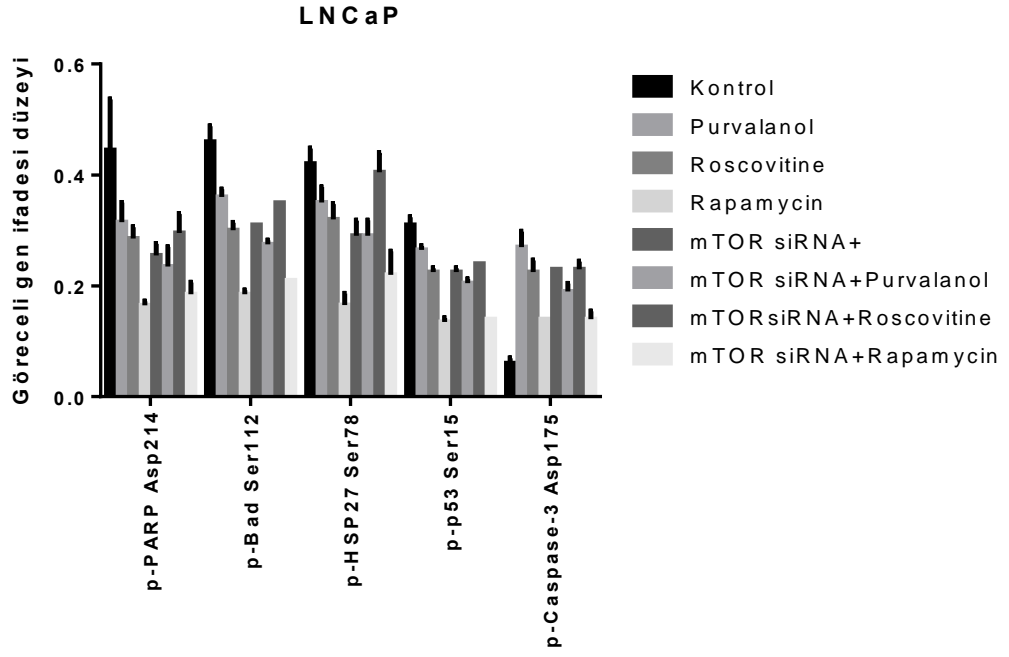


Şekil 3.24. CDK inhibitörleri ve mTOR inhibisyon/gen ifadesinin baskılanmasına yönelik LNCaP hücrelerinde PATHSCAN ELISA yöntemi ile

taranan apoptoz ilişkili hedeflerin ifade düzeylerinin yükleme kontrolü β -Actin ifadesine göre göreceli olarak belirlenmesi.

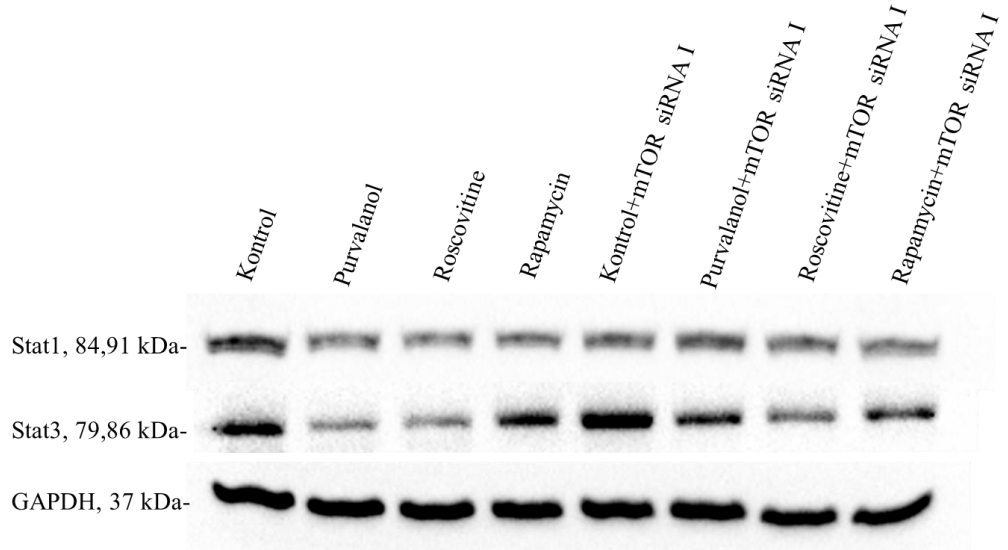


Şekil 3.25. CDK inhibitörleri ve mTOR inhibisyon/gen ifadesinin baskılanmasına yönelik LNCaP hücrelerinde PATHSCAN ELISA yöntemi ile taranan apoptoz ilişkili hedeflerin ifade düzeylerinin yükleme kontrolü β -Actin ifadesine göre göreceli olarak belirlenmesi.



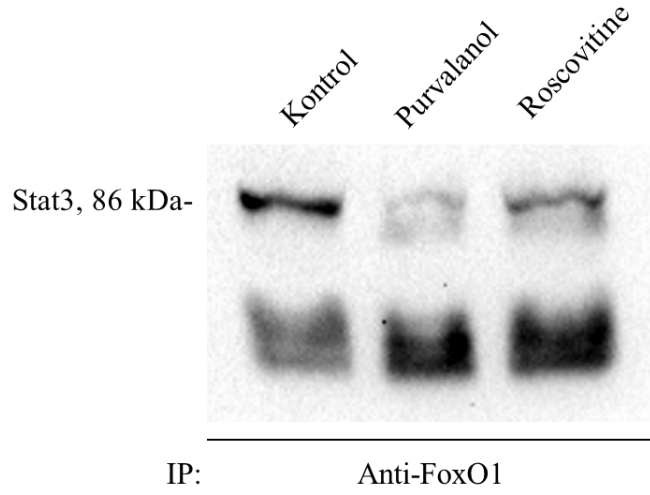
Şekil 3.26. CDK inhibitörleri ve mTOR inhibisyon/gen ifadesinin baskılanmasına yönelik LNCaP hücrelerinde PATHSCAN ELISA yöntemi ile taranan apoptoz ilişkili hedeflerin ifade düzeylerinin yükleme kontrolü β -Actin ifadesine göre göreceli olarak belirlenmesi.

LNCaP hücre hattında CDK inhibitörleri ve rapamycin, Stat1 ifadesini azaltmıştır; ancak mTOR susturmasıyla birlikte rapamycinin değil ama CDK inhibitörlerinin Stat1 ifadesini azaltıcı etkisi geri çekilmiştir. Stat3 anlatımına rapamycin tek başına etki etmemektedir. CDK inhibitörleri Stat3 ifadesini azaltırken, mTOR yoksunluğunda purvalanol uygulaması Stat3 ifadesini roscovitine'e göre daha belirgin bir biçimde arttırmıştır. Rapamycin tek başına Stat3 anlatımını değiştirmezken, mTOR susturmasıyla birlikte bu proteinin anlatımını azaltabilmiştir (Şekil 3.27).

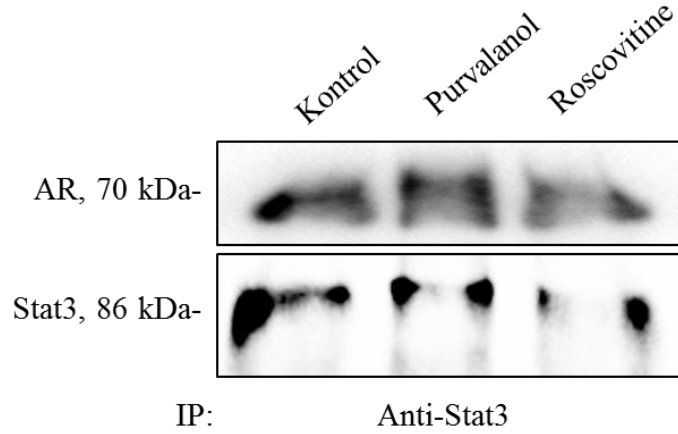


Şekil 3.27. LNCaP hücrelerinde CDK inhibitörleri purvalanol, roscovitine ve mTOR inhibitörü rapamycin'in tek başlarına ve her birinin ayrı ayrı 48 saatlik mTOR siRNA I transfeksiyonunda 24 saatlik uygulamalarını takiben Stat1 ve Stat3 seviyelerindeki değişimin immuno-blotlama yöntemiyle gösterimi. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

LNCaP hücre hattında purvalanol uygulaması Stat3-FoxO1 interaksyonunu roscovitine uygulamasından daha yüksek bir yetkinlikte indirirken, Stat3-AR interaksyonunun bozulmasında roscovitine daha etkili olmuştur (Şekil 3.28 ve Şekil 3.29).

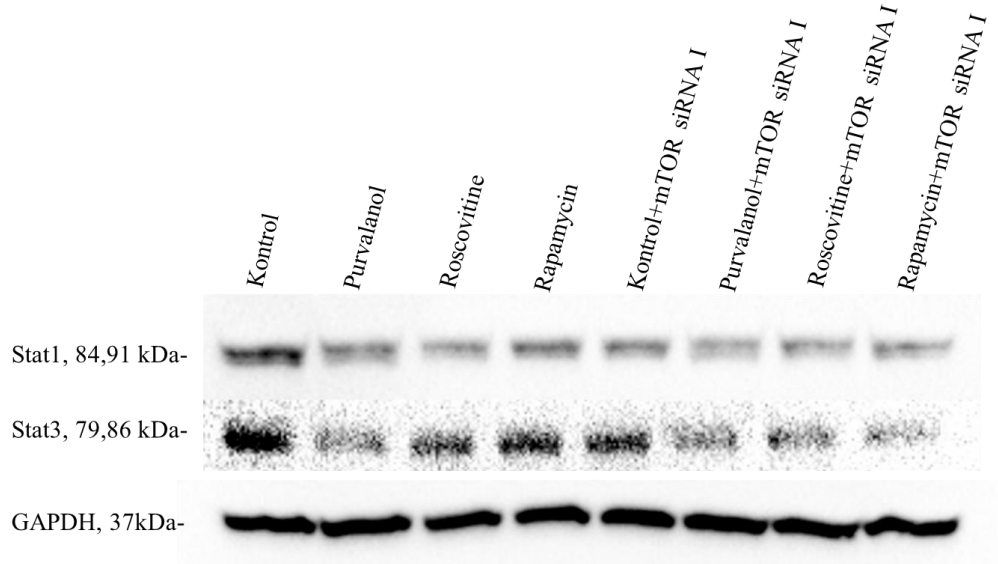


Şekil 3.28. LNCaP hücrelerinde CDK inhibitörleri purvalanol, roscovitine'nin 24 saatlik uygulamasıyla FoxO1-Stat3 interaksiyon profilindeki değişimin immunopresipitasyon yöntemiyle gösterimi.



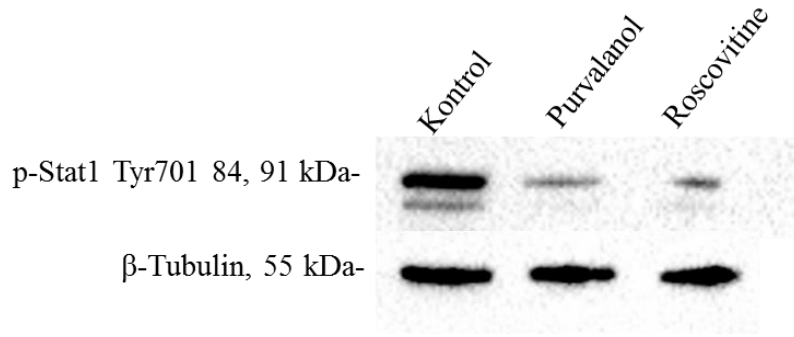
Şekil 3.29. LNCaP hücre hattında 24 saatlik purvalanol ve roscovitine uygulamasını takiben Stat3-AR interaksiyonundaki ve Stat3 seviyesindeki değişimin immunopresipitasyon yöntemi ile gösterimi.

DU 145 hücre hattında CDK inhibitörleri purvalanol veya roscovitine uygulaması Stat1 anlatımını rapamycine daha etkin bir şekilde azaltırken, mTOR susturması ile bu ilaçların Stat1 ifadesi üzerindeki etkinliği artmıştır. Roscovitine veya rapamycin tek başlarına Stat3 anlatımını etkilemezken, purvalanol uygulaması bu proteinin anlatımını dramatik olarak azaltmıştır. Ancak mTOR susturması ile birlikte CDK inhibitörleri veya rapamycin uygulanması Stat3 ifadesinin azalmasına yol açmıştır (Şekil 3.30).



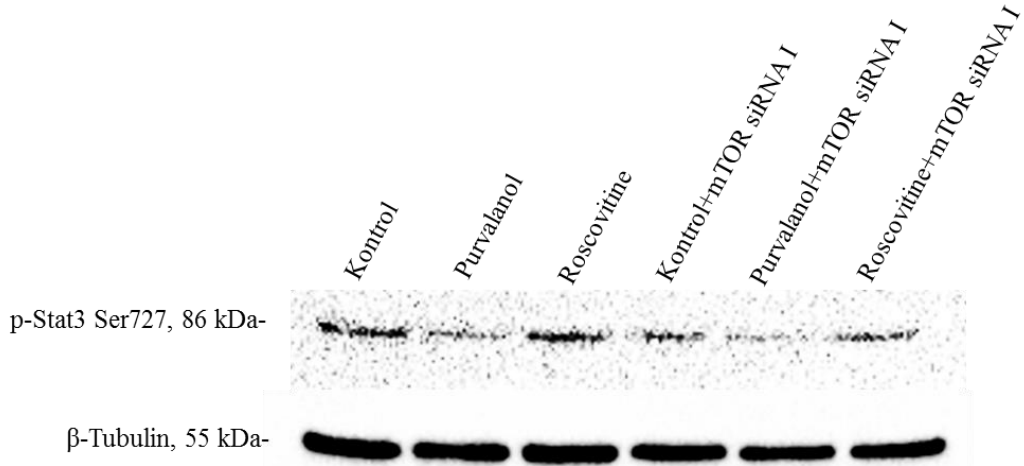
Şekil 3.30. DU145 hücre hattında CDK inhibitörleri purvalanol, roscovitine ve mTOR inhibitörü rapamycin'in tek başlarına ve herbirinin ayrı ayrı 48 saatlik mTOR siRNA I transfeksiyonunda 24 saatlik uygulamalarını takiben Stat1 ve Stat3 seviyelerindeki değişimin immuno-blotlama yöntemiyle gösterimi. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

Roscovitine'in, Stat1 Tyr701 fosforilasyonunun inhibisyonunda, purvalanolden daha etkin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.31).



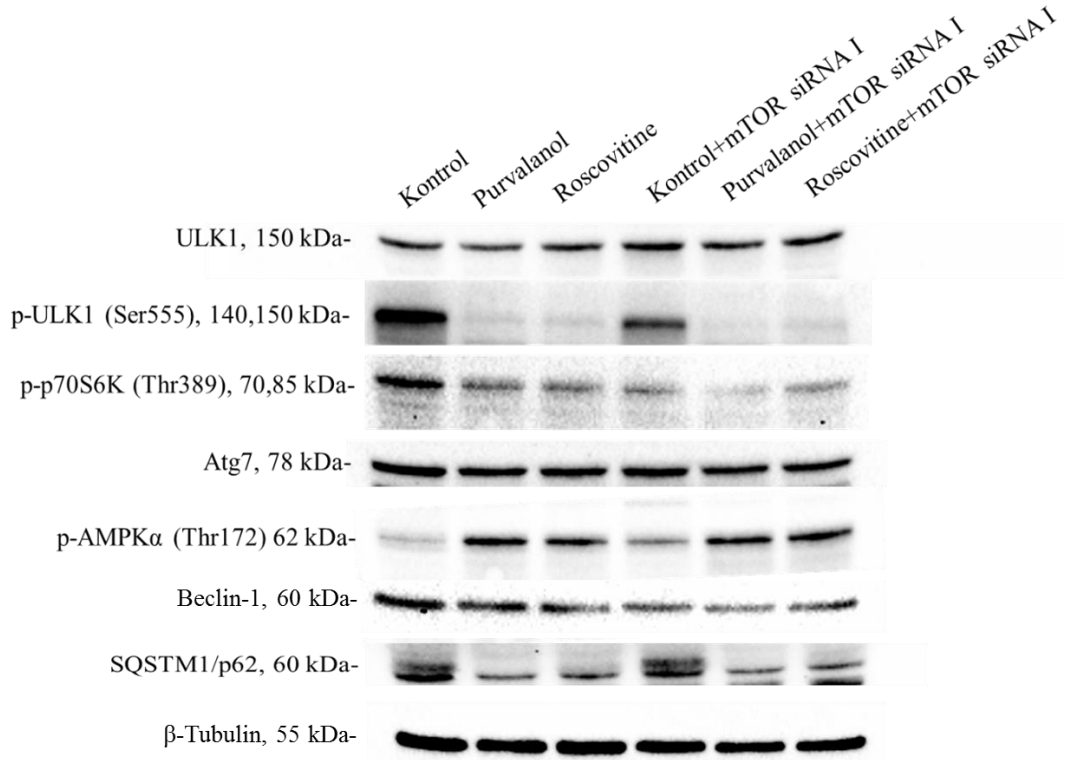
Şekil 3.31. DU145 hücrelerinde cdk inhibitörlerinden purvalanol ve roscovitine'nin 24 saatlik uygulamasını takiben p-Stat1 (Tyr701) proteini seviyesindeki değişimin immuno-presipitasyon yöntemi ile gösterimi. β -Tubulin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

Purvalanol, total Stat3 Ser727 fosforilasyonunu indirgemiş, roscovitine ise Stat3 fosforilasyon düzeyinde bir değişim oluşturmamıştır. mTOR susturması ile birlikte purvalanol ve roscovitinin Stat3 Ser727 fosforilasyonu üzerindeki etkinliği artmıştır (Şekil 3.32). Stat3 protein ifadelerindeki değişim immunoblotlama yöntemi ile gösterilememiştir.



Şekil 3.32. DU145 hücre hattında CDK inhibitörleri purvalanol, roscovitine ve mTOR inhibitörü rapamycin'in tek başlarına ve herbirinin ayrı ayrı 48 saatlik mTOR siRNA I transfeksiyonunda 24 saatlik uygulamalarını takiben p-Stat3 (Ser727) seviyelerindeki değişimin immuno-blotlama yöntemi ile gösterimi. β-Tubulin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

ULK1 protein ifadeleri, purvalanol veya roscovitine tarafından ve bu ilaçların mTOR siRNA ile birlikte uygulanmasıyla anlamlı bir değişikliğe uğramamıştır. ULK1 Ser555 ve p70S6K Thr389 fosforilasyon düzeyleri ise CDK inhibitörleriyle dramatik şekilde azalırken, mTOR susturması ile birlikte ULK1 Ser555 ve p70S6K fosforilasyonları üzerinde bu ilaçların etkinliği artmıştır. Ayrıca, purvalanol ve roscovitine AMPKα Thr172 fosforilasyonunu yükseltmiş, mTOR susturması da AMPKα fosforilasyon düzeyini arttırmıştır. Bununla birlikte mTOR susturması, CDK inhibitörlerinin AMPKα aktivasyonu üzerindeki etkisini değiştirmemiştir. SQSTM1/p62 anlatımı CDK inhibitörleri purvalanol ve roscovitine ile azalırken, mTOR yoksunluğu SQSTM1/p62 ifade düzeyini etkilememiştir. Purvalanol veya roscovitine tek başlarına ve mTOR yoksunluğunda Atg7 ifadesi üzerinde bir etki oluşturmamıştır. Roskovitin, purvalanole göre Beclin-1 ifadesinin azalmasında daha belirgin bir etki göstermiştir. Bununla birlikte, mTOR susturması roskovitin değil ama purvalanolün Beclin-1 anlatımı üzerindeki etkisini arttırmıştır (Şekil 3.33).



Şekil 3.33. DU145 hücrelerinde CDK inhibitörleri purvalanol, roscovitine ve mTOR inhibitörü rapamycin'in tek başlarına ve herbirinin ayrı ayrı 48 saatlik mTOR siRNA I transfeksiyonunda 24 saatlik uygulamalarını takiben ULK1, Atg7, Beclin-1, SQSTM1/p62 proteinlerinin anlatımlarında ve p-ULK1 (Ser555), p-p70S6K (Thr389), p-AMPK α (Thr172) düzeylerindeki değişimin immuno-blotlama yöntemi ile gösterimi. β -Tubulin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

4. TARTIŞMA

Prostat kanseri, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'daki erkeklerde en yüksek malignansi oranına sahip olup, kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır (Chism *ve ark.* 2014). Metastatik prostat kanserinde AR'nin transkripsiyonel aktivitesini baskılamaya yönelik standart bir uygulama olan androjen baskılama terapisi (ADT) birçok hastada daha agresif hormona dirençli prostat kanseri (HDPK) oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Yuan *ve ark.* 2014). Bununla birlikte immünolojik, kemik-hedefli ve sitotoksik kemoterapiler de metastatik prostat kanserine sahip erkeklerde tedaviye karşı direnç oluşmasını ve kanser hücrelerinin migrasyonunu engellemekte başarısız olmaktadır (Bitting *ve ark.* 2014).

mTOR sinyal yolağı hücre proliferasyonu, sağ kalımı ve migrasyonunda oldukça merkezi bir rol oynamaktadır (Iwamaru *ve ark.* 2007). Bu nedenle renal, prostat, meme, pankreas ve akciğer kanseri gibi hastalıklarda oldukça dikkat çekici bir terapötik hedef haline gelmiştir (Hou *ve ark.* 2007). Hepatoselüler karsinom vakalarının %48'inde anormal mTOR sinyali tespit edilmiş ve mTOR sinyal aktivasyonu ile başarısız tedavi sonuçlarının korelasyon gösterdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca hepatoselüler karsinom örneklerinin %71'inde invazyon, metastaz ve vaskülerizasyonla ilişkili olarak AKT Ser473 bölgesi fosforilasyonu görülmüştür (Grabinski *ve ark.* 2012). Biriken kanıtlar, mTOR sinyal yolağının prostatik epitelyumda prostat kanseri başlangıcını ve gelişimini teşvik ettiğini göstermiştir. Bununla birlikte, AKT ve mTOR-p70S6K sinyallerinin agresiflikle ve hormona dirençli prostat kanseri gelişimiyle ilişkili olduğu belirlenmiştir (Kobayashi *ve ark.* 2010).

mTOR inhibitörü rapamycin ve türevlerinin (CCI-779, RAD001 ve AP23573) mTORC1'i baskılayarak p70S6 kinaz inaktivasyonuna neden olmaktadır. Ancak klinik faz I/II çalışmaları, bu ajanların tek başlarına etkinliklerinin malignan tümör formlarına karşı düşük olduğunu göstermiştir. Rapalog uygulaması mTOR kinaz aktivitesini geridönüşümsüz olarak inhibe edememektedir. Bunun nedenlerinden biri, rapalogların mTOR kinazın katalitik noktası dışına bağlanmalarıdır. Diğer bir nedeni ise bu ilaçların yüksek doz uygulamaları haricinde mTORC2 inhibisyonuna karşı etkisiz oluşu ve mTORC2'nin AKT üzerinden yeniden mTORC1'i aktive etmesidir (Wang *ve*

ark. 2008). Ayrıca mTORC1'in rapamycin tarafından inhibisyonu, mTORC2 ve AKT'in alt yolağında bulunan AR'nin protein seviyesinin veya aktivitesinin artmasına neden olmaktadır (Wu ve ark. 2010) (Wang ve ark. 2008). Özellikle ilerlemiş kanser vakalarında, her fazda hücrenin bulunması terapötik anlamda problem oluşturmakla birlikte birinci faz kemoterapiden sonra hücresel direnç faktörlerinin artması ile birlikte ilaca cevapsızlık mekanizması açığa çıkmaktadır. mTOR yolağının hedef alınması ile ilaçların terapötik etkinlikleri artırılabilir (Jiang ve Liu 2008). Bu nedenle tez kapsamında mTOR'un siRNA'lar aracılığıyla bütünsel olarak susturulup, hücre sağ kalım yollarıyla interaksyonunun engellenerek CDK inhibitörleri purvalanol ve roscovitine'in etkinliğinin artırılması hedeflenmiştir.

CDK inhibitörleri roscovitine ve purvalanol güçlü apoptotik ajanlar olup, CDK'ların siklinler ile etkileşimlerini yarışıl bir etki göstererek engeller ve hücre siklusunda durmaya neden olarak hücre ölümünü tetiklemektedirler. Ancak hücre farklılıklar nedeni ile, her hücre tipinde aynı potansiyele sahip değildir. Son yıllarda araştırmacılar, farklı genomik özelliklere sahip kanser hücrelerinin, uygulanan terapötik stratejilere farklı yetkinlikte cevap verdiklerini ve bu durumun hücrelerin genotipik özellikleri ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Planche ve ark. 2011, Pomerantz ve Freedman 2011). Bu nedenle mTOR susturmasıyla birlikte CDK inhibitörlerinin etkinliği farklı genomik özelliklere sahip LNCaP, DU145 ve PC3 prostat kanseri hücre hatlarında araştırılmıştır.

Elde edilen veriler ile ilgili olarak tüm hücre hatlarında purvalanol ve roscovitine üzerindeki farklılıklar üzerinde durulmaktadır. Rapamycin yerine mTOR siRNA ile mTOR yolağı baskılandığında hücrelerde CDK inhibitörleri farklı etki göstermeye devam etmekle birlikte birçok hedef için mTOR yoksunluğu aktivitenin indirgenmesine neden olmuştur.

mTOR'un üst sinyal yolağı aktivatörü olan AKT, Thr308 ve Ser473 bölgelerinden fosforile olarak mTORC1'de yer alan PRAS40'nin fosforillenip mTOR kompleksinden ayrılmasını; bu sayede de mTOR sinyalinin oluşmasını sağlamaktadır. Yapılan bir çalışmada 20 µM purvalanolün PC3, MCF-7 ve MDA-MB231 hücre hatlarında AKT Thr 308 ve Ser473 fosforilasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmayla tutarlı olarak tez kapsamında elde edilen veriler de PC3 hücrelerinde purvalanolün AKT Thr 308 ve Ser473 fosforilasyonunu inhibe ettiğini göstermektedir. Ayrıca mTOR siRNA'nın mTORC2 oluşumunu engellediği Rictor protein ifadelerine bakılarak tespit edilmiştir (Şekil 3.1). mTORC2 kompleksi, AKT'ı Ser473 bölgesinden fosforillediği ve mTORC1'in yeniden aktivasyonunu sağladığı için için birçok kanser tipinde rapamycin gibi ilaçlara karşı direnç oluşmaktadır. mTOR siRNA

uygulamasını bu nedenle purvalanolün AKT Ser473 defosforilasyonu üzerindeki etkinliğini arttırmıştır. Diğer bir CDK inhibitörü roscovitine'in de purvalanolden daha etkin bir biçimde AKT Thr308 ve Ser473 inhibe ettiği ve mTOR susturmasıyla birlikte etkinliğinin arttığı belirlenmiştir. Bu nedenle roscovitine'in mTOR üst sinyal yolağında ve/veya mTOR kompleksleri üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. CDK inhibitörlerinin apoptotik indükleyiciler olarak mitokondriyal yolak üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Mitokondriyal membran potansiyelinin kaybına yol açan CDK inhibitörleri, ATP sentezinin inhibisyonuna neden olarak AMPK α 'nın Thr172 bölgesinden fosforilasyonunu sağladığı düşünülmektedir. AMPK α aktivasyonu TSC1/2'yi aktive ederek mTOR inhibisyonuna yol açar. Elimizdeki veriler purvalanol ve roscovitine'in AMPK α Thr172 fosforilasyonunu sağladığı ve mTOR Ser2448 defosforilasyonuna neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca, roscovitine + mTOR siRNA kombinasyonu roscovitine'in mTOR Ser2448 defosforilasyonu üzerindeki etkinliğini arttırmıştır. AMPK α 'nın CDK inhibitörleri tarafından aktivasyonu mTOR siRNA uygulaması ile geri çekilmektedir. Bunun nedeni olarak, mTOR yoksunluğunun purvalanol ve roscovitine'in hedef aldığı hücre ölüm cevabını oluşturan aşağı yolak moleküllerinin ifadesinin azalmasına yol açtığı ve bu sayede hücre içinde artan ATP/AMP oranının AMPK α fosforilasyonuna sebebiyet verdiği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda AMPK α aktivasyonu, hepato-karsinomla ilgili *in vitro* ve *in vivo* deneylerde hücre invazyonunu inhibe ettiği ve metastaz ilişkili MMP-9, VEGF ve Ang-1 moleküllerin ifadelerinin azalmasına yol açtığı gösterilmiştir (Park ve ark. 2014) GSK-3 β Ser9 fosforilasyonu, bu molekülün kinaz aktivitesini inhibe eder (Gao ve ark. 2014). Yapılan bir çalışmada mTOR susturmasının GSK-3 β Ser9 fosforilasyonunu inhibe ettiği ve böylece GSK-3 β 'nin aktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir (Zhang ve ark. 2006). Bu çalışmayla tutarlı olarak, mTOR siRNA uygulanması purvalanol ve roscovitine'in neden olduğu GSK-3 β inhibisyonunu geri çekmiştir. Buna paralel olarak, p-70S6K Thr389 fosforilasyonu purvalanol ve roscovitine uygulamasıyla artarken, mTOR susturmasıyla birlikte roscovitine'in neden olduğu p-70S6K aktivasyonu geri çekilmiştir. Purvalanol ise mTOR siRNA ile kombine durumda p-70S6K aktivitesi üzerinde anlamlı bir değişim oluşturmamıştır. Bununla birlikte, p-S6 ribozomal protein aktivasyonu CDK inhibitörleri tarafından inhibe edilmiş, mTOR susturması roscovitine'in S6 ribozomal protein üzerindeki etkinliğini arttırmıştır. mTOR siRNA ile birlikte purvalanol ise yalnız purvalanol uygulamasına karşın S6 ribozomal protein Ser235/236 fosforilasyonunu arttırmıştır. Yapılan bir çalışmada S6 ribozomal protein Ser235/236 bölgelerinden ERK1/2 alt sinyal yolağında bulunan RSK (ribozomal S6 kinaz) tarafından fosforile edildiği gösterilmiştir (Roux ve ark. 2007). Bu durum, purvalanolün RSK aktivitesi üzerinde

bir etkide bulunmadığı ve böylece S6 ribozomal proteinin RSK tarafından fosforile edildiğini akla getirmektedir. Ancak CDK inhibitörleri uygulamasını takiben mTOR Ser2448 ve p-S6 ribozomal protein defosforilasyonu ile p70S6K Thr389 fosforilasyonu birbirine zıt sonuçlar oluşturmuştur. Bu tutarsızlık, Pathscan ELISA yöntemi için gerekli protein lizatının en düşük sınırdaki kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Purvalanol ve roscovitine'in PRAS60 Thr246 fosforilasyonu üzerine etkisi bu ilaçların AKT fosforilasyonu üzerindeki etkisiyle uyumsuzdur. Bunun nedeni purvalanolün mTOR sinyal yolağında roscovitine'e göre daha yaygın bir etkide bulunduğu ve roscovitine'in mTOR'un geri aktivasyonuna yol açtığı düşünülmektedir. mTOR siRNA'nın roscovitine'in bu etkisinin geri çekilmesine neden olması ve purvalanolün PRAS40 Thr246 fosforilasyonu üzerine etkinliğini mTOR siRNA ile birlikte arttırması bu varsayımı güçlendirmektedir. MAPK yolağı, hücre döngüsü devamlılığını etkilerken, p38 aktivitesi CDK inhibitörleri tarafından yükseltgenmektedir. Yapılan bir çalışmada roscovitine'in, p38 aktivasyonuna ve ERK1/2 inhibisyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Atanasova ve ark. 2007). Başka bir çalışmada da ERK1/2 inhibisyonunun SAP/JNK Thr183/Tyr185 fosforilasyonuna neden olarak Bax ve Bak gibi proapoptotik proteinlerin ifadesini kontrol ettiği ve c-Jun anlatımını indüklediği tespit edilmiştir (Obakan ve ark. 2014). Roscovitine ve purvalanol uygulaması SAPK/JNK Thr183/Tyr185 ve p38 Thr180/Tyr182 fosforilasyonunun düzeylerinin artmasına neden olurken, ERK1/2'nin Thr202/Tyr204 bölgelerinden defosforilasyonuna yol açmıştır. SAP/JNK ve p38 aktivasyonu ile birlikte ERK1/2 inaktivasyonunun meydana gelmesi PC3 hücrelerinde CDK inhibitörlerine karşı apoptotik cevabın meydana geldiğini doğrulamaktadır. Bununla birlikte, mTOR yoksunluğunun bu CDK inhibitörlerinin SAP/JNK ve p38 aktivasyonuna ket vurucu etkisi, mTOR'un apoptotik karar sürecindeki etkinliğini doğrulamaktadır. Ancak, purvalanol ve roscovitine'in neden olduğu ERK1/2 inhibisyon derecesinin bu ilaçların mTOR siRNA kombinasyonu ile artması hücre sağ kalım yönünden anlamlı gözükmemektedir. Stat1 ve Stat3 proteinleri hücre sağ kalımı/hücre ölümü süreçlerinde genelde zıt roller üstlenmektedir. Ancak, farklı hücre tiplerinde dolayısıyla farklı genetik profillere sahip hücrelerde birlikte aktive/inaktive olabilmektedirler (Handel-Fernandez ve ark. 2009, Zhang ve ark. 2011, Resemann ve ark. 2014). Stat3 Tyr705 fosforilasyon düzeyleri CDK inhibitörleri tarafından artmıştır. Hücre sağ kalımında rol alan Stat3 proteininin Tyr705 fosforilasyonunun akciğer fibroblast hücrelerinde roscovitine uygulamasıyla yükseltildiği başka bir çalışmada da gösterilmiştir (Steinman ve ark. 2012). Stat1 genel olarak tümör baskılayıcı fonksiyona sahip olsa da, bazı çalışmalarda Stat1'in tümör oluşumunu teşvik edici özellik gösterdiği tespit edilmiştir (Regis ve ark. 2006). Ayrıca Stat1 ve

Stat3, SOCS (sitokin sinyali baskılayıcı) proteinleri üzerinden birbirlerini negatif olarak düzenlerler (Hong *ve ark.* 2002). Elde ettiğimiz veriler ışında purvalanol ve roscovitine Stat1'i aktive eden JAK1,2 proteinlerini inhibe ettiği ve böylece Stat3'ün aktivasyonuna neden olduğu düşünülmektedir. Anti-apoptotik genlerin aktivasyonunu sağlayarak hücre sağ kalımında rol oynayan Stat3 proteininin inaktivasyonu CDK inhibitörlerinin mTOR siRNA ile birlikte uygulanması durumunda gerçekleşmektedir. Roscovitine uygulamasıyla fosforilasyon seviyesi düşen, hücre ölümüyle ilişkili Stat1 proteinin aktivasyonu ise roscovitine'in mTOR siRNA ile birlikte uygulanmasıyla yükseltgenmiştir. Bununla birlikte mTOR susturması purvalanolün Stat1 inaktivasyonu üzerindeki etkinliğini arttırmıştır. Yapılan bir çalışmada p38 substratı olan HSP27 fosforilasyonunun keratinosit hücrelerinde roscovitine uygulamasıyla indüklendiği gösterilmiştir (Atanasova *ve ark.* 2005). Elimizdeki veriler, roscovitine'in HSP27 fosforilasyonunu arttırdığını doğrulamaktadır. Ancak, diğer bir CDK inhibitörü olan purvalanol ise HSP27 fosforilasyonunu indirgemıştır. Bununla birlikte purvalanol p38 fosforilasyonunu yükseltmiştir. Purvalanol uygulama grubunda HSP27 ve p38 fosforilasyon profili bu nedenle birbirleriyle uyuşmamaktadır. CDK inhibitörleri tarafından indüklenen kaspaz-3 aktivasyonunun, p38 fosforilasyonuna ve aktivasyonuna neden olduğu yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Atanasova *ve ark.* 2005). Bu nedenle, her iki CDK inhibitörlerinin uygulanmasını takiben yükseltegenen p38 fosforilasyonunun kaspaz-3 bağımlı şekilde meydana geldiği düşünülmektedir. HSP27 ve AKT interaksiyona girerek birbirlerinin aktivitesini düzenlerler (Schultz *ve ark.* 2012). mTOR siRNA uygulamasıyla roscovitine'in HSP27 üzerinde indirgeyici etkisinin artması ve purvalanolün HSP27 fosforilasyon düzeyini geri çekmesinin; mTOR siRNA'nın AKT aktivasyonunu inhibe etmesinden kaynaklandığını işaret etmektedir. Apoptotik belirteçler olan PARP Asp214 ve Kaspaz-3 Asp175 fosforilasyonları CDK inhibitörleri purvalanol ve roscovitine uygulamasıyla artmaktadır. Bu ilaçların mTOR siRNA ile birlikte uygulanması PARP fosforilasyonlarının indirgenmesine yol açmıştır. Bununla birlikte Bad Ser112 fosforilasyonundaki artış ilgili diğer apoptotik proteinlerin aktivasyonu ile uyuşmamaktadır. Örneklerdeki protein lizati konsantrasyonlarının düşük oluşunun bazı anlamsız çıktılara yol açtığı düşünülmektedir. Kaspaz-3 defosforilasyonunda ise purvalanole karşın mTOR siRNA + purvalanol uygulamasıyla anlamlı değişim meydana gelmezken, mTOR susturması roscovitine'in Kaspaz-3 fosforilasyonu üzerindeki etkinliğini geri çekmiştir. Bu apoptotik belirteçlere bakıldığında, mTOR'un apoptoz düzenleniminde de merkezi bir rol oynadığı ve mTOR yoksunluğunun PC3 hücrelerinde apoptotik cevapların oluşmasına ket vurucu etki yaptığı görülmektedir.

Tablo 4.1. CDK inhibitörlerinin mTOR siRNA varlığında/yokluğunda PC3 prostat kanseri hücrelerinde sağ kalım sinyal kaskadları üzerine etkisinin modellenmesi. Yalnız purvalanol ve roscovitine'in ilgili proteinlerin fosforilasyonu üzerindeki etkisi kontrol grubuna göre kıyaslanırken, bu ilaçların mTOR siRNA ile kombinasyonları, ilaçların tek başına olan etkilerine göre kıyaslanmıştır. NS (non-significant); değişim değerinin anlamlı olmadığını belirtmek için kullanılmıştır.

PC3	mTOR siRNA (-)		mTOR siRNA (+)	
	Purvalanol	Roscovitine	Purvalanol	Roscovitine
p-Akt Thr308	▼	▼	▼	▼
p-Akt Ser473	▼	▼	▼	▼
p-AMPK α Thr172	▲	▲	▼	▼
p-mTOR Ser2448	▼	▼	NS	▼
p-S6 Ribozomal Protein Ser235/236	▼	▼	▲	▼
p-GSK-3 β Ser9	▲	▲	▼	▼
p-p70S6K Thr389	▲	▲	NS	▼
p-PRAS40 Thr246	▼	▲	▼	▼
p-SAPK/JNK Thr183/Tyr185	▲	▲	NS	▼
p-ERK1/2 Thr202/Tyr204	▼	▼	▼	▼
p-p38 Thr180/Tyr182	▲	▲	NS	▼
p-Stat1 Tyr701	▼	▼	▼	▲
p-Stat3 Tyr705	▲	▲	▼	▼
p-PARP Asp214	▲	▲	▼	▼
p-Bad Ser112	▲	▲	▼	▼
p-HSP27 Ser78	▼	▲	▼	▼
p-Kaspaz-3 Asp175	▲	▲	NS	▼

AR pozitif LNCaP prostat kanseri hücre hattında AKT Thr308 ve Ser473 fosforilasyonları roscovitine uygulamasıyla indirgenmiştir. Yapılan bir çalışmada purvalanolün HCT116 kolon kanseri hücrelerinde ER stres aracılı apoptotik cevap oluşturduğu gösterilmiştir (Coker-Gurkan ve ark. 2015). Başka bir çalışmada ise, JEG-3 testis kanseri hücrelerinde ER stres koşulları altında AKT'in Thr308 bölgesindeki fosforilasyonu baskılanırken, Ser473 bölgesi fosforilasyonu indüklenmekte olduğu tespit edilmiştir (Yung ve ark. 2011). Bu nedenle purvalanol uygulamasıyla AKT Thr308 defosforilasyonu ve AKT Ser473 fosforilasyonunun meydana gelmesi, purvalanolün neden olduğu ER stresten kökenlenebileceğini işaret etmektedir. mTOR yoksunluğu purvalanol ve roscovitine'in AKT Thr308 fosforilasyonu üzerindeki etkinliklerinde anlamlı bir değişim meydana getirmemiştir. Bununla birlikte purvalanol tarafından indüklenen AKT'in mTORC2 aracılı sekonder fosforilasyonunun (Ser473 fosforilasyonu) mTOR siRNA uygulaması ile geri çekilmesi, mTOR kompleksleri oluşumlarının indirgenmiş olduğunu göstermektedir. PC3 hücrelerinden farklı olarak, CDK inhibitörleri LNCaP hücrelerinde AMPK α Thr172 fosforilasyonunun indirgenmesine yol açmaktadır. AMPK α bazı kanser hücrelerinde ikili rol oynamaktadır. AMPK α glikozis ve anjiyogenezle hücre sağ kalımını teşvik

ederken, diğ er yandan mTOR inhibisyonu üzerinden protein sentezi gibi anabolik süreçlerin baskılanmasına neden olmaktadır (Mizrachy-Schwartz *ve ark.* 2011). Elimizdeki veriler ışığında AMPK α 'nın LNCaP hücrelerinde hücre sağ kalım yolağında aktif olduğu ve CDK inhibitörlerinin AMPK α 'nın bu etkinliğini indirgediği düşünölmektedir. Purvalanolün değil ama roscovitine'in mTOR 2448 fosforilasyonunu azaltıcı etkisi bunu doğrulamaktadır. mTOR siRNA uygulaması, purvalanol ve/veya roscovitine'in AMPK α fosforilasyonu üzerindeki etkinliğinde anlamlı bir değişim oluşturmamıştır. Bununla birlikte, mTOR fosforilasyonunda anlamlı bir değişim meydana getirmeyen purvalanol, mTOR siRNA ile birlikte bu proteinin aktivitesini indirgerken, mTOR yoksunluğu roscovitine'in mTOR Ser2448 fosforilasyonu üzerindeki etkinliğinde bir değişime yol açmamıştır. LNCaP hücre hattında AKT Ser473 ve mTOR Ser2448 fosforilasyon profilleri, purvalanolün mTOR aktivasyonunda tek başına değil ama mTOR siRNA ile etki gösterdiğini işaret etmektedir. Roscovitine ise her iki hedef üzerinde de tek başına etkin gözökmektedir. Purvalanol tek başına mTOR üzerinde etkinliği bulunmasa da mTOR alt yolak elemanları p70S6 kinazın ve dolayısıyla S6 ribozomal protein Ser235/236 fosforilasyonlarını indirgemmiştir. Roscovitine sebep olduğu mTOR Ser2448 defosforilasyonu ile tutarlı olarak p70S6K ve S6 ribozomal proteinlerin aktivasyonlarını düşürmüştür. GSK-3 β Ser9 fosforilasyonu purvalanol ve roscovitine tarafından anlamlı bir değişikliğ e uğramamıştır. Bununla birlikte mTOR siRNA + purvalanol uygulaması purvalanole karşı n GSK-3 β fosforilasyonunun yükseltgenmesine neden olmuştur. Bu durum da aynı koşullar altında mTOR Ser2448 ve AKT Ser473 defosforilasyonu ile uyuşmaktadır. Yapılan çalışmalarda GSK-3 β 'nin AKT tarafından fosforilasyonunun inhibe edici özelliğ e olduğu gösterilmiştir (Zhang *ve ark.* 2006, Shin *ve ark.* 2011). Hücre döngüsünün devamlılığını ve hücre profilerasyonunu teşvik eden ERK1/2 Thr202/Tyr204 fosforilasyonunun roscovitine + mTOR siRNA ile artması ve hücre sağ kalımı ile ilişkili GSK-3 β 'in purvalanol + mTOR siRNA uygulamasıyla aktive olması; purvalanol ve roscovitine'in mTOR yoksunluğunda farklı hedefler üzerinde apoptotik etkinliklerini kaybettiklerini göstermektedir. CDK inhibitörleri uygulamasıyla kaspaz-3 aktivitesi artarken p38 aktivasyonunun indirgenmesi; LNCaP hücrelerinde p38 aktivasyonunun PC3 hücrelerinden farklı olarak kaspaz-3'ten bağımsız olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte PC3 hücrelerine benzer şekilde LNCaP hücrelerinde de Stat1 Tyr701 fosforilasyonu CDK inhibitörleri uygulamasını takiben azalmaktadır. Ayrıca her iki hücre hattında da roscovitine + mTOR siRNA, roscovitine'in Stat1 fosforilasyonunu inhibe edici etkisinin geri çekilmesine neden olmuştur. Purvalanol ve roscovitine tarafından tetiklenen kaspaz-3 aktivasyonu ve yalnız purvalanolün neden olduğu Bad

defosforilasyonu, ilgili kondisyonlar altındaki PARP Asp214 fosforilasyon profili ile anlamlı bir sonuç oluşturmamaktadır. LNCaP hücrelerinde mTOR yoksunluğu CDK inhibitörlerinin apoptotik etkinliklerinin indirgenmesinde anlamlı bir değişim meydana getirmemiştir. Stat1 Tyr701 fosforilasyonu ise, PC3 hücrelerine benzer şekilde purvalanol ve roscovitine tarafından inhibe edilmiş, roscovitine'in Stat1 fosforilasyonu üzerine etkisi mTOR yoksunluğunda geri çekilmiştir. Stat1 aktivasyonu ERK1, p38 ve JNK1 gibi moleküller tarafından düzenlenebilmektedir (Zhang *ve ark.* 2004). Bu açıdan, Stat1 Tyr701 fosforilasyonundaki inhibisyonun p38 aracılı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca roscovitine'in mTOR yoksunluğunda ERK1/2 fosforilasyonunu yükseltmesiyle; aynı kondisyonlarda Stat1 fosforilasyonu paralellik göstermektedir. Stat1 ve Stat3 aktivasyonu mTOR ile ilişkili birçok kinaz molekülü tarafından düzenlendiğinden, farklı sinyal yollarının interaksiyonunda ve entegrasyonunda önemli roller üstlendikleri düşünülmektedir.

Tablo 4.2. CDK inhibitörlerinin mTOR siRNA varlığında/yokluğunda LNCaP prostat kanseri hücrelerinde sağ kalım sinyal kaskadları üzerine etkisinin modellenmesi. Yalnız purvalanol ve roscovitine'in ilgili proteinlerin fosforilasyonu üzerindeki etkisi kontrol grubuna göre kıyaslanırken, bu ilaçların mTOR siRNA ile kombinasyonları, ilaçların tek başına olan etkilerine göre kıyaslanmıştır. NS (non-significant); değişim değerinin anlamlı olmadığını belirtmek için kullanılmıştır.

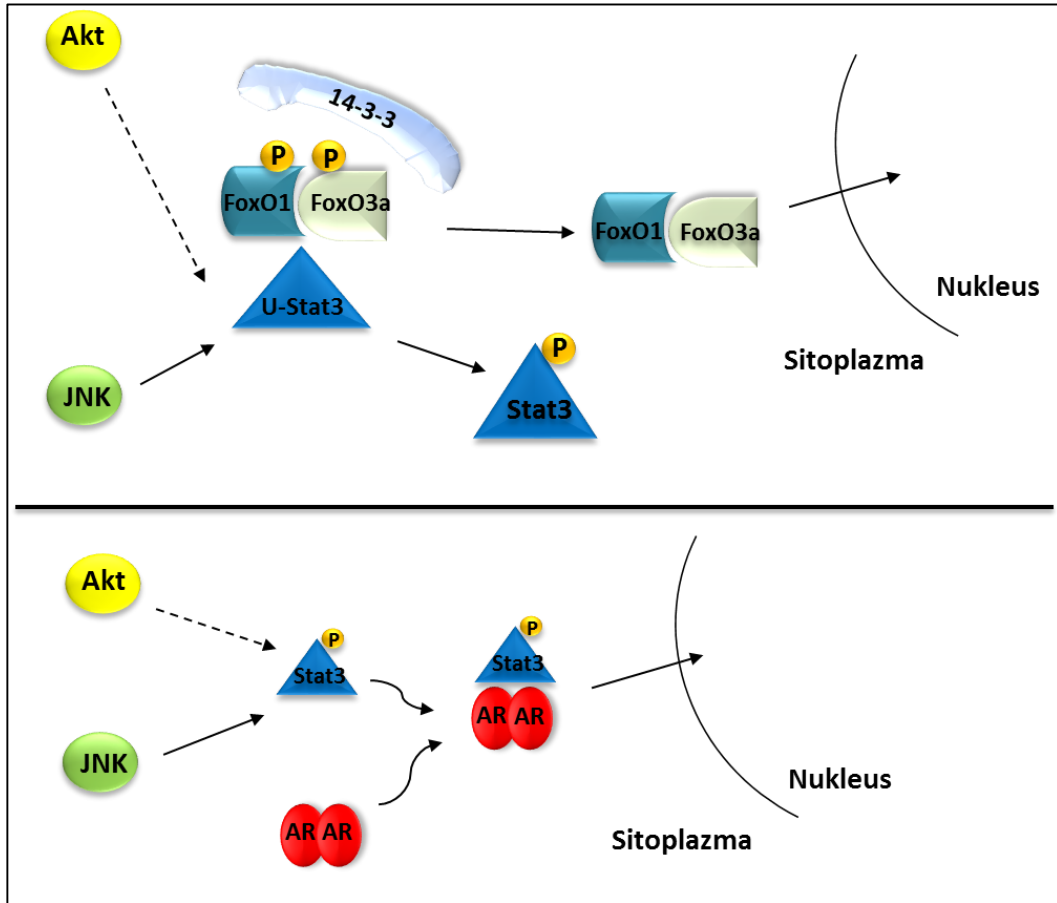
LNCaP	<i>mTOR siRNA (-)</i>		<i>mTOR siRNA (+)</i>	
	Purvalanol	Roscovitine	Purvalanol	Roscovitine
p-Akt Thr308	▼	▼	NS	NS
p-Akt Ser473	▲	▼	▼	NS
p-AMPKα Thr172	▼	▼	NS	NS
p-mTOR Ser2448	NS	▼	▼	NS
p-S6 Ribozomal Protein Ser235/236	▼	▼	NS	NS
p-GSK-3β Ser9	NS	NS	▼	NS
p-70S6K Thr389	▼	▼	NS	NS
p-PRAS40 Thr246	NS	NS	NS	NS
p-SAPK/JNK Thr183/Tyr185	NS	NS	NS	NS
p-ERK1/2 Thr202/Tyr204	NS	NS	NS	▲
p-p38 Thr/Tyr182	▼	▼	NS	NS
p-Stat1 Tyr701	▼	▼	NS	▲
p-Stat3 Tyr705	NS	NS	NS	NS
p-PARP Asp214	▼	▼	NS	NS
p-Bad Ser112	NS	▼	NS	NS
p-HSP27 Ser78	NS	NS	NS	NS
p-Kaspaz-3 Asp175	▲	▲	NS	NS

Stat1 ve 3 apoptotik mekanizmayı kontrol eden önemli hedefler olup mTOR kinaz aktivitesi ile düzenlenmektedirler (Zhang *ve ark.* 2012). Bu nedenle Stat1 ve stress ile aktive olan MAPK sinyal yolağının düzenlenmesi ile birlikte apoptotik karar

mekanizması mTOR bağımlı bir şekilde CDK inhibitörlerinin terapötik etkisini belirlemektedir. Bu nedenle PC3 ve LNCaP hücre hatlarında, mTOR yoksunluğunda CDK inhibitörlerinin apoptotik etkilerine karşı direnç Stat proteinleri düzenlenimleriyle meydana geldiği düşünülmektedir. LNCaP hücrelerinde purvalanol ve roscovitine tek başlarına ya da mTOR siRNA ile birlikte Stat3 Tyr705 fosforilasyonu üzerinde bir değişim gösterilememiştir. Pathscan analizi için gerekli protein lizatı konsantrasyonunun en alt sınırdan girilmesi nedeniyle, kemiluminesans ışımlar bazı örnek grupları için anlamlı biçimde kantitatif verilere dönüştürülemediği için Pathscan ELISA testi ile elde edilen verilerin doğrulanması amacıyla immuno-blotlama yöntemi kullanılmıştır.

LNCaP hücrelerinde CDK inhibitörleri purvalanol ve roscovitine, rapamycine göre Stat3 anlatımını etkin bir şekilde düşürmüştür. Bu nedenle kinaz inhibitörleri purvalanol ve roscovitine'in mTOR dışında AKT anlatımını üzerinde de etkin olduğu, böylece de Stat3 ifadesini etkin olarak inhibe ettiği düşünülmektedir. mTOR yoksunluğunda roscovitine'in ve yüksek etkinlikte purvalanolün Stat3 ekspresyonu üzerindeki etkilerini geri çekmeleri, androjen reseptörü aracılığıyla alternatif hücre sağ kalım yollarının aktivasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Stat1 ifadesinin rapamycin tarafından azaltılması, mTOR'un Stat1 ile fiziksel interaksyonu sonucunda gerçekleştiği varsayılmaktadır. mTOR aktivitesinin baskılanması Stat1 anlatımıyla ilgili genlerin aktivasyonuna neden olmaktadır (Fielhaber *ve ark.* 2009). mTOR siRNA uygulamasıyla roscovitine ve purvalanolün Stat1 ifadelerini arttırmaları bu mekanizmanın aktivasyonu sayesinde gerçekleştiğini işaret etmektedir (Şekil 3.27).

AKT'in önemli substratlarından biri olan FoxO1 (forkhead box O1), Stat3 ile ilişkisi bakımından önem arz etmektedir (Kim *ve ark.* 2011). Fosforilelen Stat3, 14-3-3 proteini ile birlikte inaktif pFoXO1/pFoXO3a kompleksinin dağılmasına neden olur ve böylece FoXO aracılı büyümeyi inhibe edici protein ekspresyonlarının azalmasına yol açar (Oh *ve ark.* 2012) (Şekil 4.1). İmmünopresipitasyon sonuçları purvalanol ve roscovitine uygulamasıyla Stat3'lerin fosforillendiğini ve böylece FoXO1 proteini ile interaksyonlarının azaldığını göstermektedir. Böylece purvalanol ve roscovitine'in FoXO1/FoXO3a'nın nukleusa göç ederek hücre büyümesini inhibe edici genlerin anlatımını yükselttiği düşünülmektedir. Bununla birlikte, PC3 hücrelerinde CDK inhibitörleri uygulamasıyla artan Stat3 Tyr705 fosforilasyon düzeyleri, LNCaP'ta elde edilen immünopresipitasyon sonucuyla paralellik göstermiştir. Ayrıca purvalanolün etkinliğinin Stat3-FoXO1 interaksyonunun bozulmasında roscovitine'e göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.28).

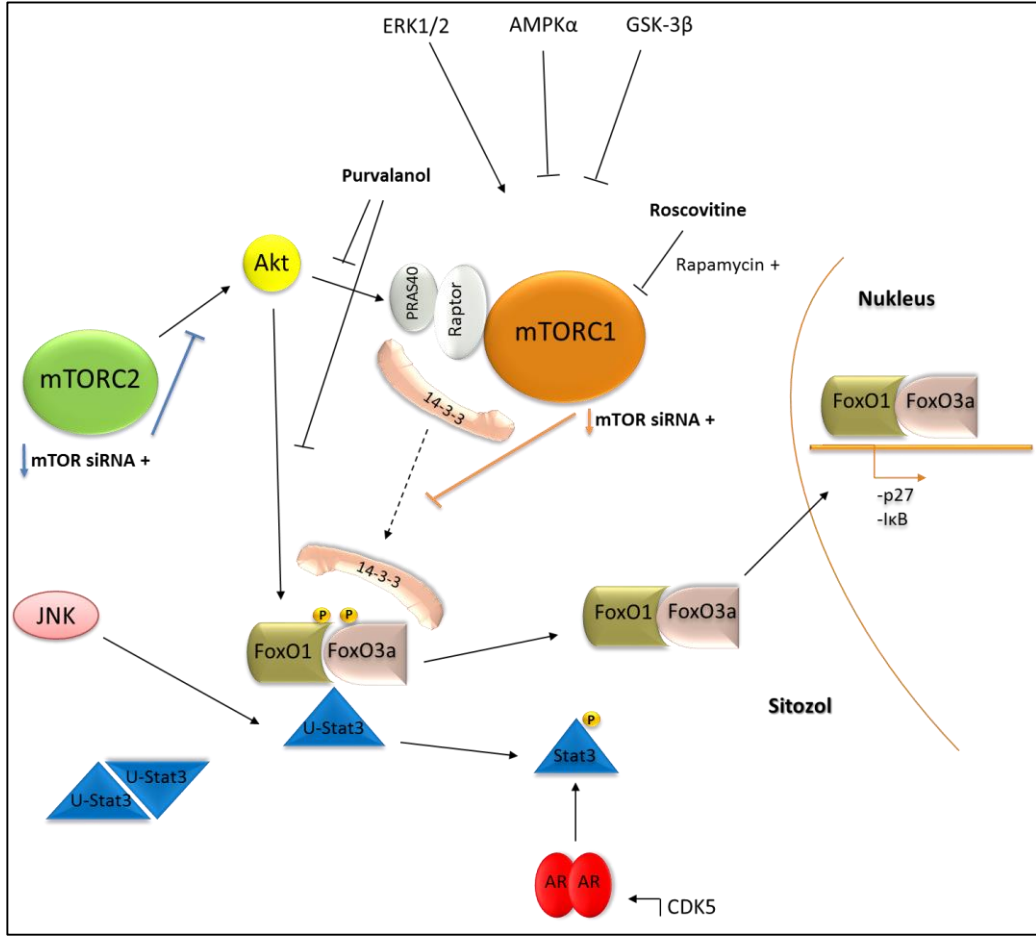


Şekil 4.1. LNCaP hücrelerinde hipotetik olarak Akt'ın FoxO1/FoxO3a-Stat3 kompleksine etkisi ve p-Stat3-AR ilişkisinin şematik olarak gösterimi. U-Stat3, defosforile durumdaki Stat3'ü ifade etmektedir.

Prostat kanseriyle ilgili yapılan çalışmalarda, Stat3 Ser727'nin nukleusa translokasyonu ve Stat3 ilişkili genlerin (*junB*, *c-fos*, *c-myc* ve *survivin*) anlatımı Cdk5 aktivasyonu tarafından düzenlendiği ve bu proteinin AR ile interaksiyona girerek, AR'nin protein stabilitesini ve transaktivasyonunu yükselttiği gösterilmiştir (Hsu ve ark. 2013) (Şekil 4.1). Cdk5 aktivitesini inhibe eden purvalanol ve roscovitine'in, prostat kanseri metastazında önemli roller oynayan bu moleküler interaksiyonlara etkisi immünopresipitasyon yöntemiyle incelenmiştir ve bu ilaçların AR-Stat3 interaksiyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil 3.29).

PC3 ve LNCaP hücrelerinde, Stat1 ve 3 moleküllerinin apoptotik karar mekanizmasında belirleyici olduğu göz önüne alınarak, DU145 hücre hattında da bu proteinlerin mTOR varlığında ve yoksunluğunda CDK inhibitörlerine verdiği cevaplar incelenmiştir. Purvalanol, roscovitine ve rapamycin DU145 hücrelerinde de Stat1 ifadesinin azaltmıştır. Bununla birlikte LNCaP hücrelerinden farklı olarak, DU145 hücre hattında mTOR yoksunluğu ilgili ilaçların Stat1 anlatımı üzerindeki etkinliklerini yükseltmiştir. Bu hücre hattında CDK inhibitörleri ve rapamycin uygulaması Stat3 ifadesinde, LNCaP hücrelerine benzer etkiler oluşturmuş; ancak mTOR siRNA ile birlikte bu ilaçlar Stat3 anlatımını azaltmıştır. DU145

hücrelerinde AR ifadesinin olmaması, mTOR yoksunluğunda Stat3'ün CDK inhibitörlerine karşı daha hassas bir hedef haline geldiğini işaret etmektedir (Şekil 3.30). DU145 hücre hattında roscovitine, Stat1 Tyr701 fosforilasyonunda purvalanole göre daha belirgin bir inhibisyona yol açmıştır (Şekil 3.31). CDK inhibitörleri uygulamasını takiben Stat1 fosforilasyonundaki değişimler ilgili üç hücre hattında da benzerdir. Stat3 Ser727 bölgesinden fosforillendiğinde nükleusa geçerek hedef onkogenlerin transkripsiyonel aktivasyonunu sağlar (Hsu *ve ark.* 2013). Bu nedenle DU145 hücrelerinde CDK inhibitörleri uygulamasını takiben Stat3 Ser727'nin sitoplazmik ve nükleer seviyeleri kontrol edilmiş; ancak nükleer kısımda β -Tubulin gözlemlenmesi nedeniyle anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Total Stat3 Ser727 fosforilasyonunun purvalanol tarafından indirgenmesine, purvalanolün ERK1/2 enzimi üzerindeki inhibitör etkisinin neden olduğu düşünülmektedir. mTOR yoksunluğu her iki CDK inhibitörünün Stat3'ün Ser727 bölgesinden fosforilasyonları üzerindeki etkinliğini arttırmıştır. mTOR üst yollarının özellikle purvalanol tarafından baskılanmasıyla birlikte, mTOR yoksunluğu Stat3'ün bu yollar üzerinden Ser727 fosforilasyonunu engellemiştir (Şekil 3.32). DU145 hücre hattında mTOR yoksunluğunun PC3 ve LNCaP hücrelerindeki benzer şekilde apoptoza ket vurucu bir sonuç oluşturmadığı düşünüldüğünden, bu hücre hattında otofajik belirteçler taranmıştır. Özellikle p-AMPK α ve SQSTM1/p62 protein düzeylerine bakıldığında mTOR yoksunluğunun, purvalanol ve roscovitine'in neden olduğu otofajik cevabı etkilemediği görülmüştür. Ayrıca ULK1, Atg7 ve Beclin-1 protein ifadeleri de mTOR yoksunluğunun, CDK inhibitörlerinin neden olduğu otofajik cevaptan kaçışta yeterli bir etkide bulunmadığını işaret etmektedir (Şekil 3.33). DU145 hücre hattında mTOR siRNA uygulamasının, purvalanol ve roscovitine'in 24. saatteki otofajik etkinliğini değiştirmede; ancak aynı sürede apoptotik cevabın oluşmasında ket vurucu bir etkiye sahip olduğu ve Stat proteinleri üzerinden siklin-CDK aktivasyonlarını etkilediği düşünülmektedir. Bu nedenle mTOR yoksunluğunda, CDK inhibitörlerinin DU145 hücrelerindeki otofajik etkinliklerinin zamana bağlı olarak araştırılması gerekmektedir. Ayrıca, ilgili hücre hatlarında CDK inhibitörleriyle birlikte mTOR yoksunluğunun hücre döngüsü düzenleyicileri üzerinde ne gibi etkiler yaptığının incelenmesi kritik önem taşımaktadır.



Şekil 4.2. Tez kapsamında incelenen mTOR sinyal yolağı ilişkili proteinlerin regülasyonlarına mTOR siRNA ve CDK inhibitörlerinin AR negatif PC3, DU145 ve AR pozitif LNCaP hücrelerinde etkisinin şematik olarak gösterimi.

Sonuç olarak, ilgili prostat kanseri hücre hatlarında mTOR yoksunluğu apoptotik karar mekanizmasına ket vurmaktadır. Bununla birlikte DU145 hücrelerinde mTOR siRNA ile birlikte CDK inhibitörlerinin uygulanması, LNCaP ve PC3 hücrelerinden farklı Stat3 anlatım profiline neden olmaktadır. Bu nedenle, DU145 hücrelerinde mTOR yoksunluğu CDK inhibitörlerinin otofaji ya da apoptoz ilişkili olarak değil ama Stat proteinleri aracılığıyla CDK'lar üzerinden hücre siklusuna etki ettiği düşünülmektedir (Şekil 4.2). mTOR protein ifadesini baskılayan CDK inhibitörleri farklı hücre sinyal yolaklarını da baskı altında tutarak apoptotik veya otofajik karara neden olabilmektedirler. mTOR proteinin bu nedenle belirli bir düzeyde hücrelerde bulunması her iki sinyal yolağı hedefleri açısından düzenleyici olup, CDK inhibitörleri erken cevap mekanizmasında terapötik etkiyi rapaloglar kadar etkili bir şekilde yansıtmamaktadırlar.

5. KAYNAKLAR

1. Albany, C., A. S. Alva, A. M. Aparicio, R. Singal, S. Yellapragada, G. Sonpavde ve N. M. Hahn (2011). "Epigenetics in prostate cancer." *Prostate Cancer* 2011: 580318.
2. Ashkenazi, A. (2008). "Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer." *Cytokine Growth Factor Rev* 19(3-4): 325-331.
3. Atanasova, G., R. Jans, N. Zhelev, V. Mitev ve Y. Poumay (2005). "Effects of the cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine) on the physiology of cultured human keratinocytes." *Biochem Pharmacol* 70(6): 824-836.
4. Atanasova, G. N., A. R. Isaeva, N. Zhelev, Y. Poumay ve V. I. Mitev (2007). "Effects of the CDK-inhibitor CYC202 on p38 MAPK, ERK1/2 and c-Myc activities in papillomavirus type 16 E6- and E7-transformed human keratinocytes." *Oncol Rep* 18(4): 999-1005.
5. Bach, S., M. Knockaert, J. Reinhardt, O. Lozach, S. Schmitt, B. Baratte, M. Koken, S. P. Coburn, L. Tang, T. Jiang, D. C. Liang, H. Galons, J. F. Dierick, L. A. Pinna, F. Meggio, F. Totzke, C. Schachtele, A. S. Lerman, A. Carnero, Y. Wan, N. Gray ve L. Meijer (2005). "Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase." *J Biol Chem* 280(35): 31208-31219.
6. Bettayeb, K., N. Oumata, A. Echalié, Y. Ferandin, J. A. Endicott, H. Galons ve L. Meijer (2008). "CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases." *Oncogene* 27(44): 5797-5807.
7. Bitting, R. L., D. Schaeffer, J. A. Somarelli, M. A. Garcia-Blanco ve A. J. Armstrong (2014). "The role of epithelial plasticity in prostate cancer dissemination and treatment resistance." *Cancer Metastasis Rev* 33(2-3): 441-468.
8. Bjorkoy, G., T. Lamark ve T. Johansen (2006). "p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates and the autophagy machinery." *Autophagy* 2(2): 138-139.
9. Bloom, J. ve M. Pagano (2003). "Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation." *Seminars in Cancer Biology* 13(1): 41-47.
10. Brenner, D. ve T. W. Mak (2009). "Mitochondrial cell death effectors." *Curr Opin Cell Biol* 21(6): 871-877.
11. Brundage, M. E., P. Tandon, D. W. Eaves, J. P. Williams, S. J. Miller, R. H. Hennigan, A. Jegga, T. P. Cripe ve N. Ratner (2014). "MAF mediates crosstalk between Ras-MAPK and mTOR signaling in NF1." *Oncogene* 33(49): 5626-5636.
12. Casimiro, M. C., M. Crosariol, E. Loro, Z. Li ve R. G. Pestell (2012). "Cyclins and cell cycle control in cancer and disease." *Genes Cancer* 3(11-12): 649-657.
13. Cetnar, J. P. ve T. M. Beer (2014). "Personalizing prostate cancer therapy: the way forward." *Drug Discov Today* 19(9): 1483-1487.
14. Chan, E. Y. (2009). "mTORC1 phosphorylates the ULK1-mAtg13-FIP200 autophagy regulatory complex." *Sci Signal* 2(84): pe51.
15. Chaudhari, B. R., R. F. Murphy ve D. K. Agrawal (2006). "Following the TRAIL to apoptosis." *Immunol Res* 35(3): 249-262.

16. Chen, J., E. Guerriero, K. Lathrop ve N. SundarRaj (2008). "Rho/ROCK signaling in regulation of corneal epithelial cell cycle progression." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(1): 175-183.
17. Chism, D. D., D. De Silva ve Y. E. Whang (2014). "Mechanisms of acquired resistance to androgen receptor targeting drugs in castration-resistant prostate cancer." *Expert Rev Anticancer Ther* 14(11): 1369-1378.
18. Chiu, S. C., S. P. Chen, S. Y. Huang, M. J. Wang, S. Z. Lin, H. J. Harn ve C. Y. Pang (2012). "Induction of apoptosis coupled to endoplasmic reticulum stress in human prostate cancer cells by n-butylidenephthalide." *PLoS One* 7(3): e33742.
19. Cillessen, S. A., C. J. Hess, E. Hooijberg, K. C. Castricum, P. Kortman, F. Denkers, W. Vos, M. A. van de Wiel, G. J. Schuurhuis, G. J. Ossenkoppele, C. J. Meijer ve J. J. Oudejans (2007). "Inhibition of the intrinsic apoptosis pathway downstream of caspase-9 activation causes chemotherapy resistance in diffuse large B-cell lymphoma." *Clin Cancer Res* 13(23): 7012-7021.
20. Coker-Gurkan, A., E. D. Arisan, P. Obakan, K. Akalln, U. Ozbey ve N. Palavan-Unsal (2015). "Purvalanol induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis and autophagy in a time-dependent manner in HCT116 colon cancer cells." *Oncology Reports* 33(6): 2761-2770.
21. Coppola, V., R. De Maria ve D. Bonci (2010). "MicroRNAs and prostate cancer." *Endocr Relat Cancer* 17(1): F1-17.
22. Croft, D. R. ve M. F. Olson (2006). "The Rho GTPase effector ROCK regulates cyclin A, cyclin D1, and p27Kip1 levels by distinct mechanisms." *Mol Cell Biol* 26(12): 4612-4627.
23. Dai, Y. (2003). "Cyclin-dependent kinase inhibitors." *Current Opinion in Pharmacology* 3(4): 362-370.
24. Denmeade, S. R. ve J. T. Isaacs (2002). "A history of prostate cancer treatment." *Nat Rev Cancer* 2(5): 389-396.
25. Dhillon, A. S., S. Hagan, O. Rath ve W. Kolch (2007). "MAP kinase signalling pathways in cancer." *Oncogene* 26(22): 3279-3290.
26. Doleckova, I., M. Cesnek, M. Dracinsky, J. Brynda, J. Voller, Z. Janeba ve V. Krystof (2013). "Synthesis and biological evaluation of guanidino analogues of roscovitine." *Eur J Med Chem* 62: 443-452.
27. Duiker, E. W., A. G. van der Zee, P. de Graeff, W. Boersma-van Ek, H. Hollema, G. H. de Bock, S. de Jong ve E. G. de Vries (2010). "The extrinsic apoptosis pathway and its prognostic impact in ovarian cancer." *Gynecol Oncol* 116(3): 549-555.
28. Dutta, P. ve W. X. Li (2013). "Role of the JAK-STAT Signalling Pathway in Cancer."
29. Eikenberry, S. E., J. D. Nagy ve Y. Kuang (2010). "The evolutionary impact of androgen levels on prostate cancer in a multi-scale mathematical model." *Biol Direct* 5: 24.
30. Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol* 35(4): 495-516.
31. Eskelinen, E. L. ve P. Saftig (2009). "Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease." *Biochim Biophys Acta* 1793(4): 664-673.
32. Faivre, S., G. Kroemer ve E. Raymond (2006). "Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents." *Nat Rev Drug Discov* 5(8): 671-688.
33. Fan, T.-J., L.-H. Han, R.-S. Cong ve J. Liang (2005). "Caspase Family Proteases and Apoptosis." *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 37(11): 719-727.
34. Fielhaber, J. A., Y. S. Han, J. Tan, S. Xing, C. M. Biggs, K. B. Joung ve A. S. Kristof (2009). "Inactivation of mammalian target of rapamycin increases STAT1 nuclear content and transcriptional activity in alpha4- and protein phosphatase 2A-dependent fashion." *J Biol Chem* 284(36): 24341-24353.

35. Fulda, S. ve K. M. Debatin (2006). "Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy." *Oncogene* 25(34): 4798-4811.
36. Funderburk, S. F., Q. J. Wang ve Z. Yue (2010). "The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond." *Trends Cell Biol* 20(6): 355-362.
37. Gao, X., Y. He, L. M. Gao, J. Feng, Y. Xie, X. Liu ve L. Liu (2014). "Ser9-phosphorylated GSK3beta induced by 14-3-3zeta actively antagonizes cell apoptosis in a NF-kappaB dependent manner." *Biochem Cell Biol* 92(5): 349-356.
38. Gobert Gosse, S., C. Bourgin, W. Q. Liu, C. Garbay ve G. Mouchiroud (2005). "M-CSF stimulated differentiation requires persistent MEK activity and MAPK phosphorylation independent of Grb2-Sos association and phosphatidylinositol 3-kinase activity." *Cell Signal* 17(11): 1352-1362.
39. Gomez-Millan, J., M. F. Lara, R. Correa Generoso, A. Perez-Rozos, Y. Lupianez-Perez ve J. A. Medina Carmona (2015). "Advances in the treatment of prostate cancer with radiotherapy." *Crit Rev Oncol Hematol* 95(2): 144-153.
40. Goodyear, S. ve M. C. Sharma (2007). "Roscovitine regulates invasive breast cancer cell (MDA-MB231) proliferation and survival through cell cycle regulatory protein cdk5." *Exp Mol Pathol* 82(1): 25-32.
41. Grabinski, N., F. Ewald, B. T. Hofmann, K. Staufer, U. Schumacher, B. Nashan ve M. Jucker (2012). "Combined targeting of AKT and mTOR synergistically inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells." *Mol Cancer* 11: 85.
42. Handel-Fernandez, M. E., D. Ilkovitch, V. Iragavarapu-Charyulu, L. M. Herbert ve D. M. Lopez (2009). "Decreased levels of both Stat1 and Stat3 in T lymphocytes from mice bearing mammary tumors." *Anticancer Res* 29(6): 2051-2058.
43. Harrison, D. A. (2012). "The Jak/STAT pathway." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(3).
44. Hong, F., B. Jaruga, W. H. Kim, S. Radaeva, O. N. El-Assal, Z. Tian, V.-A. Nguyen ve B. Gao (2002). "Opposing roles of STAT1 and STAT3 in T cell-mediated hepatitis: regulation by SOCS." *Journal of Clinical Investigation* 110(10): 1503-1513.
45. Hongmei, Z. (2012). "Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review."
46. Hou, G., L. Xue, Z. Lu, T. Fan, F. Tian ve Y. Xue (2007). "An activated mTOR/p70S6K signaling pathway in esophageal squamous cell carcinoma cell lines and inhibition of the pathway by rapamycin and siRNA against mTOR." *Cancer Lett* 253(2): 236-248.
47. Hsu, F. N., M. C. Chen, K. C. Lin, Y. T. Peng, P. C. Li, E. Lin, M. C. Chiang, J. T. Hsieh ve H. Lin (2013). "Cyclin-dependent kinase 5 modulates STAT3 and androgen receptor activation through phosphorylation of Ser(7)(2)(7) on STAT3 in prostate cancer cells." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305(8): E975-986.
48. Hudes, G. R., R. Kosierowski, R. Greenberg, H. E. Ramsey, S. C. Fox, R. F. Ozols, C. A. McAleer ve B. J. Giantonio (1995). "Phase II study of topotecan in metastatic hormone-refractory prostate cancer." *Invest New Drugs* 13(3): 235-240.
49. Hwang, H. C. ve B. E. Clurman (2005). "Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles." *Oncogene* 24(17): 2776-2786.
50. Iwamaru, A., Y. Kondo, E. Iwado, H. Aoki, K. Fujiwara, T. Yokoyama, G. B. Mills ve S. Kondo (2007). "Silencing mammalian target of rapamycin signaling by small interfering RNA enhances rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells." *Oncogene* 26(13): 1840-1851.
51. Jaffe, A. B. ve A. Hall (2005). "Rho GTPases: biochemistry and biology." *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 247-269.

52. Jeronimo, C., P. J. Bastian, A. Bjartell, G. M. Carbone, J. W. Catto, S. J. Clark, R. Henrique, W. G. Nelson ve S. F. Shariat (2011). "Epigenetics in prostate cancer: biologic and clinical relevance." *Eur Urol* 60(4): 753-766.
53. Ji, J. ve P. S. Zheng (2010). "Activation of mTOR signaling pathway contributes to survival of cervical cancer cells." *Gynecol Oncol* 117(1): 103-108.
54. Jiang, B. H. ve L. Z. Liu (2008). "Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment." *Drug Resist Updat* 11(3): 63-76.
55. Jin, H. O., Y. H. Lee, J. A. Park, J. H. Kim, S. E. Hong, H. A. Kim, E. K. Kim, W. C. Noh, B. H. Kim, S. K. Ye, Y. H. Chang, S. I. Hong, Y. J. Hong, I. C. Park ve J. K. Lee (2014). "Blockage of Stat3 enhances the sensitivity of NSCLC cells to PI3K/mTOR inhibition." *Biochem Biophys Res Commun* 444(4): 502-508.
56. Johansen, T. ve T. Lamark (2014). "Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins." *Autophagy* 7(3): 279-296.
57. Junttila, M. R., S. P. Li ve J. Westermarck (2008). "Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival." *FASEB J* 22(4): 954-965.
58. Khandrika, L., B. Kumar, S. Koul, P. Maroni ve H. K. Koul (2009). "Oxidative stress in prostate cancer." *Cancer Lett* 282(2): 125-136.
59. Kim, S. Y., J. Yoon, Y. S. Ko, M. S. Chang, J. W. Park, H. E. Lee, M. A. Kim, J. H. Kim, W. H. Kim ve B. L. Lee (2011). "Constitutive phosphorylation of the FOXO1 transcription factor in gastric cancer cells correlates with microvessel area and the expressions of angiogenesis-related molecules." *BMC Cancer* 11: 264.
60. Kim, W. T. ve W. J. Kim (2013). "MicroRNAs in prostate cancer." *Prostate Int* 1(1): 3-9.
61. Knockaert, M., P. Lenormand, N. Gray, P. Schultz, J. Pouyssegur ve L. Meijer (2002). "p42/p44 MAPKs are intracellular targets of the CDK inhibitor purvalanol." *Oncogene* 21(42): 6413-6424.
62. Kobayashi, T., Y. Shimizu, N. Terada, T. Yamasaki, E. Nakamura, Y. Toda, H. Nishiyama, T. Kamoto, O. Ogawa ve T. Inoue (2010). "Regulation of androgen receptor transactivity and mTOR-S6 kinase pathway by Rheb in prostate cancer cell proliferation." *Prostate* 70(8): 866-874.
63. Kommu, S. S., S. Bishara ve S. M. Edwards (2013). "Prostate Cancer Genetics." 135-146.
64. Kristal, A. R., K. B. Arnold, M. L. Neuhouser, P. Goodman, E. A. Platz, D. Albanes ve I. M. Thompson (2010). "Diet, supplement use, and prostate cancer risk: results from the prostate cancer prevention trial." *Am J Epidemiol* 172(5): 566-577.
65. Krysko, D. V., T. Vanden Berghe, K. D'Herde ve P. Vandenabeele (2008). "Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis." *Methods* 44(3): 205-221.
66. Lalier, L., P. F. Cartron, P. Juin, S. Nedelkina, S. Manon, B. Bechinger ve F. M. Vallette (2007). "Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis." *Apoptosis* 12(5): 887-896.
67. Lapenna, S. ve A. Giordano (2009). "Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer." *Nat Rev Drug Discov* 8(7): 547-566.
68. Levine, B. (2007). "Cell biology: autophagy and cancer." *Nature* 446(7137): 745-747.
69. Li, Z., C. Wang, X. Jiao, Y. Lu, M. Fu, A. A. Quong, C. Dye, J. Yang, M. Dai, X. Ju, X. Zhang, A. Li, P. Burbelo, E. R. Stanley ve R. G. Pestell (2006). "Cyclin D1 regulates cellular migration through the inhibition of thrombospondin 1 and ROCK signaling." *Mol Cell Biol* 26(11): 4240-4256.
70. Li, Z., C. Wang, G. Prendergast ve R. G. Pestell (2014). "Cyclin D1 Functions in Cell Migration." *Cell Cycle* 5(21): 2440-2442.

71. Lim, S. ve P. Kaldis (2013). "Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation." *Development* 140(15): 3079-3093.
72. Ma, R. W. ve K. Chapman (2009). "A systematic review of the effect of diet in prostate cancer prevention and treatment." *J Hum Nutr Diet* 22(3): 187-199; quiz 200-182.
73. Malik, A. R., M. Urbanska, M. Macias, A. Skalecka ve J. Jaworski (2013). "Beyond control of protein translation: what we have learned about the non-canonical regulation and function of mammalian target of rapamycin (mTOR)." *Biochim Biophys Acta* 1834(7): 1434-1448.
74. Malumbres, M. ve M. Barbacid (2001). "To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer." *Nat Rev Cancer* 1(3): 222-231.
75. Malumbres, M. ve M. Barbacid (2009). "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm." *Nat Rev Cancer* 9(3): 153-166.
76. Massague, J. (2004). "G1 cell-cycle control and cancer." *Nature* 432(7015): 298-306.
77. Mizrachy-Schwartz, S., N. Cohen, S. Klein, N. Kravchenko-Balasha ve A. Levitzki (2011). "Up-regulation of AMP-activated protein kinase in cancer cell lines is mediated through c-Src activation." *J Biol Chem* 286(17): 15268-15277.
78. Mizushima, N. (2007). "Autophagy: process and function." *Genes Dev* 21(22): 2861-2873.
79. Modi, H., L. Li, S. Chu, J. Rossi, J. K. Yee ve R. Bhatia (2011). "Inhibition of Grb2 expression demonstrates an important role in BCR-ABL-mediated MAPK activation and transformation of primary human hematopoietic cells." *Leukemia* 25(2): 305-312.
80. Mohamed, F. Z., Y. M. Hussien, M. M. AlBakry, R. H. Mohamed ve N. M. Said (2013). "Role of DNA repair and cell cycle control genes in ovarian cancer susceptibility." *Mol Biol Rep* 40(5): 3757-3768.
81. Mustika, R., A. Budiyanto, C. Nishigori, M. Ichihashi ve M. Ueda (2005). "Decreased expression of Apaf-1 with progression of melanoma." *Pigment Cell Res* 18(1): 59-62.
82. Nakayama, K. I. ve K. Nakayama (2006). "Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer." *Nat Rev Cancer* 6(5): 369-381.
83. Nikolettou, V., M. Markaki, K. Palikaras ve N. Tavernarakis (2013). "Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy." *Biochim Biophys Acta* 1833(12): 3448-3459.
84. Nomiya, T., H. Tsuji, S. Toyama, K. Maruyama, K. Nemoto, H. Tsujii ve T. Kamada (2013). "Management of high-risk prostate cancer: radiation therapy and hormonal therapy." *Cancer Treat Rev* 39(8): 872-878.
85. Obakan, P., G. Alkurt, B. KÖSe, A. ÇOKer GÜRkan, E. D. Arisan, D. CoŞKun ve Z. N. ÜNsal (2014). "Downregulation of c-Myc mediated ODC expression after purvalanol treatment is under control of upstream MAPK signaling axis in MCF-7 breast cancer cells." *Turkish Journal of Biology* 38: 867-879.
86. Oh, H. M., C. R. Yu, I. Dambuza, B. Marrero ve C. E. Egwuagu (2012). "STAT3 protein interacts with Class O Forkhead transcription factors in the cytoplasm and regulates nuclear/cytoplasmic localization of FoxO1 and FoxO3a proteins in CD4(+) T cells." *J Biol Chem* 287(36): 30436-30443.
87. Oh, W. J. ve E. Jacinto (2014). "mTOR complex 2 signaling and functions." *Cell Cycle* 10(14): 2305-2316.
88. Pang, Y., C. Y. F. Young ve H. Yuan (2010). "MicroRNAs and prostate cancer." *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 42(6): 363-369.
89. Park, M. T. ve S. J. Lee (2003). "Cell cycle and cancer." *J Biochem Mol Biol* 36(1): 60-65.
90. Park, S. Y., Y. K. Lee, W. S. Lee, O. J. Park ve Y. M. Kim (2014). "The involvement of AMPK/GSK3-beta signals in the control of metastasis and

- proliferation in hepato-carcinoma cells treated with anthocyanins extracted from Korea wild berry Meoru." *BMC Complement Altern Med* 14: 109.
91. Pattingre, S. ve B. Levine (2006). "Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer?" *Cancer Res* 66(6): 2885-2888.
 92. Pavlides, S., I. Vera, R. Gandara, S. Sneddon, R. G. Pestell, I. Mercier, U. E. Martinez-Outschoorn, D. Whitaker-Menezes, A. Howell, F. Sotgia ve M. P. Lisanti (2012). "Warburg meets autophagy: cancer-associated fibroblasts accelerate tumor growth and metastasis via oxidative stress, mitophagy, and aerobic glycolysis." *Antioxid Redox Signal* 16(11): 1264-1284.
 93. Planche, A., M. Bacac, P. Provero, C. Fusco, M. Delorenzi, J. C. Stehle ve I. Stamenkovic (2011). "Identification of prognostic molecular features in the reactive stroma of human breast and prostate cancer." *PLoS One* 6(5): e18640.
 94. Platz, E. A. ve E. Giovannucci (2004). "The epidemiology of sex steroid hormones and their signaling and metabolic pathways in the etiology of prostate cancer." *J Steroid Biochem Mol Biol* 92(4): 237-253.
 95. Pomerantz, M. M. ve M. L. Freedman (2011). "The genetics of cancer risk." *Cancer J* 17(6): 416-422.
 96. Portt, L., G. Norman, C. Clapp, M. Greenwood ve M. T. Greenwood (2011). "Anti-apoptosis and cell survival: a review." *Biochim Biophys Acta* 1813(1): 238-259.
 97. Provenzano, P. P. ve P. J. Keely (2011). "Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase signaling." *J Cell Sci* 124(Pt 8): 1195-1205.
 98. Reese, A. C., G. Casey ve J. S. Witte (2012). "Hereditary Prostate Cancer and Genetic Risk." 79-101.
 99. Regis, G., L. Conti, D. Boselli ve F. Novelli (2006). "IFN γ R2 trafficking tunes IFN γ -STAT1 signaling in T lymphocytes." *Trends Immunol* 27(2): 96-101.
 100. Resemann, H. K., C. J. Watson ve B. Lloyd-Lewis (2014). "The Stat3 paradox: a killer and an oncogene." *Mol Cell Endocrinol* 382(1): 603-611.
 101. Roux, P. P., D. Shahbazian, H. Vu, M. K. Holz, M. S. Cohen, J. Taunton, N. Sonenberg ve J. Blenis (2007). "RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation." *J Biol Chem* 282(19): 14056-14064.
 102. Saad, F. ve K. Miller (2014). "Treatment options in castration-resistant prostate cancer: current therapies and emerging docetaxel-based regimens." *Urol Oncol* 32(2): 70-79.
 103. Santarpia, L., S. M. Lippman ve A. K. El-Naggar (2012). "Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy." *Expert Opin Ther Targets* 16(1): 103-119.
 104. Satyanarayana, A. ve P. Kaldis (2009). "Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms." *Oncogene* 28(33): 2925-2939.
 105. Sayers, T. J. (2011). "Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy." *Cancer Immunol Immunother* 60(8): 1173-1180.
 106. Schultz, C. R., W. A. Golembieski, D. A. King, S. L. Brown, C. Brodie ve S. A. Rempel (2012). "Inhibition of HSP27 alone or in combination with pAKT inhibition as therapeutic approaches to target SPARC-induced glioma cell survival." *Mol Cancer* 11: 20.
 107. Shen, M. M. ve C. Abate-Shen (2010). "Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges." *Genes Dev* 24(18): 1967-2000.
 108. Shin, S., L. Wolgamott, Y. Yu, J. Blenis ve S. O. Yoon (2011). "Glycogen synthase kinase (GSK)-3 promotes p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) activity and cell proliferation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(47): E1204-1213.

109. Siegel, R. L., K. D. Miller ve A. Jemal (2015). "Cancer statistics, 2015." *CA Cancer J Clin* 65(1): 5-29.
110. Song, J. H., D. K. Song, B. Pyrzynska, K. C. Petruk, E. G. Van Meir ve C. Hao (2003). "TRAIL triggers apoptosis in human malignant glioma cells through extrinsic and intrinsic pathways." *Brain Pathol* 13(4): 539-553.
111. Song, Y., C. Zhao, L. Dong, M. Fu, L. Xue, Z. Huang, T. Tong, Z. Zhou, A. Chen, Z. Yang, N. Lu ve Q. Zhan (2008). "Overexpression of cyclin B1 in human esophageal squamous cell carcinoma cells induces tumor cell invasive growth and metastasis." *Carcinogenesis* 29(2): 307-315.
112. Steinman, R. A., A. R. Robinson ve C. A. Feghali-Bostwick (2012). "Antifibrotic effects of roscovitine in normal and scleroderma fibroblasts." *PLoS One* 7(11): e48560.
113. Stenman, U. H., J. Leinonen, W. M. Zhang ve P. Finne (1999). "Prostate-specific antigen." *Semin Cancer Biol* 9(2): 83-93.
114. Tan, M. H., J. Li, H. E. Xu, K. Melcher ve E. L. Yong (2015). "Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery." *Acta Pharmacol Sin* 36(1): 3-23.
115. Tannoch, V. J., P. W. Hinds ve L. H. Tsai (2000). "Cell cycle control." *Adv Exp Med Biol* 465: 127-140.
116. Tomao, L., D. Sbardella, M. Gioia, A. Di Masi, S. Marini, P. Ascenzi ve M. Coletta (2014). "Characterization of the prostate-specific antigen (PSA) catalytic mechanism: a pre-steady-state and steady-state study." *PLoS One* 9(7): e102470.
117. Vainchenker, W. ve S. N. Constantinescu (2013). "JAK/STAT signaling in hematological malignancies." *Oncogene* 32(21): 2601-2613.
118. Venkateswaran, V. ve L. H. Klotz (2010). "Diet and prostate cancer: mechanisms of action and implications for chemoprevention." *Nat Rev Urol* 7(8): 442-453.
119. Verma, M., P. Patel ve M. Verma (2011). "Biomarkers in prostate cancer epidemiology." *Cancers (Basel)* 3(4): 3773-3798.
120. Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele ve Z. N. Berneman (2003). "The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer." *Cell Prolif* 36(3): 131-149.
121. Villalonga, P., P. Villalonga ve A. J. Ridley (2006). "Rho GTPases and cell cycle control." *Growth Factors* 24(3): 159-164.
122. Wang, S. ve W. S. El-Deiry (2003). "TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors." *Oncogene* 22(53): 8628-8633.
123. Wang, Y., M. Mikhailova, S. Bose, C. X. Pan, R. W. deVere White ve P. M. Ghosh (2008). "Regulation of androgen receptor transcriptional activity by rapamycin in prostate cancer cell proliferation and survival." *Oncogene* 27(56): 7106-7117.
124. Watson, C. J. (2006). "Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ." *Breast Cancer Res* 8(2): 203.
125. Wu, Y., R. R. Chhipa, J. Cheng, H. Zhang, J. L. Mohler ve C. Ip (2010). "Androgen receptor-mTOR crosstalk is regulated by testosterone availability: implication for prostate cancer cell survival." *Anticancer Res* 30(10): 3895-3901.
126. Xu, X., L. Ye, K. Araki ve R. Ahmed (2012). "mTOR, linking metabolism and immunity." *Semin Immunol* 24(6): 429-435.
127. Yan, N. ve Y. Shi (2005). "Mechanisms of apoptosis through structural biology." *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 35-56.
128. Yang, Z. J., C. E. Chee, S. Huang ve F. A. Sinicrope (2011). "The role of autophagy in cancer: therapeutic implications." *Mol Cancer Ther* 10(9): 1533-1541.

129. Yin, X., Y. Qi, M. Ren, S. Wang, H. Jiang, H. Feng ve S. Cui (2015). "Roscovitine treatment caused impairment of fertilizing ability in mice." *Toxicol Lett* 237(3): 200-209.
130. Youle, R. J. ve M. Karbowski (2005). "Mitochondrial fission in apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(8): 657-663.
131. Yuan, X., C. Cai, S. Chen, S. Chen, Z. Yu ve S. P. Balk (2014). "Androgen receptor functions in castration-resistant prostate cancer and mechanisms of resistance to new agents targeting the androgen axis." *Oncogene* 33(22): 2815-2825.
132. Yung, H. W., D. S. Charnock-Jones ve G. J. Burton (2011). "Regulation of AKT phosphorylation at Ser473 and Thr308 by endoplasmic reticulum stress modulates substrate specificity in a severity dependent manner." *PLoS One* 6(3): e17894.
133. Zhang, H. H., A. I. Lipovsky, C. C. Dibble, M. Sahin ve B. D. Manning (2006). "S6K1 regulates GSK3 under conditions of mTOR-dependent feedback inhibition of Akt." *Mol Cell* 24(2): 185-197.
134. Zhang, J., Y. Zhang, D. J. Dutta, A. T. Argaw, V. Bonnamain, J. Seto, D. A. Braun, A. Zameer, F. Hayot, C. B. Lopez, C. S. Raine ve G. R. John (2011). "Proapoptotic and antiapoptotic actions of Stat1 versus Stat3 underlie neuroprotective and immunoregulatory functions of IL-11." *J Immunol* 187(3): 1129-1141.
135. Zhang, Y., Y. Y. Cho, B. L. Petersen, F. Zhu ve Z. Dong (2004). "Evidence of STAT1 phosphorylation modulated by MAPKs, MEK1 and MSK1." *Carcinogenesis* 25(7): 1165-1175.
136. Zhang, Y., J. W. Zhang, G. Y. Lv, S. L. Xie ve G. Y. Wang (2012). "Effects of STAT3 gene silencing and rapamycin on apoptosis in hepatocarcinoma cells." *Int J Med Sci* 9(3): 216-224.
137. Zhou, H. ve S. Huang (2010). "The complexes of mammalian target of rapamycin." *Curr Protein Pept Sci* 11(6): 409-424.
138. Zorlu, F., R. T. Divrik, S. Eser ve K. Yorukoglu (2014). "Prostate Cancer Incidence in Turkey: An Epidemiological Study." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15(21): 9125-9130.

6. EKLER

Ek A: Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar

Tablo 6.1. Kullanılan cihazların listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Buzdolabı (No frost)	4263TMB	Arçelik
ChemiDoc Görüntüleme Cihazı	1708280	Bio-Rad
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Dikey akışlı güvenlik kabini	Model:	HeraSafe
Distile Su Cihazı	D56412	TKA-Pacific
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low	New Brunswick
DynaMag-2 Magnet	12321D	Life Technologies
Elektroforez sistemi	165-8000	Bio-Rad
Elektroforez transfer sistemi	170-4155	Bio-Rad
Elektroporator	Micropulser	BioRad
Floresan ataçmanlı invert mikroskop	Model: 1X71	Olympus
Fluorometre	Fluoroskan	Thermo Labsystems
Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Hemositometre	Z359629	Sigma Aldrich
HPLC	1200 series	Agilent
Invert Mikroskop	XDS-1B	SOIF
İnkübatör	EN 025	Nüve
Kar-buz makinası	AF80	Scotsman
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab
Masaüstü soğutmalı santrifüj	5417R	Eppendorf
Mikropipet (0,5µl-10µl)	EH52836	Thermo Scientific
Mikropipet (2µl-20µl)	CJ17240	Thermo Scientific
Mikropipet (20µl-200µl)	EH46925	Thermo Scientific
Mikropipet (200µl-1000µl)	T27274	Thermo Scientific
Mikroplaka okuyucu,	680	Bio-Rad
Otoklav	OTO32	Nüve

Pathscan lamı	7323	Cell Signalling Technology
pH Metre	N315	SEM/Mettler Toledo
PVDF Membran	88518	Thermo Scientific
Sıvı azot tankı ve ikmal tankı	Arpege 40	Air Liquid
Spektrofotometre	Ultraspec 2100	Biosciences
Tartı	LE6202S	Sartorius
Tüp rotasyon aleti	SRT9D	Stuart
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab
X-ray Film	34090	Thermo Scientific

Ek B: Hücre Kültüründe Kullanılan Sarf Malzeme

Tablo 6.2. Hücre kültürü donanımları

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
100 mm petri	93100	TPP
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
25cm ² hücre büyütme kapları	90026	TPP
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
60 mm petri	93060	TPP
75cm ² hücre büyütme kapları	90076	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
DU 145 hücre hattı	CRL2698	ATCC
Fetal Bovine Serum	P291509	Pan Biotech
Kriyovial tüp	V7634	NUNC
LNCaP hücre hattı	CRL1740	ATCC
PC3 hücre hattı	CRL1435	ATCC
Penisilin/Streptomisin	P06-07100	Pan Biotech
RPMI besiyeri	21875	GIBCO
Steril pipetler (10ml)	94010	TPP
Steril pipetler (5ml)	94005	TPP
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	99722	TPP
Tripsin-EDTA	P10-0231	Pan Biotech

Ek C: Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 6.3. Kullanılan kimyasalların listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
10X PBS	P04-53500	Pan Biotech
2-merkaptoetanol	S4805940517	Merck
Akrilamid / Bis-	A3699	Sigma Aldrich
Amonyum persülfat	A3678	Sigma Aldrich
AR antikoru	SC-816	Santa Cruz Biotech
Autophagy Antibody Sampler Kit	4445	Cell Signalling Technology
cOmplete EDTA-free proteaz inhibitör koktail tabletleri	04693132001	Roche
cOmplete Lysis-M lizis tamponu	14403122	Roche
Coomassie Blue	500-0006	Bio-Rad
DMSO	D5879	Sigma Aldrich
DTT	D0632	Sigma Aldrich
Dynabeads Protein G	10007D	Life Technologies
EDTA	A3452	Sigma Aldrich
Etanol	A3452	Sigma Aldrich
Fetal Bovine Serum	P290310	Pan Biotech
Fosfo-4EBP1 (Thr70) Antikoru	9455	Cell Signalling Technology
FoxO1 antikoru	2880	Cell Signalling Technology
Glisin	A1067	AppliChem
Hidrojen peroksit	K39218400838	MERCK
İzopropanol	24137	Rieel-de Haen
Laemli Tamponu	S3401	Sigma Aldrich

Loading Control Antibody Sampler Kit (HRP Conjugate)	4670	Cell Signalling Technology
Luminol	A8511	Sigma Aldrich
Metanol	24229	Sigma Aldrich
mTOR Pathway Antibody Sampler Kit	9964	Cell Signalling Technology
mTOR Substrates Antibody Sampler Kit	9862	Cell Signalling Technology
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	78833	Thermo Scientific
Page Ruller Prestained	SM0671	Fermentas
Pathscan Intracellular Signalling Array Kit (Chemiluminescent	7323	Cell Signalling Technology
p-Coumaric Asit	C9008	Sigma Aldrich
Phospho-Stat Antibody Sampler Kit	9914	Cell Signaling Technology
PhosSTOP fosfataz inhibitör koktail	04906837001	Roche
Propidium Iodide	A2261	Applichem
Protein İzolasyonu	K0301	Fermentas
Purvalanol	1580	Tocris biosciences
Rapamycin	1292	Tocris biosciences
Roscovitine	R7772	Sigma Aldrich
Saf Etanol	32221	Rieel-de Haen
SDS (Sodyum dedosil	A3452	Applichem
Sığır Serum Albumin	500-0007	Bio-Rad
Sodyum Klorür	A2942	AppliChem
SQSTM1/p62 Antikoru	5114	Cell Signalling Technology
Stat Antibody Sampler Kit	9939	Cell Signaling Technology
TEMED	A1148	Applichem
Trikloroasetik asit	T0699	Sigma Aldrich
Tris Baz	A2264	Applichem
Tris-HCl	A3452	Applichem

Tween 20	S4927784 802	MERCK
ULK1 Antibody Sampler Kit	8359	Cell Signalling Technology
Yağsız Süt Tozu	9999	Cell Signaling Technology
Yükleme standart antikorları	5142	Cell Signaling Technology

Ek D: Çözeltiler

% 70 Etanol: 100 ml

70 ml saf etanole 30 ml distile su eklenerek hazırlanır.

Yağsız süt tozu (% 5): 50 ml

Süt tozu 2,5 g tartılır ve 50 ml 'ye kadar TBS-T ile tamamlanır.

0,5 M Tris-HCl (pH 6.8): 100 ml

6 g Tris bazı 60 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra 6 N HCl kullanılarak pH'sı 6.8'e ayarlanır. Hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklav ile steril edilerek saklanır.

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8): 150 ml

27.23 g Tris bazı 80 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra 6 N HCl kullanılarak pH'sı 8,8'e ayarlanır. Hacim distile su ile 150 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklav ile steril edilerek saklanır.

% 0,5 (w/v) Bromofenol mavisi: 10 ml

0,05 g bromofenol mavisi 10 ml su içerisinde çözdürülür. Çözünmeyen parçacıkların kalması durumunda filtreden geçirilerek oda sıcaklığında saklanır.

% 10 (w/v) APS (amonyum persulfat): 10 ml

1 gr APS 10 ml distile su içerisinde çözdürülerek hazırlanır. APS'nın taze kullanılması gerektiği için -20°C'de saklanması ve kullanılmadan önce çözdürülmesi gerekmektedir.

10X TBS Hazırlanışı

86,6 g NaCl, 12,11 g Tris-Baz konular pH: 8 e ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml' e tamamlanır. Hazırlanan 10X TBS kullanılmak için 1X TBS' e dönüştürülür.

IP Hücre Lizis Tamponu (30 ml)

30 ml hücre lizis tamponunda 0,00522 g PMSF çözülerek, final konsantrasyonu 1 mM PMSF elde edilir.

TBS-Tween Hazırlanışı

1X TBS içine 500 µl Tween 20 konularak hazırlanır.

Yürütme Tamponunun Hazırlanışı

30,3 g Tris-Baz, 114 g Glisin ve 10 gr SDS tartılarak 1000ml distile su içinde çözünür. Hazırlanan 10X yürütme tamponu hazırlanır. Jel yürütmesi sırasında kullanılmak için 1X' e dönüştürülür.

Transfer Tamponunun Hazırlanışı

200 ml 10X yürütme tamponunun üzerine 100 ml metanol konularak distile su ile 1000 ml' e tamamlanır.

Yürütme Jelinin Hazırlanması

Proteinler ağırlıklarına göre ayrılmaları için % 7-12' lik SDS poliakrilamid jelde yürütülürler.

Ek E: Çalışma Kapsamında Kullanılan Antikorlar ve siRNA'lar

mTOR, Rictor, Raptor, p-4EBP1, Stat1, Stat3, p-Stat1, p-Stat3, FoxO1, AR, ULK1, p-ULK1, p-p70S6K, Beclin-1, Atg7, p-AMPK α , SQSTM1/p62, β -Tubulin, GAPDH (Cell Signalling Technology®) antikorları kullanılmıştır. Her bir antikor SuperBlock® T-20 (PBS) bloklama tamponu ile 1:1000 oranında; HRP-konjuge sekonder antikorlar (Cell Signalling Technology®) 1:5000 oranında çalışılmıştır. siRNA uygulamaları için SignalSilence® mTOR siRNA I (6381, CST), SignalSilence® mTOR siRNA II (6556, CST) ve SignalSilence® Control siRNA (Fluorescein Conjugate) (6201, CST) kullanılmıştır.

7. Tez süresince elde edilen akademik çıktılar

1. Elif Damla Arisan*, **Çağrı Gümüşkaptan**, Özge Berrak, Pinar Obakan, Ajda Coker-Gurkan, Narcin Palavan Ünsal, “Roscovitine treatment inhibited cell proliferation and induced apoptosis via modulating activity of Stat3 and FoxO1 under control of Akt in LNCaP prostate cancer cells”, International Conference on Prostate Cancer, 22-24 June 2015, Florida USA (*Davetli konuşmacı).
2. Harbiye Hacıbektasoglu*, E. Damla Arisan, Ozge Berrak, **Çağrı Gümüşkaptan**, Ajda Coker-Gurkan, Pınar Obakan, Narcin Palavan-Unsal, “Investigation the role of CDK inhibitors on ER stress-mediated apoptosis in LNCaP prostate cancer cells”, 3rd AntiCancer Agent Development Congress, PP-063, p: 120, 18-19 Mayıs 2015, İzmir, Turkey (*Poster sunumu).
3. Sevilay Acar*, Ozge Berrak, **Çağrı Gümüşkaptan**, Pınar Obakan, Ajda Coker-Gurkan, E. Damla Arisan, “Forced Bcl-2 expression induced prevented roscovitine induced-autophagy via in PC3 cells” 3rd AntiCancer Agent Development Congress, PP-112, p: 169, 18-19 Mayıs 2015, İzmir, Turkey (*Poster sunumu).



8. Özgeçmiş

1. **Adı Soyadı:** Çağrı Gümüşkaptan

İletişim Bilgileri:

Adres: İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, MOBİGEN 34156 Bakırköy-İstanbul

Telefon: 0535 494 22 88

E-posta: cagrigumuskaptan@gmail.com

2. **Doğum Tarihi:** 20.03.1989

3. **Ünvanı:** Öğrenci

4. **Öğrenim Durumu:**

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi, Türkiye	2008-2013
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	University of Greenwich, Birleşik Krallık	2011-2012
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi, Türkiye	2013-2015

5. Çalışma ve araştırma deneyimleri:

2009 – 2011 Öğrenci asistanlığı, İstanbul Kültür Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,

2011 Bahar Yarıyılı Genel Biyoloji Laboratuvarı asistanlığı, İstanbul Kültür Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,

2014 Bahar Yarıyılı Mikrobiyoloji Laboratuvarı asistanlığı, İstanbul Kültür Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,

2014 Güz Yarıyılı Moleküler Biyoloji Teknikleri Laboratuvarı asistanlığı, İstanbul Kültür Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,

2015 Bahar Yarıyılı Hayvan Doku Kültürü Laboratuvarı asistanlığı, İstanbul Kültür Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,

Projeler

2010 – 2011 Purvalanol tarafından tetiklenen apoptotik mekanizmanın MCF-7 meme kanseri hücrelerinde gösterimi, TÜBİTAK 2209, Proje Yürütücüsü,

2013 – 2014 mTOR İnhibitörü Rapamycin'in CDK İnhibitörleri tarafından Tetiklenen Hücre Ölümü Mekanizmasındaki Potansiyel Rolünün Androjen Reseptörü Pozitif LNCaP- ve Androjen Reseptörü negatif DU145 ve PC3 Prostat kanseri Hücrelerinde Araştırılması, TÜBİTAK Kariyer projesi 112T433, Proje Bursiyeri.

Poster sunumları

Purvalanol tarafından tetiklenen apoptotik mekanizmanın MCF-7 meme kanseri hücrelerinde gösterimi, *V. Moleküler biyoloji ve Genetik Ulusal Öğrenci Kongresi*, 19-22 Ağustos, 2011, İstanbul, Türkiye.

Katıldığı Kongreler/Seminerler

2014	İstanbul Kültür Üniversitesi, 2 nd Meeting on Nanotechnology and Tissue Engineering: Current Challenges and Future Prospects
2013	İstanbul Kültür Üniversitesi, Joint Meeting on Nanotechnology and Tissue Engineering: Current Challenges and Future Prospects

2011	İstanbul Teknik Üniversitesi V. Moleküler Biyoloji ve Genetik Ulusal Öğrenci Kongresi
2010	İstanbul Kültür Üniversitesi, Molecular Cancer Biology Lecture of Lauren Pecorino
2009	İstanbul Kültür Üniversitesi, Darwin'in 200. Yaşı İstanbul Teknik Üniversitesi III. Moleküler Biyoloji ve Genetik Ulusal Öğrenci Kongresi
2008	Ortadoğu Teknik Üniversitesi, I. Ulusal Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar Sempozyumu