

**İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**mTOR SİNYAL YOLAĞININ RAPAMYCİN İLE BASKILANMASI
DURUMUNDA CDK İNHİBİTÖRLERİNİN TERAPOTİK ETKİLERİNİN
LNCaP, DU 145 VE PC3 PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİNDE
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS

TEZİ

Özge BERRAK

(1109411002)

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. E. Damla ARISAN

OCAK 2014

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

Hayatımın en güzel anlarını birlikte yaşadığım, desteğini her zaman kalbimde hissettiğim hayat arkadaşım Mehmet Ali RENCÜZOĞULLARI'na ,

Hem akademik, hem de özel hayatımda desteklerini hissettiğim, zor zamanlarımda yüzümü güldüren Deniz COŞKUN, Onur IRMAK , Sultan İNCE'ye,

Tezim ve hayatım boyunca bana her anlamda destek olan ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili annem Edibe BERRAK, babam Kerim BERRAK, kardeşlerim Nilgün KAYIKÇI ve Sibel CANKURTARAN ve değerli aile üyelerimize, sevgili candostum Neslihan BERRAK'a, bu tezin hazırlanması sırasında her zaman desteklerini hissettiğim sevgili arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma bu çalışmamın uygulama kısmında 3501 Kariyer Programı 112T433 nolu proje ile beni destekleyen TÜBİTAK'a ve çalışmamın uygulama kısmını destekleyen İstanbul Kültür Üniversitesi'ne teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

1 . GİRİŞ	1
1.1 Prostat Kanseri	1
1.1.1 Hormonal Etkiler	3
1.1.2 Diyet ve Çevresel Faktörler	4
1.1.3 Genetik Faktörler	5
1.2 Prostat Kanseri Terapi Modelleri	5
1.2.1 İkincil Hormonal Tedaviler	5
1.2.2 Kemoterapi Uygulamaları	6
1.3 Prostat Kanseri Oluşumu ve Tedavisinde Temel Moleküler Mekanizmalar	7
1.3.1 Hücre Döngüsü	7
1.3.2 Siklinler ve Sikline Bağımlı Kinazlar (CDK), Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörleri (CDKi)	8
1.3.3 Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörleri (CDKi)	10
1.3.4 CDK ve Siklinlerin Kansere İlişkisi	13
1.4 Apoptoz	15
1.4.2 Mitokondri/ Sitokrom C Aracılı İntersik Yolak	21
1.5 Apoptoz ve Kansere İlişkisi	25
1.6 Otofaji	26
1.6.1 Otofajinin Düzenlenmesi	27
1.7 Hücre Ölümü ve Sağ Kalımı ile İlişkili Sinyal Yolları	29
1.7.2 mTOR Sinyal Yolu	32
1.7.3 Rapamisin	33
1.7.4 PI3K/Akt Sinyal Yolu	35
1.7.5 Otofaji ve Apoptotik Yolak Arasındaki Önemli Oyuncular: Bcl-2 ve Bcl-x _L	36
1.8 Amaç	37
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	38
2.1 MATERYAL	38
2.1.1 Kullanılan Hücreler ve Özellikleri	38
2.1.2 Kullanılan Cihazlar	38
2.1.3 Hücre Kültürü Donanımları	38
2.1.4 Kimyasal Maddeler	38
2.1.5 Kullanılan Çözeltiler	38

2.1.6	Kullanılan Antikor, siRNA ve Plazmidler	38
2.2	YÖNTEMLER	39
2.2.1	Hücre Kültürü.....	39
2.2.2	Hücre Canlılığının Belirlenmesi (MTT testi).....	39
2.2.3	Kombinasyon Denemeleri için Veri Analizi	39
2.2.4	Hücre Sağkalımı	40
2.2.5	Protein İfadesinin Belirlenmesi	40
2.2.6	Apoptotik hücre ölümünün belirlenmesine yönelik yöntemler	42
2.2.7	Poliamin Düzeylerinin Belirlenmesi	43
2.2.8	Otofajinin İrdelenmesi ile İlgili Yöntemler	44
2.2.9	siRNA Yöntemi ile Gen Sessizleştirilmesi.....	46
2.2.10	Hücrelerin Hazırlanması.....	46
2.2.11	siRNA Transfeksiyonu	46
2.2.12	İstatistiksel Analiz	46
3.1.	Rapamisin AR (+) LNCaP, AR (-) DU 145 ve PC3 prostat kanseri hücre çoğalmasını inhibe etmektedir.....	47
3.2.	Androjene duyarlı LNCaP hücrelerinde CDK inhibitörleri ile kombine edilen rapamisin apoptotik hücre ölümü üzerinde sinerjistik etki yaratmaktadır	51
3.3.	Otofaji yolağının farklı stratejilerle baskılanması ve CDK inhibitörlerinin rapamisin ile kombinasyonu ile prostat kanseri hücrelerinde etkinliklerinin belirlenmesi.	59
3.4.	PI3K/Akt yolağı otofaji ile apoptoz arasındaki denge/geçiş sürecini etkilemektedir	60
3.5.	Rapamisinin CDK inhibitörleri ile eş uygulanması ODC'nin baskılanmasını engelleyerek hücre içi poliamin seviyesinin düşmesini engellemektedir	63
3.6.	DU 145 AR (-) Prostat Kanseri Hücrelerinde Rapamisin, CDK inhibitörlerinin hücre canlılığında yarattığı etkiyi geri çekmektedir.....	66
3.7.	Rapamisin Kaspaza Bağımlı Apoptozu İnhibe Etmektedir.....	69
3.8.	Rapamisin İle Kombine Edilen CDK İnhibitörlerinin Apoptotik/Otofajik Mekanizma Üzerine Etkisinin İrdelenmesi Amacı İle PI3K/Akt Sinyal Yolağının İncelenmesi.....	78
3.9.	Rapamisin CDK İnhibitörlerinin Poliamin Katabolizmasına Olan Etkisini Geri Çekmektedir	80

3.10.Androjene duyarsız PC3 Prostat Kanseri Hücrelerinde CDK İnhibitörlerinin Terapotik Etkisinin Araştırılması	83
3.11.Rapamisinin CDK inhibitörleri ile kombinasyonu PC3 hücrelerinde kaspaza bağımlı hücre ölümüne etkisinin gösterimi	85
4. TARTIŞMA	97
5. KAYNAKLAR	106
6. EKLER.....	115
6.1.1. Ek A: Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar	115
6.1.2. Ek B: Hücre Kültüründe Kullanılan Sarf Malzeme	116
6.1.3. Ek C: Kullanılan Kimyasal Maddeler	117
6.1.4. Ek D: Çözeltiler.....	119
2.2.1 Ek E: Çalışma Kapsamında Kullanılan Antikor, siRNA ve Plazmidler ...	121
7. ÖZGEÇMİŞ	122

KISALTMALAR LİSTESİ

3-MA:	3-Metil adenin
AIF:	Apoptoz indükleyici faktör
AP-1:	Aktivatör protein-1
Apaf-1:	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
APS:	Amonyum persülfat
AR:	Androjen reseptörü
AZI:	Antizim inhibitörü
Bcl-2:	B-hücre lenfoma 2
BH:	Bcl-2 homoloji bölgeleri
BSA:	Sığır serum albumin
CDK:	Sikline bağımlı kinaz
CDKi:	CDK inhibitörü
Cip/Kip:	CDK inhibitör protein/kinaz inhibitör protein
CDKN1A:	p21Cip1
CDKN1B:	p27 Kip1
CDKN1C:	p57 Kip2
CI:	Kombinasyon indeks
CO₂:	Karbondioksit
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
dcAdoMet:	Dekarboksile AdoMet
DCFH-DA:	2',7'-dichlorfloresein-diasetat
DD:	Death domain-ölüm domeni
DFMO:	Difluorometilornitin
DHEA:	Dehidroepiandrosteron
DHT:	Dihidrottestosteron
DISC:	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DiOC6:	3, 3'-diheksiloksakarbosiyanin iyodür
DMSO:	Dimetilsulfoksit
DTT:	Dikloro difenol trikloroethan
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
FADD:	Fas ilişkili ölüm domeni
GFP:	Green (yeşil) floresan protein

H₂O₂:	Hidrojen peroksit
HDPK:	Hormona dirençli prostat kanseri
HPC1:	Kalıtsal prostat kanseri 1
HPLC:	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HSP:	Isı şok proteini
IAP:	Apoptoz inhibitörü protein
IGF-1:	İnsulin benzeri büyüme faktörü-1
IL-2:	İnterlökin-2
kDa:	KiloDalton
MTT:	Metiltiazoldifeniltetrazolyum bromür
mTOR:	Rapamisin hedefi (Target of rapamycin)
NAC:	N-asetil sistein
NCOA1:	Nuklear reseptör koaktivatör 1
NFκB:	Nuklear faktör kappa B
Nrf-2:	NF-E2 ile ilişkili transkripsiyon faktörü-2
OAZ:	ODC antizim
ODC:	Ornitin dekarboksilaz
PA:	Poliamin
PAO:	Poliamin oksidaz
PARP:	Poli ADP riboz polimeraz
PBS:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PI:	Propidyum iyodür
PI3K:	Fosfotidilinositol-3 fosfat
PSA:	Prostata özgü antijen
PTEN:	Tümör baskılayıcı protein olan fosfataz ve tensin homolog
Put:	Putresin
PVDF:	Poliviniliden florid
Rb:	Retinoblastoma
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE:	SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SMO:	Spermin oksidaz
Spd:	Spermidin
Spm:	Spermin
SSAT:	Spermidin, spermin asetil transferaz

TBS:	Tris tamponlu tuz çözeltisi
TEMED:	Tetrametletilendiamin
T:	Testesteron
TNF:	Tümör nekrozis faktör
TRAIL:	TNF ile ilişkisi apoptoz indükleyici ligand reseptör
VEGF:	Vaskular endoteliyal büyüme faktörü
XET:	Ksiloglukan endotransferaz
z-LEHD-FMK:	Kaspaz-9 inhibitörü
z-VAD-FMK:	Genel kaspaz inhibitörü
$\Delta\psi_m$:	Mitokondri membran potansiyeli

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1 Her bir hücre hattı için, CDK inhibitörlerinin rapamisin ile kombine uygulanması sonucunda elde edilen MTT hücre canlılığı verilerinin kombinasyon index (CI) yöntemi ile incelenmesi	50
Tablo 2. Kullanılan cihazların listesi	115
Tablo 3. Hücre kültürü donanımları.....	116
Tablo 4. Kullanılan kimyasalların listesi.	117

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Erkekler arasında yıllık yaşa bağlı kanser ölüm oranları, Amerika Birleşik Devletleri, 1930-2007(5).....	2
Şekil 2. Hücre siklusunun şematik şekli.....	8
Şekil 3. Purvalanolün moleküler yapısı (32).....	11
Şekil 4. Roskovitinin moleküler yapısı (38).....	13
Şekil 5. Apoptotoik hücre ile nekrotik hücrenin morfolojik açıdan farkı (54).....	18
Şekil 6. Pro-kaspazlar iki aktif bölgesinde AspX den kesilerek aktifleşir.	19
Şekil 7. Kaspazların moleküler sıralanışı.	20
Şekil 8. Dış ve iç apoptotik yolaklar (58).....	23
Şekil 9. Otofajinin düzenlenmesi (70).....	28
Şekil 10 Poliamin metabolizmasının gösterilmesi. Kırmızı oklar poliamin biyosentezi, mor oklar ise poliamin katabolizması yolunu göstermektedir. Görevli enzimler bordo, inhibitörler ise siyah renkli yazılmıştır.	30
Şekil 11. mTOR sinyal yolağı (97)	33
Şekil 12. Rapamisinin moleküler yapısı.....	34
Şekil 13. Prostat kanser hücrelerinde AR bağımlı hücre devri ilerlemesi gösterilmiştir. Aktif AR mTOR yoluyla Siklin D1'in birikimini uyarır, CDK4'ü uyarır ve retinoblastoma (RB) tümör baskılayıcının fosforilasyonunu yönetir. AR ile uyarılmış p21Cip1 ekspresyonu ve p27Kip1 degradasyonu RB'nin siklinD1/CDK4 ve cycE/CDK2 bağımlı inaktivasyonu artırır ve siklin A (CycA) gibi E2F hedef genlerin ekspresyonuna izin verir. Siklin A G1-S faz geçişini harekete geçirmek için CDK2 'yi aktive eder. Daha sonra hücre devri mekanizmasının bileşenleri androjen cevabını düzenler. Yükseltilmiş siklin D1 AR aktivitesini azaltmak için negatif feedback döngüsü gibi davranır, böylece androjen aktivitesini ayarlar. G2 fazında, CDK1 AR'nin aktivasyonunu ve fosforilasyonunu yönetir. Fakat, AR M fazında indirgenir ve DNA replikasyonu için bir 'lisans faktör' olması amaçlanır. AR fonksiyonunun baskılayan bileşenler kırmızıyla gösterilmiştir. AR aktivitesinin pozitif efektörleri ise yeşille gösterilmiştir (98).	35
Şekil 14. PI3K/AKT yolağı. Fosfotidilinositol fosfatın fosforilasyonu fosfotidilinositol 3-kinaz tarafından gerçekleştirilir ve iki kinaz PDK1 ve mTOR-Rictor kompleksi AKT aktivasyonu ve fosforilasyonu sonucunda oluşur. (102).....	36

- Şekil 15. Rapamisin'in (0-100 nM) AR (+) LNCaP, DU 145 ve PC3 AR (-) prostat kanseri hücre canlılığına etkisinin doza bağlı olarak değişimi. Hücreler 24 saat boyunca ilaç dozları ile inkübe edildikten sonra 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi ile analiz edildi. Yapılan deney grupları 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır..... 47
- Şekil 16 CDK inhibitörleri hücre canlılığı üzerine doza bağlı olarak ket vurucu etki göstermektedirler. LNCaP, DU 145 ve PC3 prostat kanseri hücre hatları 1×10^4 hücre her bir kuyucukta olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre petrisine ekildiler, ardından 0-50 μ M CDK inhibitörleri ile 24 saat boyunca muamele edildiler. Değerler en az 5 tekrarla gerçekleştirilen üç farklı MTT hücre canlılığı testinden elde edilen ortalama \pm st. hata verileridir. 49
- Şekil 17. Rapamisin, CDK inhibitörlerinin, purvalanol ve roskovitin, apoptotik hücre ölümü mekanizması üzerinde etkisinin modellenmesi. A. LNCaP AR (+) prostat kanseri hücre hatlarına 24 saat boyunca rapamisin (10 nM) ile purvalanol (20 μ M) veya roskovitin (30 μ M) yalnız ve ya kombine edilerek uygulandı. MTT hücre canlılığı testi ile hücrelerde ilaçların etkisi gözlenmiştir. Anlamlılık testi iki yönlü ANOVA testi ile Bonferroni çoklu karşılaştırma testi uygulanarak elde edilmiştir (**p=0,0003 ;**p=0,0087). Kolon grafikte yer alan sonuçlar en az 5 farklı deney setinde yer alan 4 tekrarın ortalamı ve standart sapma olarak sunulmaktadır. B. İlaçların her birisinin ya da rapamisin ile kombine edilmesi yolu ile LNCaP hücreleri üzerindeki 24 saatlik süresinde apoptoz üzerine etkileri DNA fragmentlerinin belirlenmesi yolu ile (Cell Death ELİZA) ile belirlendi. Her bir deney sonucu en az iki deney setinde yer alan 2 tekrarın ortalama ve standart sapması olarak ifade edilmektedir. İki yönlü Anova uygulamasında Bonferroni çoklu karşılaştırma testi ile elde edilen anlamlılık sonuçlarına göre * p= 0,012, **** p<0,0001. C. Rapamisin ile kombine edilen purvalanol veya roskovitin LNCaP hücrelerinde mitokondri membran potansiyelinin bozulmasına bağlı olarak, hücre canlılığındaki azalmaya olan etkisi DiOC6 boyama ile en az 3 deney setinde yer alan 4 tekrarın ortalaması ve standart sapması olarak sunulmaktadır. Sonuçlar florometre 485 – 538 nm'de ölçülmüştür..... 52
- Şekil 18. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörlerinin LNCaP prostat kanseri hücrelerinde hücre morfolojisi ve mitokondriyal membran potansiyeline olan etkisinin ışık ve floresan mikroskopunda incelenmesi. CDK inhibitörleri, purvalanol

(20 µM) veya roskovitin (30 µM), rapamisin (10 nM) varlığında veya yokluğunda 24 saat boyunca LNCaP hücrelerine uygulandı. DiOC6 (4 nM) ile boyanan hücreler ışık veya floresan mikroskobunda incelendi (x20-x40)..... 53

Şekil 19. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörleri ile tetiklenen hücre ölümünün LNCaP prostat kanseri hücrelerinde floresan probalar ile belirlenmesi. Rapamisin (10 nM) ile purvalanol (20 µM) veya roskovitin (30 µM) ile tek tek veya kombine edilerek LNCaP hücrelerine 24 saat boyunca hücrelere uygulandı. Propidium iyodür (PI) ve DAPI ile boyanan hücreler floresan mikroskobunda incelendi (x20-x40). ... 54

Şekil 20. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörlerinin kaspaza bağımlı apoptoz üzerinde etkisinin belirlenmesi. A. Rapamisin (10 nM) ile purvalanol (20 µM)/roskovitin (30 µM) yalnız veya kombine edilerek 24 saat boyunca hücrelere uygulandı. Total protein izolasyonunun ardından 30 µg protein %12' lik SDS-PAGE jel ile ayrıldı ve immunoblotlama yöntemi ile PARP, kaspaz-2,3,7,8 protein ifadeleri incelendi. β-aktin yükleme kontrolü olarak uygulandı. B. Kombine ilaç uygulamasının kaspaza bağımlı yolak üzerindeki etkisini belirlemek üzere, genel kaspaz inhibitörü (Z-VAD) ve kaspaz 9 inhibitörü (z-LEHD) ilaç uygulamalarından 1 saat önce 10 µM olacak şekilde uygulandı. Kaspaz inhibitörlerinin hücreler üzerindeki etkisi MTT hücre canlılığı analizi ile incelendi. Kolon grafikte yer alan sonuçlar 2 farklı deney setinde yer alan en az 4 tekrarlı sonuçların ortalama ve standart sapması olarak sunulmuştur. 55

Şekil 21. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörlerinin pro- ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi (A), ve otofaji belirteçleri (B) üzerine etkileri immunoblotlama yöntemi ile belirlendi. Total protein izolasyonunun ardından 30 µg protein her bir örnek için %10-12 SDS-PAGE ile ayrıştırıldı. Immunoblotlama işlemlerinin ardından ilgili proteinlere ait bantlar kemiluminisans yöntem ile belirlendi. 58

Şekil 22 Androjene duyarlı LNCaP prostat kanseri hücrelerinde 3-MA, LC3 siRNA veya Beclin-1 siRNA uygulaması ile otofaji yolağının baskılandığı durumlarda CDK inhibitörleri ve rapamisinin etkisinin hücre canlılığı verileri ile irdelenmesi. 59

Şekil 23. Rapamisin ile CDK inhibitörleri kombinasyonu PI3K/AKT/mTOR sinyal iletiminde yer alan protein ekspresyon düzeylerini etkilemektedir. Total protein izolasyonunun ardından 30 µg protein %12 lik SDS-PAGE jel ile ayrıldı ve immunoblotlama yöntemi ile PI3K p85, p-PDK, AKT, pAkt, GSK3, mTOR, p-mTOR, p-p70S6K, p-FoxO3 (T32) protein ekspresyon seviyeleri incelendi. 62

- Şekil 24. Rapamisin ile CDK inhibitörleri kombinasyonu hücre içi poliamin seviyesini üzerinde etkili olmaktadır. A.Total protein izolasyonunun ardından 30 µg protein SDS-PAGE jel ile ayrıldı ve immunoblotlama yöntemi ile PAO, ODC, SSAT c-Myc protein ifade düzeyleri incelendi. β-aktin yükleme kontrolü olarak gösterilmektedir. B. Kombine ilaç uygulamalarından sonra hücre metabolizmasındaki reaktif oksijen türlerindeki (ROS) değişim, DCFDH-DA (1 mM) floresan boyama ardından 485-530 nm de florometre ile ölçüldü. 64
- Şekil 25 Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörlerinin, purvalanol ve roskovitin uygulamasının LNCaP prostat kanseri hücrelerinde hücre içi poliamin düzeylerine etkisinin gösterimi. Kolon grafik 2 farklı kültür ortamından elde edilen 2 tekrarlı örneklerin ortalama±standard hata olarak sunulmaktadır. 65
- Şekil 26. Rapamisin, CDK inhibitörlerinin, purvalanol ve roskovitin, apoptotik hücre ölümü mekanizması üzerinde etkisinin modellenmesi. A. DU 145 AR (-) prostat kanseri hücre canlılığı MTT testi ile hücrelerde ilaçların etkisi gözlenmiştir. Anlamlılık testi iki yönlü ANOVA testi ile Bonferroni çoklu karşılaştırma testi uygulanarak elde edilmiştir (**p=0,0025 purvalanol vs. purvalanol+rapamisin ;**p=0,0016 roskovitin vs. roskovitin+rapamisin). Kolon grafikte yer alan sonuçlar en az 5 farklı deney setinde yer alan 4 tekrarın ortalama ve standart sapma olarak sunulmaktadır. B. Tripan mavisi ile boyama yöntemi ile ölü-canlı hücrelerin sayımı ile gerçekleştirildi. Çizgi grafik 3 farklı deney düzeneğinden elde edilen verilerin ortalama ve standart sapması olarak sunulmuştur. C. CDK inhibitörlerinin rapamisin varlığında veya yokluğunda DNA fragmentasyonu üzerine olan etkisi DNA kırıklarının belirlenmesi yolu ile belirlendi. D. Rapamisin ile kombine edilen purvalanol ve roskovitin DU 145 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelinin bozulmasına bağlı olarak, hücre canlılığındaki azalmaya olan etkisi DiOC6 boyama ile en az 3 deney setinde yer alan 4 tekrarlı sonuçların ortalama ve standart sapması olarak yer almaktadır. Sonuçlar florometrede 485 – 538 nm’de ölçülmüştür..... 67
- Şekil 27. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörlerinin DU 145 prostat kanseri hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeline olan etkisinin gösterilmesi. CDK inhibitörleri, purvalanol (20 µM), roskovitin (30 µM) rapamycin (10 nM) varlığında veya yokluğunda 24 saat boyunca uygulandı. DiOC6 (4 mM) ile boyanan hücreler floresan mikroskopunda incelendi (x20-x40). 68

- Şekil 28. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörleri ile tetiklenen hücre ölümünün DU 145 prostat kanseri hücrelerinde gösterimi. CDK inhibitörleri, purvalanol (20 µM), roskovitin (30 µM) rapamisin (10 nM) varlığında veya yokluğunda 24 saat boyunca uygulandı. Propidium iyodür (PI) (1 mM) ve DAPI (0,5 mM) ile boyanan hücreler floresan mikroskobunda incelendi (x20-x40). 69
- Şekil 29. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörlerinin kaspaza bağımlı apoptoza etkisi. A. Total protein izolasyonunun ardından 30 µg protein %12' lik SDS-PAGE jel ile ayrıldı ve immunoblotlama yöntemi ile PARP, Kaspaz-2.3.7, protein ifadeleri incelendi. B. Kombine ilaç uygulamasının kaspaza bağımlı yolak üzerindeki etkisini belirlemek üzere, genel kaspaz inhibitörü (Z-VAD) ve kaspaz 9 inhibitörü (z-LEHD-fmk) ilaç uygulamalarından 1 saat önce 10 µM olacak şekilde uygulandı. Kaspaz inhibitörlerinin hücreler üzerindeki etkisi MTT hücre canlılığı analizi ile incelendi. 70
- Şekil 30. Rapamisin eş uygulamasının CDK inhibitörlerinin apoptotik ve otofajik markırlar üzerine etkisinin modellenmesi. Total protein izolasyonunun ardından 30 µg protein immunoblotlama yöntemi ile yukarıda gösterilen proteinler için incelenmiştir. 74
- Şekil 31. MDC boyama sonucunda asidik vesiküllerin DU 145 prostat kanseri hücrelerinde gösterimi. Seçilen resimler 400x büyütme ile gösterilmektedir. 75
- Şekil 32. Androjene duyarsız DU 145 prostat kanseri hücrelerinde 3-MA, LC3 siRNA veya Beclin-1 siRNA uygulaması ile otofaji yolağının baskılandığı durumlarda CDK inhibitörleri ve rapamisinin etkisinin hücre canlılığı verileri ile irdelenmesi. Kolon grafik dört tekrarlı deney sonuçlarının ortalama±standard hata sunumu şeklinde yer almaktadır. 76
- Şekil 33. CDK inhibitörleri ile kombine edilen rapamisinin DU 145 AR (-) prostat kanseri hücrelerinde asidik vakuol oluşumuna etkisi. 1×10^4 hücre/kuyu lamel üzerine ekildi. CDK inhibitörleri, purvalanol (20 µM), roskovitin (30 µM) rapamisin (10 nM) varlığında veya yokluğunda 24 saat boyunca uygulandı. LysoTracker kırmızısı (1 mM) ile 30 dk inkübe edildi. Floresan mikroskobunda 100x ile görüntülendi. 78
- Şekil 34. Rapamisin ile CDK inhibitörleri kombinasyonu PI3K/AKT/mTOR sinyal iletiminde yer alan protein ekspresyon düzeylerini etkilemektedir. Total protein izolasyonunun ardından 30 µg protein % 12 lik SDS-PAGE jel ile ayrıldı ve immunoblotlama yöntemi ile PTEN, PI3K p85, Akt, p-Akt, GSK3, p-GSK3, p-mTOR (S2448), p-p70S6K (T389), Siklin D1, Cdc2, p-Rb (780), Rb4H1 protein ekspresyon seviyeleri incelendi. β-aktin yükleme kontrolü amacıyla kullanıldı. 79

- Şekil 35. Rapamisin ile CDK inhibitörleri kombinasyonu hücre içi poliamin miktarlarının düzenlenme mekanizması üzerinde etkili olmaktadır. Total protein izolasyonunun ardından 30 µg protein SDS-PAGE jel ile ayrıldı ve immunoblotlama yöntemi ile PAO, SSAT, c-Myc, ODC, c-Jun, c-Fos proteinlerinin ifade düzeyleri incelendi. B, 96 saat DFMO uygulamasının ardından 24 saatlik purvalanol ve roskovitin uygulamasının DNA fragmentasyonu üzerine olan etkisi Cell Death ELIZA yöntemi ile belirlendi. C, Kombine ilaç uygulamalarından sonra hücre metabolizmasındaki reaktif oksijen türlerindeki (ROS) değişimi, DCFDH-DA (1 mM) floresan boyama ardından florometre (485-538 nm) ile ölçüldü. 82
- Şekil 36. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörlerinin, purvalanol ve roskovitin uygulamasının DU 145 prostat kanseri hücrelerinde hücre poliamin düzeylerine etkisinin gösterimi. Kolon grafik 2 farklı kültür ortamından elde edilen 2 tekrarlı örneklerin ortalama±standard hata olarak sunulmaktadır. 83
- Şekil 37. Rapamisin, CDK inhibitörlerinin, purvalanol ve roskovitin, apoptotik hücre ölümü mekanizması üzerinde etkisinin modellenmesi. A MTT hücre canlılığı testi ile hücrelerde ilaçların etkisi gözlenmiştir. Anlamlılık testi iki yönlü ANOVA testi ile Bonferroni çoklu karşılaştırma testi uygulanarak elde edilmiştir (purvalanol vs purvalanol+rapamisin *p=0,0252; roskovitin vs roskovitin+rapamisin *p=0,0116). Kolon grafikte yer alan sonuçlar en az 5 farklı deney setinde yer alan 4 tekrarın ortalamı ve standart sapma olarak sunulmaktadır. B. Tripan mavisi ile ölü hücrelere toplam hücre sayısından çıkartılarak sağ kalım grafiği her 24 saatte bir alınan sonuçlar ile birlikte 96 saat süresi için çizilmiştir. Her bir deney sonucu en az iki deney setinde yer alan 2 tekrarın ortalama ve standart sapması olarak ifade edilmektedir. C. DiOC6 boyama ile en az 3 deney setinde yer alan 4 tekrarın ortalaması ve standart sapması olarak sunulmaktadır. Sonuçlar florometre 485 – 538 nm’de ölçülmüştür. 84
- Şekil 38. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörlerinin PC3 prostat kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyeline olan etkisinin gösterilmesi. CDK inhibitörleri, purvalanol (20 µM), roskovitin (30 µM) rapamisin (10 nM) varlığında veya yokluğunda 24 saat boyunca uygulandı. DiOC6 (4 mM) ile boyanan hücreler floresan mikroskopunda incelendi (x20-x40) 85
- Şekil 39. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörleri ile tetiklenen hücre ölümünün PC3 prostat kanseri hücrelerinde gösterimi. CDK inhibitörleri, purvalanol (20 µM),

- roskovitin (30 μ M) rapamisin (10 nM) varlığında veya yokluğunda 24 saat boyunca uygulandı. Propidium iyodür (PI) (1 mM) ve DAPI (0,5 mM) ile boyanan hücreler floresan mikroskobunda incelendi (x20-x40). 86
- Şekil 40. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörlerinin kaspaza bağımlı apoptoza etkisinin modellenmesi. A. Rapamisin (10 nM) ile purvalanol (20 μ M), roskovitin (30 μ M) yalnız veya kombine edilerek 24 saat boyunca uygulandı. Total protein izolasyonunun ardından 30 μ g protein %12' lik SDS-PAGE jel ile ayrıldı ve immunoblotlama yöntemi ile kesilmiş PARP, kaspaz-2,3,7, 8 protein ifadeleri incelendi. B. Kombine ilaç uygulamasının kaspaza bağımlı yolak üzerindeki etkisini belirlemek üzere, genel kaspaz inhibitörü (Z-VAD) ve kaspaz 9 inhibitörü (Z-LEHD) ilaç uygulamalarından 1 saat önce 10 μ M olacak şekilde uygulandı. Kaspaz inhibitörlerinin hücreler üzerindeki etkisi MTT hücre canlılığı analizi ile incelendi. 88
- Şekil 41. Rapamisin Eş Uygulaması İle CDK inhibitörlerinin pro- ve anti apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri, otofaji markırları üzerindeki etkisinin immunoblotlama yöntemi ile gösterimi..... 90
- Şekil 42 MDC boyama sonucunda asidik vesiküllerin PC3 prostat kanseri hücrelerinde gösterimi. Seçilen resimler 400x büyütme ile gösterilmektedir..... 91
- Şekil 43. Androjene duyarsız PC3 prostat kanseri hücrelerinde 3-MA, LC3 siRNA veya Beclin-1 siRNA uygulaması ile otofaji yolağının baskılandığı durumlarda CDK inhibitörleri ve rapamisinin etkisinin hücre canlılığı verileri ile irdelenmesi. Kolon grafik dört tekrarlı deney sonuçlarının ortalama \pm standard hata sunumu şeklinde yer almaktadır..... 92
- Şekil 44. PC3 prostat kanseri hücre hatlarında zamana bağlı rapamisin uygulanmasının ardından Bcl-2, Mcl-1, Beclin-1 ve p62 ifade düzeylerinin immunoblotlama yöntemi ile belirlenmesi. β -aktin yükleme kontrolü olarak yer almaktadır. 93
- Şekil 45. CDK inhibitörleri ile kombine edilen rapamisinin androjen bağımsız PC3 prostat kanseri hücrelerinde asidik vakuol oluşumuna etkisi. 1×10^4 hücre/kuyu lamel üzerine ekildi. CDK inhibitörleri, purvalanol (20 μ M), roskovitin (30 μ M) ve/veya rapamisin (10 nM) ile 24 saat boyunca uygulandı. Lysotracker kırmızısı (1 mM) ile 30 dk inkübe edildi. Örnekler floresan mikroskobunda x1000 ile görüntülendi. 94
- Şekil 46. PC3 prostat kanseri hücrelerinde, purvalanol ve roskovitin apoptotik etkisinin yanı sıra rapamisin kombinasyonu, otofaji belirteci olan otofagozom yapılarının da oluşmasına neden olmaktadır. 1×10^5 hücre/kuyu ekildikten 24 saat sonra 1 μ g yeşil

floresan protein GFP-LC3 (GFP-LC3), 6 µl lipozom türevli transfeksiyon ajanı ile hücrelere transfekte edildi. 24 saat boyunca hücreler bekletildikten sonra rapamisin (10 nM) ve/veya, purvalanol (20 µM) veya roskovitin (30 µM) içeren yeni besiyeri ile plazmid içeren besiyeri değiştirildi. Örnekler ilaçlarla 24 saat muamele sonucunda floresan mikroskopunda x40 büyütme ile incelendi. 95

Şekil 47. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörlerinin, purvalanol ve roskovitin uygulamasının PC3 prostat kanseri hücrelerinde hücre poliamin düzeylerine etkisinin gösterimi. Kolon grafik 2 farklı kültür ortamından elde edilen 2 tekrarlı örneklerin ortalama±standart hata olarak sunulmaktadır. 96

ÖZET

Prostat kanseri dünyada 40 yaş üzeri erkeklerde en sık rastlanan ikinci kanser türüdür. Hormonal kontrol prostat kanseri gelişiminin ana nedenlerinden biri olup, 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.

Kanser hücrelerinin aşırı çoğalma potansiyelinin indirgenmesi hücre döngüsünde görev alan siklinler ve sikline bağımlı kinazlar (CDK)'ı hedef haline getirmiştir. Yeni nesil CDK inhibitörlerinden roskovitin (CYC202, seliciclib) ve purvalanol A kendilerine özgü CDK hedeflerini inhibe ederek hücre çoğalmasına ket vurmaktadırlar ve bu nedenle yüksek apoptotik potansiyele sahip ajanlardır. Hücrede enerji metabolizmasında önemli anahtar görevi gören mTOR molekülünün inhibitörü olan rapamisinin terapötik etkinliği, hücre siklusu üzerindeki potansiyeli ile ilişkilidir. mTOR inhibisyonu aynı zamanda otofajinin indüklenmesine neden olmaktadır. Ancak mTOR'un otofaji ve apoptoz arasındaki moleküler etkileşimi birçok klasik kemoterapötik ajan ve yeni nesil ilaçlar için bilinmemektedir.

Kanser hücrelerinde poliamin metabolizmasının hücre büyümesi ve proliferasyonu da hücre ölümü ile ilişkilerinin yanısıra otofajik vakuollerin stabilizasyonuna pozitif etki etmektedir. Bu çalışmada amaç, mTOR inhibitörü rapamisin varlığında CDK inhibitörleri ile tetiklenen apoptotik ve otofajik sürecin poliaminler ile ilişkili olarak AR (+) LNCaP ve AR (-) DU145 ve PC3 prostat kanseri hücrelerinde terapötik etkisinin incelenmesidir.

Bu çalışma sürecinde rapamisin varlığında ve yokluğunda CDK inhibitörlerinin apoptotik etkisi AR (+) LNCaP, (-) DU145 ve PC3 hücre canlılığının tayini, mitokondriyal membran potansiyeli kaybı, DNA kırıkları oluşumu parametreleri ile incelenmiş, aynı zamanda kaspaz ve Bcl-2 ailesi üyelerindeki ifade değişimleri immunoblotlama yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Aynı ajanların otofajiye olan etkileri otofaji ile ilişkili proteinlerin immunoblotlama yöntemi ve otofagozom yapılarının oluşumunda görev alan proteinlere özgü siRNA'lar ve GFP transfekte

edilmiş plazmid transfeksiyonlarının yapılmasının ardından otofagozom yapılarının boyanmasını sağlayan MDC ve lysotracker kırmızısı floresan boyamaları kullanılarak floresan mikroskopi tekniği ile incelenmiştir. Aynı zamanda bu ajanların hücre poliamin anabolik ve katabolik enzimleri ifade değişimleri ve hücre içi poliamin seviyelerine etkisi yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile incelenmiştir.

Purvalanol ve roskovitin her üç hücre hattında da hücre canlılığı kaybına, mitokondri ile ilişkili, kaspaza bağımlı apoptozun tetiklenmesine neden olurken, rapamisin kombinasyonu ile oluşan apoptotik cevap, DU145 hücrelerine oranla LNCaP ve PC3 hücrelerinde daha etkili olmuştur. Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin her üç hücre hattında rapamisin varlığında azalması rapamisinin apoptotik etkisini göstermiştir. Rapamisinin hücrede neden olduğu stres, her hücre hattında farklı cevap oluşmasına neden olmuştur. Dikkat çeken bir sonuç ise rapamisin varlığında DU145 hücrelerinde otofajik vakuollerin oluşmasıdır. DU145 hücrelerinde hücre sağkalımına neden olduğu düşünülen rapamisinin etkisini inhibe etmek üzere uygulanan 3-MA (3-metil adenin), otofajik vakuollerin azalmasını sağlayarak hücre canlılığında azalma sağlamıştır.

Poliamin varlığında, androjen reseptörü durumlarına göre oluşan hücre ölüm mekanizmasını incelemek üzere LNCaP ve DU145 hücreleri ile çalışılmıştır. LNCaP hücrelerinde poliamin katabolik enzimlerinde rapamisin kombinasyonu ile artış gözlenirken, DU145 hücrelerinde poliamin katabolik enzim seviyelerini azalmıştır. DU145 hücrelerinde oluşan bu etkinin sağkalımı arttırdığı sonucuna varılmıştır.

Bu araştırma kapsamında, rapamisin tarafından mTOR yolağının baskılanması ile birlikte CDK inhibitörleri tarafından tetiklenen apoptotik ve otofajik mekanizma incelenmiş olup ilgili konuda yapılan özgün bir çalışmadır. Her iki CDK inhibitörü apoptotik etkinlikleri özellikle mTOR yolağının fonksiyonelliği açısından p70S6K'ın farklı fosforlanması ve siklin D üzerinde etki göstermeleri açısından farklılık göstermektedirler.

ABSTRACT

Prostate cancer is the second leading cause of cancer death worldwide in men over 40 ages. Androgens are the major factors in prostate gland development as well as the prostate cancer progress. However metastatic forms of the cancer could develop androgen-independently. These cases show higher risk of mortality. Therefore, new therapeutic targets and clarification of their signaling pathways against these aggressive forms are required.

One of the most interesting targets is cyclin dependent kinases (CDK) and cyclin complex members which orchestrate the aberrant cell cycle in cancer cells. New generation CDK inhibitors roscovitine (CYC202, seliciclib) and purvalanol A are specific inhibitors of different CDKs and block the cell proliferation by initiating programmed cell death, the apoptosis. The mTOR signaling pathway provides the physiological balance between autophagy and growth signals, also guide the cellular energy metabolism. However, the interactive relation between the mTOR and autophagy for lots of classic chemotherapeutic agents and for new generation drugs is still unknown.

The tendency of the cancer cells to be in the cycle is not only dependent to CDKs but also depend on polyamines (putrescine, spermidine, spermine), the cationic amine derivatives. In this project, the autophagic/apoptotic process induced by CDK inhibitors, roscovitine and purvalanol A are going to be investigated by the treatment of mTOR inhibitor rapamycin related to reduced polyamine metabolism.

In this study, the apoptotic effect of CDK inhibitors was investigated in androgen receptor (AR) positive LNCaP and AR negative DU145 and PC3 prostate cancer cell lines by relative cell viability, mitochondria membrane potential loss determinations and the formation of DNA fragmentation. In addition, the changes in the expression profiles of caspases and Bcl-2 family members were detected by immunoblotting method. The polyamine biosynthetic catabolic enzymes alteration following drug treatment was determined by immunoblotting methods. Additionally, the roles of rapamycin combined CDK inhibitors-induced apoptosis were shown by cell viability determination and DNA fragmentation profiles by ELISA method. The

autophagic vacuoles that triggered by rapamycin combined CDK inhibitors were shown by MDC and lysotracker red fluorescence staining.

Purvalanol and roscovitine decreased cell viability due to caspase-dependent apoptotic induction in LNCaP cells more effectively compared DU 145 and PC3 prostate cancer cells. In the presence of rapamycin, the expression profile of Bcl-2 family members was modulated and this effect was found that rapamycin is effective on apoptotic cell death in all prostate cancer cells. However, rapamycin caused different responses in each cell line. The most striking result is that the observation of autophagic vacuoles in rapamycin combined treatment conditions in DU 145 cells. It is suggested that rapamycin may enhance the cell survival in combination therapy model and renders the efficiency of CDK inhibitors. To overcome rapamycin induced autophagy, 3-MA (3-methyl adenine) treatment was utilized with CDK inhibitors and results obtained from cell viability indicate that 3-MA further increased drug-induced cytotoxicity in DU 145 cells.

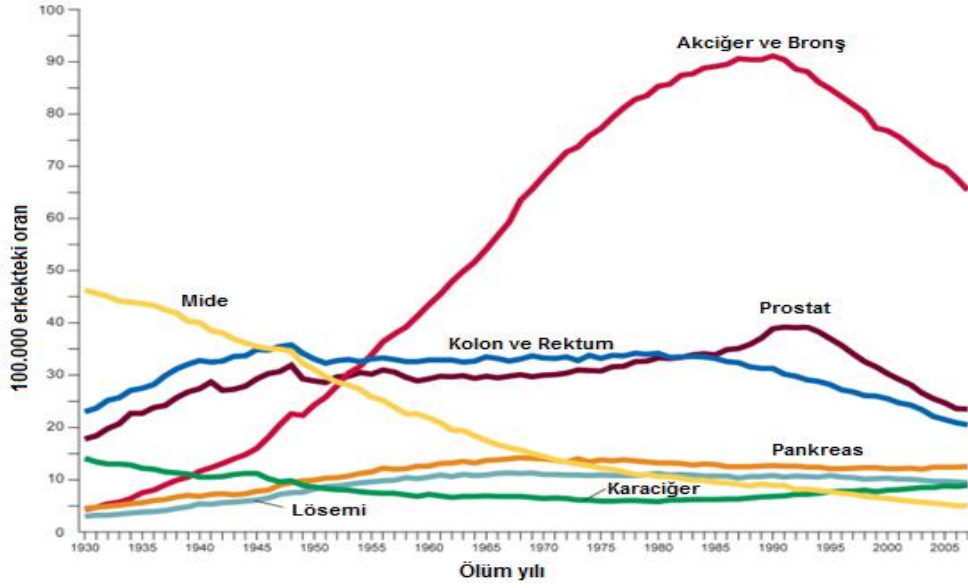
In order to evaluate the potential role of polyamines in drug-induced cell death mechanism, key targets of polyamine machinery were determined in LNCaP and DU 145 prostate cancer cells. Rapamycin co-treatment further upregulated the expression levels of polyamine catabolic enzymes after CDK inhibitor treatment in LNCaP cells but we did not observe the same effect in DU 145 cells. Therefore we concluded that the impaired polyamine catabolic pathway may promote the cell survival mechanism in DU 145 cells.

This study presents the novel results about CDK inhibitors induced autophagy and apoptosis when the mTOR signaling pathway was inhibited. Especially apoptotic CDK inhibitors, purvalanol and roscovitine exert different roles on phosphorylation of p70S6K and activation of cyclin D1 and thereby affected differently cell survival and death decision in prostate cancer cells.

1. GİRİŞ

1.1 Prostat Kanseri

Prostat kanseri, prostat bezindeki hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozularak, organ hacminin büyümesi olarak tanımlanabilir. Avrupa, Kuzey Amerika ve Afrika'nın bazı bölgelerinde erkeklerde görülen en yaygın kanser türüdür ve kansere bağlı ölüm vakaları sıralamasında ikinci sırada yer alır (1). Dünyada görülen en yaygın altıncı kanserdir ve erkeklerdeki deri kanserinden sonra en sık görülen kanser türüdür (1,2) (Şekil 1). Amerikan Kanser Birliği'nin yaptığı çalışmaya göre 2013 yılına ait yeni 238.590 prostat kanseri vakası ve prostat kanseri sonucu ölüm oranı yaklaşık 29.720 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlara göre her altı prostat kanseri hastasından biri ölümle sonuçlanacaktır (3). Türkiye'de sağlıklı bir istatistik sonucu bulunmamaktadır. Fakat Sağlık Bakanlığının yaptığı değerlendirmelere göre prostat kanseri görülme sıklığı 6-7. sıralarda yer almaktadır (4).



Şekil 1. Erkekler arasında yıllık yaşa bağlı kanser ölüm oranları, Amerika Birleşik Devletleri, 1930-2007(5).

Epidemiyolojik gözlemlere bakılarak prostat kanserine neden olan önemli 3 etiyolojik faktör: Hormonal etkiler, diyet ve çevresel ve genetik faktörlerdir.

Yapılan bazı çalışmalarda, erkek hormonlarının prostat kanseri üzerinde etkisi olduğu gözlenmiştir. Prostat kanseri hücrelerinin çoğu hormonlara karşı duyarlıdır ve erkek hormonlarının bulunduğu ortamda proliferasyon hızları yüksektir. Yapılan bir çalışmada testosteron hormonu kanser oluşumunu indüklemiştir (6).

Çevresel faktörler ve beslenme faktörlerinin prostat kanseri üzerinde etkilerini anlamak üzere, farklı çevrelerde yaşayan aynı ırktan grupların kanser insidansları belirlenmiştir. Japonya'da prostat kanseri görülme sıklığı Amerika'nın % 10'u kadar olmasına rağmen, prostat kanseri görülme sıklığı en yüksek ülkeler arasında Kuzey Amerika'da yaşayan ikinci ve üçüncü kuşak Japon asıllı Amerikalılar prostat kanseri insidansı diğer Kuzey Amerikalılarda olduğu gibidir (7).

1.1.1 Hormonal Etkiler

1.1.1.1 Androjenler

Prostat kanserinde androjenlerin rolü tamamı ile aydınlatılmamış olsa da, yapılan birçok çalışmada prostat kanseri gelişimi ve ilerlemesini etkilemektedirler. Androjenler; testosteron, androstenedion, dihidrotestosteron (DHT), dehidroepiandrosteron (DHEA) gibi erkek cinsiyet hormon topluluğudur (8).

Testosteron (T), testislerde sentezlenir ve pasif difüzyon ile hedef doku hücrelerine girer. Hedef doku içerisindeki testosteron, steroid 5 α -redüktaz enzimi ile DHT'ye dönüştürülür. Androjen reseptörleri, hücrede transkripsiyon faktörü olarak görev yapar. Ortamda bulunan testosteron ve DHT steroid-tiroid-retinoid ailesinin üyesi olan reseptöre bağlanmak için yarışa girerler; çünkü bunların reseptöre olan ilgisi aynıdır, fakat fizyolojik etkileri farklıdır. Reseptör hormon kompleksi gen düzenleme bölgesine bağlanarak transkripsiyonun düzenlenmesini sağlar (9).Afrikalı Amerikalılarda prostat kanserinin yüksek oranda görülmesinin nedeni olarak serumda yüksek androjen seviyesi olarak gösterilmiştir (10). Androjenlerin kanser üzerine etkisini incelemek üzere birçok çalışma yapılmış, bunlardan bazıları 5 α -redüktaz enzimi ya da testosteron ile prostat kanserinin bir ilgisi olmadığını gösterirken (11), bunun aksine Gann ve arkadaşları testosteron seviyesindeki artış ile prostat kanseri arasında anlamlı bir ilişki bulmuşlardır (12). Bununla birlikte, androjen ve androjen metabolitlerinin prostat kanseri ile ilişkisi ise tam olarak bilinmemektedir. Bunun nedeni serumdaki tüm androjen seviyesinin ölçümü, dolaşımdaki testosteron düzeyindeki ciddi diurnal değişikliklerle etkilenmektedir. Bir erkeğin hayatı boyunca androjenlere geç ya da erken maruz kalmasının bir sorun yaratıp yaratmayacağı ve konsantrasyonundaki değişikliklerin önemi bilinmemektedir. Yaşlanmaya bağlı olarak artan prostat kanseri görülme sıklığının bir nedeni olarak da, hormon seviyesindeki azalma olduğu düşünülmektedir (13).

Prostat karsinogenezinde androjenlerin farklı etkileri gözlenmesine rağmen ileri evre tedavilerinde androjen seviyesinin baskılanması önemli bir tedavi şeklidir. Androjen konsantrasyonunun azaltılmasıyla ya da androjen reseptörlerinin çeşitli gen terapileri ile aktivasyonunun önlenmesi ile androjen seviyeleri baskılanır. Ancak, bu tedavi kalıcı değildir, bunun nedeni ise hücrelerin, androjen baskılanmasına yanıtız

hale gelmesidir. Diğer bir deyişle “Hormona Dirençli Prostat Kanseri (HDPK)” olarak tanımlanmaktadır. Bu evredeki hastaların tedavileri için, bu evredeki prostat kanseri hücrelerinin androjene duyarlı olmaları, androjen reseptörlerinde mutasyonlar, androjen reseptörleri dışında alternatif sinyal yolları ile transkripsiyonu etkileme gibi moleküler mekanizmaların incelenmesi gerekmektedir (14).

1.1.1.2 Prostat Spesifik Antijen (PSA)

PSA prostat hücreleri tarafından salınan 33 kDa molekül ağırlığında bir serin proteaz glikoproteinidir. Semen sızmasına yardımcı olur. Yetişkin bireylerde PSA'nın normal değeri 0-4 ng/ml arasındadır. PSA seminal sıvı içerisinde yüksek konsantrasyonlarda, serumda düşük konsantrasyonlarda bulunur. Bununla birlikte serumdaki PSA'nın % 65-90 oranında α -1-antikimotripsin ve α -2 makroglobulin gibi proteazlara bağlı halde bulunurken, geri kalanı serbest haldedir. İmmünojenik testlerde serbest PSA ve α -1-antikimotripsine bağlı PSA ölçülebilmektedir. Serumdaki serbest ve bağlı PSA ölçümleri kanser tanısını kesinleştirmek için kullanılmaktadır. Prostat kanserinde PSA üretimi değişkendir ve hücrelerin farklılaşma derecesine bağlıdır. İleri evrede farklılaşmış kanser dokuları, erken evredeki kanser dokularına göre daha fazla PSA üretir (15).

1.1.2 Diyet ve Çevresel Faktörler

Özellikle aynı ırktan olup farklı coğrafi bölgelerde yaşayan yetişkin erkeklerde prostat kanseri görülme sıklığının farklı olması, diyetteki yağ ve kırmızı etle beslenme oranının önemli bir risk faktörü olduğunu göstermektedir. Yüksek miktarda α -linolenik asit (poliansatüre yağ asitidir, sebzelerde ve süt ürünlerinde bulunur) ve kalsiyum (Ca) alımının prostat kanseri ile ilişkisi olduğu tespit edilmiştir. Günlük 600 mg veya daha fazla Ca alan kişilerde, 150 mg veya daha az Ca alan kişilere göre, ilerlemiş ve metastatik kanser riski daha yüksektir (1). Özellikle E vitamini, selenyum ve likopen alımının prostat kanseri riskini azaltırken, kırmızı etin fazla tüketimi prostat kanseri ile ilişkili olmakla birlikte, yüksek ısıda pişirme, heterosiklikaminler gibi çok güçlü karsinojenlerin oluşumu ile sonuçlanır (16).

1.1.3 Genetik Faktörler

Prostat kanseri görülme sıklığını etkileyen önemli bir faktör de genetik yatkınlıktır. Prostat kanserinin ailevi olarak arttığı gösterilmiştir. Babalarında ve erkek kardeşlerinde prostat kanseri olan erkeklerin bu kansere yakalanma riskleri oldukça fazla olmakla birlikte, aynı ailede meme ya da kolon kanseri vakaları bulunan bireylerin prostat kanserine yakalanma riski yine fazla olmaktadır.

Yapılan bazı çalışmalarda, tüm prostat kanseri vakalarının %9 unda ve 55 yaşın altındaki olguların % 43'ü otozomal dominant geçiş gösteren yatkınlık genleri bulunmuştur. 17. Kromozomun kısa kolu üzerinde yer alan ELAC2 geni, 1. Kromozomun uzun kolunda yer alan HPC1 geni, 5-alfa-redüktaz tip II geni, androjen reseptörü geni, PSA geni gibi ailesel ve sporadik prostat kanserine neden olan mutasyonların sıklıkla rastlandığı gen bölgeleri belirlenmiştir (17).

1.2 Prostat Kanseri Terapi Modelleri

Hernekadar cerrahi uygulamalar öncelikli olarak uygulansa da ileri evre prostat kanseri olgularında etkin bir tedavi yöntemi olarak androjenlerin baskılanması metodu kullanılmaktadır. Fakat elde edilen verilere göre, androjen baskılanması yöntemi 1-4 yılları içerisinde yanıtızsız kalmaktadır, bunun nedeni androjenden bağımsız hücre hatları ya da hormona duyarlı prostat kanseri gelişmektedir (18).

HDPK olgularında kesin tedavi için ikincil hormon uygulamaları, kemoterapi, radyoterapi seçenekleri ve yeni geliştirilen ajanlarla hedefe yönelik tedaviler uygulanmaktadır. HDPK olgularında androjen baskılama tedavisine devam edilmelidir, çünkü yapılan çalışmalarda testosteron verildiğinde hastalığın % 94 oranında olumsuz etkilediği gözlenmiştir.

1.2.1 İkincil Hormonal Tedaviler

Testosteron ile yarışa girerek androjen reseptörüne bağlanan flutamid ajanı, HDPK gelişiminden sonra uygulandığında olumlu yanıtlar vermektedir. İkincil hormonal tedavi amacıyla dietilstilbestrol, tamoksifen, megestrol, aminoglutetimid,

hidrokortizon, prednizon ve deksametazon kullanılmıştır. Bu ajanlar yalnız kullanılmaları yanısıra kombine olarak kullanılmaları yaşam süresini uzatmada daha olumlu sonuçlar yaratmıştır. Adrenal steroidlerin sentezini inhibe eden ketokonazolün hidrokortizonla kombine olarak kullanılması gerekmektedir. Ketokonazol tedavisinin etkinliğini irdeleyen çalışmalarda PSA düzeyinde % 50 üzerinde azalış gözlenmiştir.

1.2.2 Kemoterapi Uygulamaları

Prostat kanseri kemoterapi uygulamalarına dirençlidir. Geçmiş yıllarda, kemoterapi sonrası hastalığa yanıt yaklasık % 8,7 düzeyinde kalmıştır. Son zamanlarda melfelan, ifosfamid, oral etoposid, idarubisin, gemitabin, irinotecan ve topotekan gibi tek başlarına kullanılan ilaçlarda hastalığa yanıt oranı % 10'u geçememiştir.

Etki mekanizması tam anlaşılmamış olsa da DNA ile enterlakasyona girerek DNA'nın biyosentezini engellediği düşünölen doksorubisin ile bir alkile edici ajan olan siklofosfamid ile kombinasyonu başarılı sonuçlar vermektedir (19). Etoposid, pirarubisin ve sisplatin kombinasyonları da PSA yanıtını % 70'lere çekmektedir. Mikrotüböller proteinlere bağlanarak bölünmeyi engelleyen estramustin, bir diğer mikrotüböl üzerinden etki gösteren grup olan taksanlar ile kombinasyonunun hormona dirençli prostat kanseri olgularına etkisi araştırılmıştır (20). Günlük estramustin ile birlikte 96 saatlik paklitakselin füzyonunu irdeleyen faz I alışmaları bulunmaktadır. Buradan çıkan sonuçlara göre % 65 PSA oranında ve hastalıktan % 42 oranında yanıt alınmıştır (21).

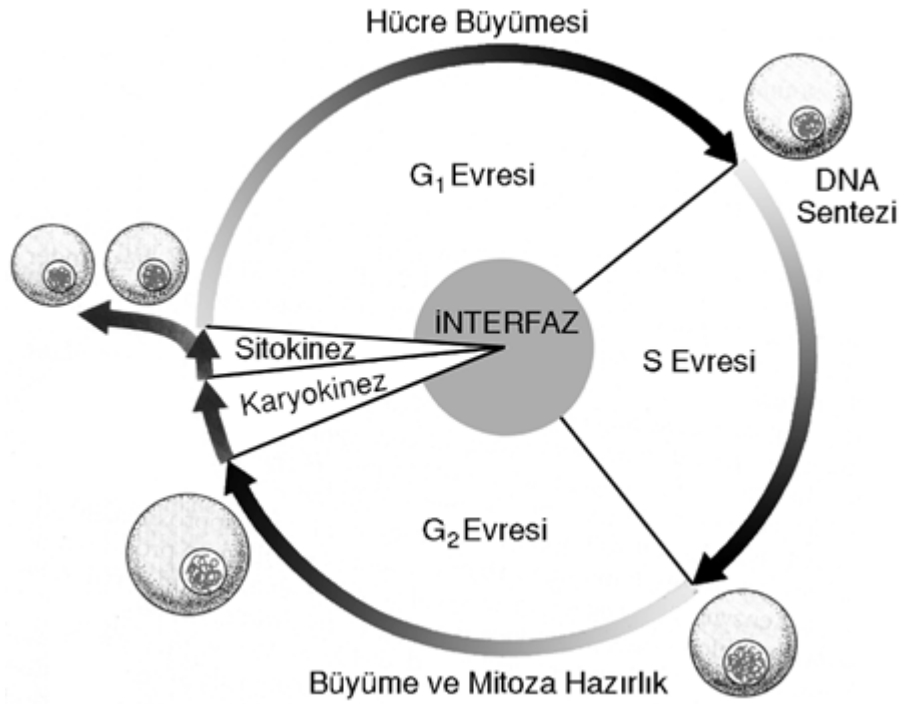
Prostat kanseri olgularında, özellikle hormona dirençli prostat kanseri vakalarında kemoterapi uygulamasından bazı hastalar yarar görebilirken, yaşam süresine anlamlı bir katkı sağlayabilen kesin bir tedavi protokolü gösterilmemiştir. Günmüzde mitoksantron, estramustin ve dositaksel olmak üzere taksanlar içeren tedavi kombinasyonları önemli yararı olan tedavilerdir. Ayrıca radyoterapi uygulamaları da hastalara cerrahi yöntemler ile birlikte önerilmektedir.

1.3 Prostat Kanseri Oluşumu ve Tedavisinde Temel Moleküler Mekanizmalar

1.3.1 Hücre Döngüsü

Kanser anormal hücre çoğalması ile karakterize edilmektedir. Hücre çoğalması hücrenin üreyerek iki yavru hücre oluşturmasını içerir. Hücre proliferasyonu hücre siklusu içinde yer alan bazı kontrol noktaları (“check-points”) tarafından düzenli olarak kontrol edilir. Hücre siklusu proliferasyon, farklılaşma (diferansiyasyon) ve apoptoz gibi temel hücresel fonksiyonları düzenlediğinden büyüme ve doku “turnover”ıyla yakın ilişki içinde bulunur. Bu düzenleme özelliğinin olması organizmadaki hemen hemen her tür fizyolojik (örneğin doku homeostazisi) ve patolojik durumlarda (örneğin tümör oluşumu) hücre siklusunun ne denli kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir. Nitekim kanserlerde hücre siklusunun regülasyonunu sağlayan proteinler olan siklinler veya siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKi)’nin düzeylerinde anormallikler saptanmıştır. Örneğin, siklin D meme ve skuamöz hücre tümörlerinde aşırı eksprese olmaktadır. Hücre bir bölünmeden diğerine geçerken sırasal evrelerden geçer, buna hücre devri adı verilir (Şekil 2) ve şu evreleri içerir: G1, S, G2 ve M fazı. G1, S ve G2 interfaz adı verilen hücre devrinin bir kısmını meydana getirir. Hücrenin genetik materyali S fazında (DNA sentezi) replike olur. M fazı hücrenin iki yavru hücreyi meydana getirdiği fazdır, mitoz ve sitokinez evrelerini içerir. G1 ve G2 gap evreleridir, S ve M fazlarının önceki fazlarıdır (22) (Şekil 2).

Hücre sinyal sistemi organizmaların iç çalışma sistemlerini kontrol ederek, hücrelerin ona cevap vermesini, adapte olmasını ve sağ kalmasını sağlar. Hücre devrinde esas rolü oynayan ve bazıları büyüme faktörü sinyal yolu tarafından regüle edilen genler tarafından kodlanan siklinler ve CDKi’ler önemli sinyal yollarını oluştururlar (23). Özellikle son zamanlarda moleküler düzeyde incelenen kanser çalışmalarında hücre döngüsü ve bu döngüyü oluşturan elemanlar önemli bir yer almaktadır (24).



Şekil 2. Hücre siklusunun şematik şekli.

1.3.2 Siklinler ve Sikline Bağımlı Kinazlar (CDK), Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörleri (CDKi)

Hücre siklusuna özgü birtakım proteinler olan siklinler, CDK ve CDKi'ler tarafından özgün olarak kontrol edilir (25). Siklinler, CDK ve CDKi'lerinin düzeyleri hücre siklusunun çeşitli aşamalarında farklılık gösterir ve oldukça karışık bir düzen içinde siklusun ilerlemesini düzenlerler. CDK'lar kendi başlarına bulduklarında inaktiftirler. Ancak, siklin'e bağlandıklarında aktifleşirler ve böylece aktif siklin-CDK kompleksleri meydana gelir. Siklinler bu komplekslerin regülatör alt üniteleri, CDK'lar ise katalitik alt üniteleridir. Siklinler (A, B1, D ve E) siklusun çeşitli fazlarında periyodik olarak bir taraftan sentez edilirlerken diğer taraftan da yıkılırlar. Bu yüzden de siklinler olarak isimlendirilmişlerdir. Siklinlerin periyodik yapım ve yıkımları, dolayısıyla ilişkide buldukları CDK (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7 ve CDK25)'ların aktivitelerinin düzenlenmesini sağlar (26).

CDK'ların aktiviteleri sadece siklinlerle düzenlenmez ayrıca özgün fosforilasyon/defosforilasyona yol açan başka yollarla da düzenlenir. CDKi'leri (p15, p18, p19, p21 ve p27) ise ya siklinler, ya CDK'ların kendisi ya da siklin-CDK komplekslerine bağlanarak CDK'ların aktivitelerini inhibe ederler. Siklinlerin

seviyeleri transkripsiyon düzeyinde regüle edilir. Yıkımları ise “ubikuitin” metabolik yoluyla sağlanır. D tip (D 1, 2, 3) siklinler başlama siklinleri olarak adlandırılırlar ve büyüme faktörleri veya mitojenlere yanıt olarak eksprese edilirler. Mitojenler ortamdaki uzaklaştırıldığında ise hızla yıkılırlar. Hangi tip Siklin D'nin eksprese edileceği doku tipine özgüdür. Örneğin, T lenfositler daha ziyade D3 (bir miktar da D2) tipini eksprese ederler. D tip siklinler CDK4 ve CDK6'yı regule ederler. Siklin E, G1/S fazlarının sınırında geçici olarak sentez edilir ve hücre S fazına girdiği anda hızla yıkılır. Siklin E, CDK2'yi regule eder. Siklin A ve B1 mitotik siklinlerdir. Siklin A, S fazı boyunca sentez edilir ve anafaz sırasında da yıkılır. Siklin A, CDK2 ile kompleks yapar ve bu kompleksin DNA replikasyonunda direkt rolünün olduğu düşünülmektedir. Siklin B1 ise S fazının geç döneminde sentez edilir ve G2 fazından M fazına geçerken sentezi maksimal düzeye erişir, ardından anafazda yıkılır. Siklin B, CDK2 ile etkileşime girer ve bu kompleks MPF (“M-phase/maturation promoting factor”) olarak da bilinir. Siklin B'nin anafazda yıkılmasıyla birlikte hücre mitozdan çıkar ve G1'e tekrar geri döner. Görüldüğü gibi bu proteinler, biyokimyasal olarak ifade etmek gerekirse, birbirleriyle protein: protein kompleksleri (interaksiyonları) oluşturarak birbirlerinin aktivitelerini düzenlerler. Bu aktivitelerin düzenlenmesi, moleküler düzeyde ifade etmek gerekirse, fosforillenme yoluyla gerçekleşir. CDK'lar siklinlerle interaksiyon sonucu aktive olurlarken, CDKi'leriyle iletişim kurlmaları halinde ise inhibe olurlar. CDK'ların aktif formları, substratları fosforilleyerek onları aktif hale getirir. Böylece substrat aktivasyon durumuna göre hücre siklusu ya durur, ya da bir sonraki aşamaya geçer. Bir örnekle açıklamak bu ilişkilerin daha iyi anlaşılabilmesini kolaylaştırabilir. Bunun için, aynı zamanda bir tümör supressör gen olan retinoblastoma geninin ürünü ve aynı zamanda CDK'ların substratlarından biri olan Rb proteini (pRb) örnek olarak verilecektir (27). pRb hücre bölünmesi ve farklılaşmasının kontrolünde anahtar bir rol üstlenir. Terminal farklılaşmasını tamamlamış, dinlenme fazındaki veya yaşlı “senesens” hücrelerde pRb eksprese edilir ve defosforile halde bulunur. pRb, normal işlevi gereği hücre siklusunu dolayısıyla proliferasyonu G1 fazının sonunda bulunan bir kontrol noktasında (G1/S kontrol noktasında) durdurur. pRb hücre siklusu üzerindeki bu inhibitör etkisini hücrenin G1 fazından S fazına geçişini sağlayan bir transkripsiyon faktörü ailesi olan E2F ailesini bağlayarak (dolayısıyla inaktifleştirerek) gerçekleştirir. E2F ailesinin inaktifleşmesi sonucu hücre bir sonraki faz olan S fazına ilerleyemeyeceğinden siklus durur. Fakat eğer istirahat yani G0 fazındaki

(“quiescence”) bir hücre bölünme sinyali almışsa pRb'nin normalde hemen hemen G1 fazı süresince hipofosforile durumda olan formu G1 fazının sonuna doğru bir yerde (ilk kontrol noktasında, G1/S) CDK'ların etkisiyle fosforillenir ve M fazına kadar fosforile formda kalır. Fosforile durumdaki pRb artık E2F ailesini bağlayamayacağından E2F ailesi pRb'den bağımsızlaşır. Böylece E2F ailesinin siklus ilerletici etkisi sonucu hücre artık G1 fazında kalmaz ve bir sonraki faz olan S fazına girer. E2F ailesi ise etkilerini S fazına girişi sağlayan bir takım düzenleyici proteinlerin (örneğin, DNA polimeraz α , myc, ve timidinkinaz) ilgili genlerini aktive ederek gösterirler. Sonuçta görüldüğü gibi, CDK'ların aktivasyonu veya inhibisyonu p Rb ve E2F üzerinden hücre siklusunun ilerlemesine veya durmasına neden olur. CDK'lar tarafından fosforillenmiş substratlar tekrar hipofosforile hale fosfatazların da etkisiyle dönerler (28).

Özetlemek gerekirse, hücre siklusunun çeşitli fazlarında siklinler, CDK'lar ve CDKi'lerin çeşitli üyelerinin aktivasyonları gerçekleşir. Örneğin, Siklin E en yüksek seviyeye G1 fazının geç döneminde; Siklin A ve B ise G2 ve M'de çıkar. Siklin D ise G1 fazının erken döneminde artmaya başlar ve fazın sonuna doğru gittikçe artar. Her bir siklin özellikle spesifik CDK'sına bağlanır. Değişik fazlarda spesifik siklinlerin ve CDK'ların varlığı veya yokluğu herhangi bir fazda hangi kinazın aktifleşeceğini belirler. CDK'lar mitojenik büyüme faktörleri tarafından aktiveleştirilirler.

1.3.3 Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörleri (CDKi)

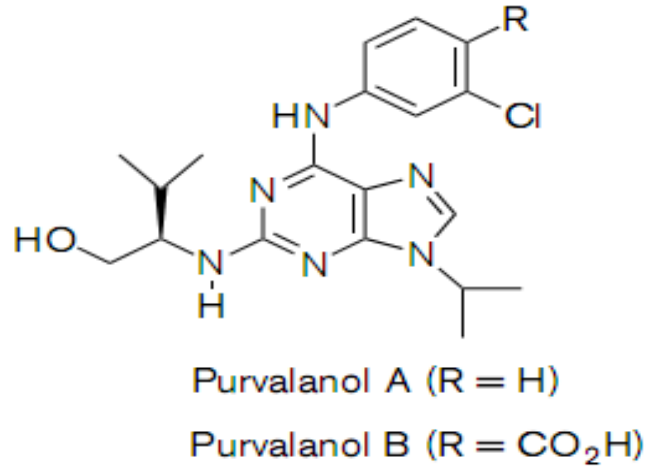
CDKi 1993-1995 yıllarında tanımlanmış ve klonlanmışlardır. Hücre döngüsünün negatif kontrolünden sorumludurlar (29). Hücre döngüsü ilerlemesi, döngünün devamını sağlayan siklinlerin, katalitik partneri olan CDK'lar tarafından kontrol edilmektedir. Düzenli olarak kontrol edilmeyen CDK aktivitesi, artmış hücre çoğalmasına ve genomik kararsızlığa neden olmaktadır. Bu durum; hücrenin ölümsüzlük kazanması veya kanserleşmesi ile sonuçlanır. CDK'ların hücre döngüsündeki işlevlerinin düzenlenmesi, CDKi'leri tarafından gerçekleştirilmektedir. Büyümeyi inhibe edici sinyalden sonra, CDK aktivitesini düzenleyen ve hücre döngüsü baskılanmasını uyaran üç farklı Cip/Kip (Cdk Inhibitory protein / Kinase Inhibitory Protein) ailesi CDKi tanımlanmış olup, bunlar; p21Cip1 (CDKN1A), p27 Kip1 (CDKN1B) ve p57 Kip2 (CDKN1C) dir (30). İlk klonlanan Cip/Kip üyesi

CDKi p21 olup, DNA hasarına karşı oluşan cevapta G1 baskılanmasından sorumludur. p27 ise antimitojenik sinyallere karşı oluşan cevapta, büyümeyi düzenleyen önemli bir moleküldür (31).

CDKi, hücre döngüsündeki ve tümör baskılanmasındaki işlevlerinden dolayı, kanser gelişiminde birer genetik değişiklik hedefidirler. Ayrıca kanser gelişim sürecinde yer alan diğer molekülerin genetik değişimi ile başlayan onkojenik süreçlerde, fonksiyonlarında meydana gelen bozulmalar ile de ikincil olarak etkili olabilmektedirler. Bu çalışmada hücre siklusunun baskılanması ile hangi ölüm yollarının tetiklendiğini araştırmak üzere CDKi'ler olarak purvalanol ve roskovitin kullanılmıştır.

1.3.3.1 Purvalanol

CDKi'ler spesifik farmakolojik çalışmalarda hücre döngüsünü oluşturan moleküler yolaktaki enzimlerin fizyolojik etkilerinin ve bu enzimlerin substratlarının tanımlanmasına katkı sağlar. Buna ek olarak, bazı inhibitörler CDK'ların, fizyolojik ve farmakolojik mekanizmalarla tetiklenen hücre canlılığı üzerindeki rolünün anlaşılmasını sağlar. Özetlemek gerekirse, CDKi'ler, hücre proliferasyonunun kontrolsüz olduğu hastalıklarda, kanser gibi, potansiyel terapötik ajanlardır.



Şekil 3. Purvalanolün kimyasal yapısı (32)

Purvalanol 2-(1R-Isopropyl-2-hydroxyethylamino)-6-(3-chloroanilino)-9-isopropylpurine), CDK1 ve CDK2 için yüksek duyarlılık gösteren CDKi'dir (Şekil 3). ATP'ye bağlı yarışmalı inhibitör olarak fonksiyon gösterir (33). Hücre

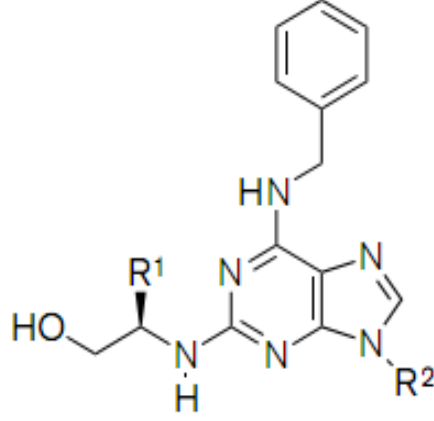
döngüsünün G1 ve G2 fazı progresyonunu tersinir olarak inhibe eder. Purvalanol S fazına girişi, uygulanan purvalanol konsantrasyonuna bağlı olarak inhibe eder. Örneğin; 10 mM purvalanol, 3 mM purvalanole göre S fazına girişi daha etkili şekilde inhibe eder. Purvalanolün hücrelere uygulandığı konsantrasyona ek olarak, uygulama süresi hücre üzerinde yaratacağı etkiyi değiştirmektedir.

Hücre proteinlerin fosforilasyonunu inhibe eder. Hücre döngüsünde G1-S fazına geçişte anahtar protein olan Rb proteini büyüme sinyali olmadığı zaman hipofosforile durumdadır. Purvalanol, Rb proteininin fosforilasyonunu inhibe eder. Rb proteini G1 fazından S fazına geçişte CDK4 tarafından fosforile edilir. Purvalanol, CDK4 ün Thr172 rezidüsüne etki ederek Rb proteinini fosforile etmesini engellerken, CDK7'nin aktivasyonunu engelleyemez.

Purvalanol doksorubisin gibi sitotoksik bir ajan ile kombine edildiğinde hücre döngüsünü G2 fazında durdurduğunu ve hücre proliferasyonunu engellediği gözlenmiştir. Purvalanolün transkripsiyona olan etkisi çalışılmakta olup, gen ekspresyonunun başlangıç ve uzama aşamasında inhibisyonu gözlenmemiştir (34).

1.3.3.2 Roskovitin

Roskovitin (6-Benzylamino-2-(R)-(1-ethyl)-2-hydroxyethylamino-9-isopropylpurine) etkili; fakat Cdc2, CDK2, CDK5 ve CDK7'nin tersinir ve ATP bağlı yarışmalı inhibitörüdür (Şekil 4) (35). Hücreleri hücre döngüsünün G1 ve G2/M fazında durdurur (36). Nüklear fragmentasyon oluşturarak DNA sentezini inhibe eder, aynı zamanda insan hücre hatlarında apoptozu indükler. İlginç olarak, roskovitin uygulanan hücreler, hücre döngüsünün her aşamasında apoptoza gidebilir. Bu olay roskovitin hücre büyümesine olan etki mekanizmasından kaynaklanmaktadır. Potansiyel bir antikanser ajandır. Cdc2 ve CDK2 moleküllerinin Ser315 rezidüsüne etki eder. Roskovitin Siklin D1 kaybını sağlayarak Rb proteinini inhibe eder ve mitojen –aktive edilen protein kinaz yolağını aktive ederek apoptozu indükler (37).



Olomoucine ($R^1 = H, R^2 = CH_3$)

Roscovitine ($R^1 = CH_2CH_3, R^2 = CH(CH_3)_2$)

Şekil 4. Roskovitinin kimyasal yapısı (38)

1.3.4 CDK ve Siklinlerin Kansere İlişkisi

İnsan tümörlerinde hücre devri düzenleyicilerini kodlayan genler çoğu zaman mutasyona uğramıştır, bu da hücre devrinin hatalı regülasyonunun karsinogeneze sebep olabileceğini göstermektedir. Hücre sinyali otonomisi kanserin önemli nedenlerinden biridir. Büyüme faktörü sinyal yolunun moleküler komponentlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar ve büyüme sinyali otonomisine sebep olan hücre devri regülasyonunu kodlayan genlerdeki mutasyonlar önemlidir.

Kanser olgularındaki mutasyonlar, CDK, siklin, CDK'yı aktive eden enzimler, CDKi, CDK substratları ve hücre döngüsü kontrol noktaları proteinlerini kodlayan genlerde meydana gelir. Siklinlerin over-ekspresyonunu ve CDK genlerinin amplifikasyonunu içerir. Siklin D geninin DNA amplifikasyonu 6 meme kanserinin 1'inde meydana gelir, bu da yaklaşık olarak % 15 civarındadır (39).

Rb proteini G1 fazından S fazına geçişte hücre devrinin kontrol noktasıdır. Bu kontrolü transkripsiyon faktörü E2F ve HDAC larla işbirliği yaparak ortaya koyar. Fakat kanser olgularında G1/S kontrol noktası hasarlıdır. Rb proteininde gerçekleşen mutasyonlar, CDK/siklin aktivasyonunun ve ya CDKi'lerin kaybına neden olur.

Kanser olgularında CDK'lar genelde mutant durumdadır. Örneğin, Cdk4 ün amplifikasyonu melanoma, sarkoma ve gliomada gözlenmiştir. CDK1 ve CDK2 overekspresyonu kolon tümörlerine neden olur. Bir fosfataz ailesi olan Cdc25, G1 fazından, S fazına geçişte önemli bir regülatördür. Cdc25'in overekspresyonu CDK/siklin aktivasyonunu bozar ve bu mutasyona % 32'lik bir oranla meme kanserinde rastlanmıştır (40). Androjene duyarsız prostat kanseri hücresi olan DU 145 üzerinde yapılan CDK inhibitörü uygulamasında CDK2, Siklin D1 ve Siklin E inhibisyonu gözlenmiştir (41).

Siklin D, CDK4 ve CDK6'ya bağlanan bir anahtar molekülüdür. Birçok kanser türünde Siklin D üzerinde mutasyonlara rastlanmıştır. Bir çeşit lenfoma olan B hücreli tümörlerinde Siklin D1 translokasyonu vardır. Siklin D1'in overekspresyonu meme, prostat ve akciğer kanserlerinde gözlenmiştir (42,43).

Siklin E, G1/ S geçişinde önemli bir role sahiptir ve Siklin E'nin yüksek seviyelerdeki salınımı birçok kanser türünde gözlenmiştir. Bu kanser türleri arasında prostat kanseri de vardır. Bir CDK inhibitörü olan purvalanol, prostat kanseri hücreleri üzerinde Rb proteini ve Siklin E gibi CDK substratlarının fosforlanmasını inhibe eder (44).

Hücre devrini hedef alan terapötik stratejiler halen geliştirilmektedir ve birçoğu da klinik deneme evresindedir. Kinazlar hücre devrinde asal rolü oynadığı için ve karsinogenezdeki rolleri belirlendiği için kinaz inhibitörlerinin saptanması ilaç stratejisi geliştirilmesi bakımından önemlidir. Flavopiridol adı verilen yarı sentetik flavonoid denenen tüm CDK'larda rekabet eden inhibitör olarak etki yapar ve bunu onların ATP bağlayan yerlerini hedef alarak yapar. Roskovitin, purvalanol, BMS-387032 halen klinik araştırmaları devam eden CDK inhibitörleridir (45).

1.4 Apoptoz

Apoptoz terimi ilk olarak 1972 de Kerr tarafından (46) nekrozdan farklı olarak gerçekleşen diğeri bir ölüm şekli için tanımlanmıştır ve fizyolojik hücre ölümünü ifade eder. Eski bir yunan terimi olan apoptoz, kelime anlamı olarak yaprakların ağaçtan, petallerin çiçekten doğal olarak düşmesi anlamına gelmektedir. Bugün de bu terimin kullanımı uygundur ve fizyolojik nedenlerden kaynaklanan hücre ölümünü anlatır. Teorik olarak apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak tanımlanabilir. Böylece hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar vasıtasıyla gerçekleşen hücrel lezyonların ya da genetik aktörlerle aktive edilen hücrel intihar programının apoptoza neden olduğu söylenebilir. Fizyolojik bir işlem olarak apoptoz, normal gelişim sırasında ve olgun organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi esnasında spesifik hücrelerin kaybindan sorumludur. Apoptotik hücre sayısı kişinin ya da organizmanın sağlıklı ya da hasta oluşunu belirlediğinden, apoptozun fonksiyonel mekanizmaları hücrede denge unsurudur. Bu da; apoptoz oranının azalması ile hücre sayısının artması ve bunun aksine apoptoz oranının artması hücre sayısının azalması ve istenmeyen doku tahribatı meydana gelmesi anlamındadır (47).

Apoptoz gelişim biyolojisinde, normal doku “turnover”ında ve immun sistem hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları gibi bazı önemli fizyolojik süreçlerdeki rolü ortaya çıktıkça önemi de hızla artmıştır. Otoimmün bozuklukların, AIDS’in, Alzheimer hastalığının da dahil olduğu bazı major nörodejeneratif bozuklukların ve hatta malignitelerin dahil olduğu daha birçok patolojik durumlarda da rol aldığı anlaşılmıştır (48,49).

Apoptoz tek hücreli organizmalarda hücre ölümünün tek yoludur. Çok hücreli organizmalarda ise genetik oluşumlu hücre hasarının bloke edilmesi ya da hücrenin tamamen yok edilmesi apoptoz vasıtasıyla gerçekleşir. Böylece hasarın yayılması ve tümör oluşumu gibi zararlı olasılıklar engellenmiş olur. Apoptoz olayının oluşmasından daha önce hücrel replikasyon işlemi durur (DNA onarımı) eğer bu esnada DNA tamiri gerçekleşemezse apoptoz ile sonuçlanan olaylar serisi başlar. Bu

sırada apoptozun başlayıp başlamaması hasarın boyutuna, hücrenin tipine ve hücrenin üretkenlik potansiyeli olan tümör geliştirme riskine bağlıdır. Apoptoz sadece intrauterin gelişme esnasındaki organogenez ve sinaptogenez olaylarında değil, aynı zamanda farklılaşmış dokuların olgunlaşmasında da esastır. Çünkü apoptoz vücudun bütünündeki hücre sayısının sabit tutulmasını ve immün sistem faaliyetlerinin gerçekleşmesini sağlar. Bu son olaya örnek olarak, immün bir reaksiyonun sonucu dikkate alınacak olursa; bu noktada aktive edilmiş lenfositlerin direkt apoptoz vasıtasıyla kendi antijenlerini elimine ettikleri görülür. Böylece apoptotik hücre miktarında görülen bir artış, daha önce de belirtildiği gibi dengenin olumsuz yönde bozulmasına; Alzheimer ve Parkinson gibi dejeneratif hastalıklardan ülseratif kolitler, AIDS gibi kronik hastalıklara ve hatta immünolojik hastalıklara bile neden olabilir (50). Ayrıca apoptoz; el ve ayak parmak taslakları arasındaki ara dokunun ortadan kalkmasında, omuriliğin şekillenmesinde, erkek fetüslerde müller kanalının tahribatı esnasında, viral enfeksiyonlarda Councilman cisminin oluşumunda ve iltihapta nötrofil ölümünün sağlanması ve menstrual siklus gibi birçok olayda görülür. Yapılan *in vitro* çalışmalar apoptozun ani gerçekleşen hızlı bir olay olduğunu gösterir. Apoptotik uyarıdan sonra hücre hızla ortamından uzaklaşır; yuvarlaklaşırken içeriği bir araya toplanır ve sitoplazması büzülür. Bu büzülme kabarma gelişimi esnasında şiddetle gelişen aktivitelere yansır. Olayın dinamiği sitoplazmanın kaynamasına benzetilebilir. Protoplazmanın zardan uzaklaşmasından, apoptotik cisimin oluşumuna kadar bütün apoptotik olaylar zinciri birkaç dakika sürer. Bununla birlikte apoptotik hücrelerin fagositozu için daha uzun bir zaman gerekir, hatta bu işlem 12-18 saat sürebilir (51).

Apoptozun gerçekleşmesi sırasında oluşan DNA çözülmesi, apoptozun mekanizma ve seviyeleriyle ilgili çalışmalarda önemlidir. DNA çözülmesi olayı kromatin yığılmasına dayalı apoptoz sırasında çarpıcı bir şekilde ortaya çıkar. Apoptoz işlemi aktive edildikten 1 saat ya da daha uzun bir süre sonra DNA da tek iplikte bir çentikle başlayan çok karakteristik ve geri dönüşsüz bir parçalanma görülür. Böylece bu çözülmenin apoptozda bir anahtar olduğu düşünülür. DNA yarıklanması, DNA yı parçalayan enzim olan endonükleaz aktivitesini artırdığından önemli role sahiptir. Bu enzim aktivasyonu muhtemelen Ca/Mg oranının 1 ya da daha fazla oluşuna bağlı olabilir. Ama yine de DNA çözülmesi apoptoz için şart değildir. Sağlıklı bir hücrede basit hücresel ve moleküler bir olay herhangi bir anda

apoptoza neden olabilir. Bu durum hücrelerin zaten sahip oldukları intihar programını gerçekleştirip gerçekleştirmeyeceklerini belirleyen inhibitör bir molekül taşımaları gerektiğini gösterir. Apoptoz çalışmalarında DNA fragmentasyonu incelenmektedir. Bu birkaç yöntemle incelenebilir; DNA laddering, DAPI boyama gibi (52).

Apoptoza uğrayan hücre fagositoz sırasında makrofajlar ile yutulur ve komşu hücreler apoptoza uğrayan hücrelerin sergilediği moleküler belirteçleri (fosfotidilgliserin) tanır. Apoptoz hücre büzülmesi, tomurcuklanma ve kromatin kondensasyonu ve fragmentasyonu ile karakterize edilir ve bütün bunlar son derece düzenlidir. Apoptoz bu açıdan nekroz ile kesin olarak karşıttır, nekrozda hücre membranları geçirgen hale gelir ve hücre içeriği etraftaki dokulara dağılır ve inflamasyona neden olur. Apoptoz ve nekroz arasındaki morfolojik farklılıklar Şekil 5 te gösterilmiştir (53).



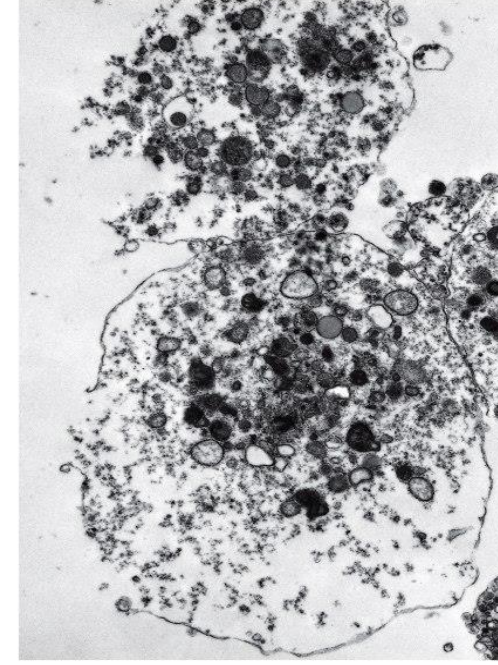
(A)

10 μm

Apoptotik hücre



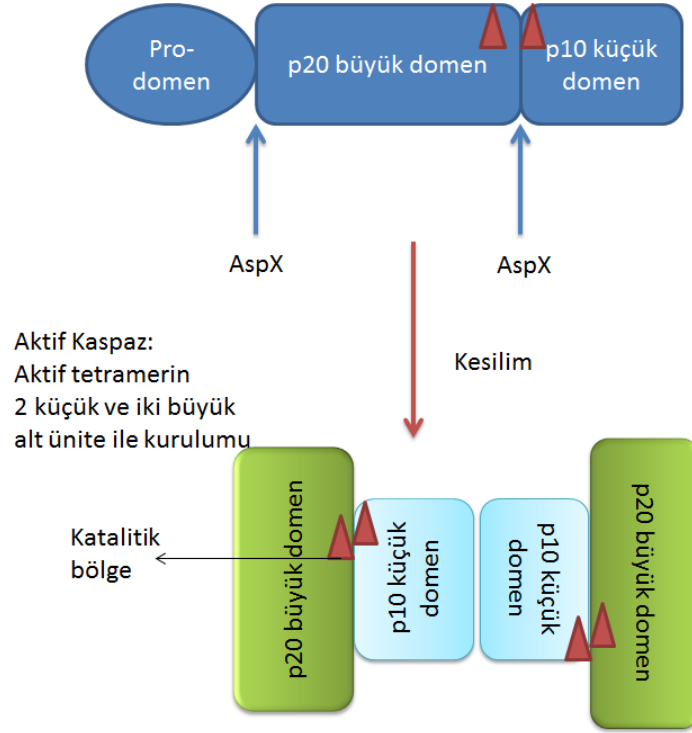
Fagosite edilmiş apoptotik hücre



Nekrotik hücre

Şekil 5. Apoptotik hücre ile nekrotik hücrenin morfolojik açıdan farkı (54).

Memelilerde en az 14 kaspaz tanımlanmıştır. Filogenetik analiz sonucunda gen ailesinin ICE (Kaspaz-1) ile ilişkili ve Ced-3 benzeri olmak üzere iki alt grubu olduğu görülür. Proenzimlerin kısa (Kaspaz 3, 6, 7) veya uzun prodomain barındırmalarına göre de kaspazları daha alt gruplara ayırmak mümkündür. Alternatif olarak bu proteazlar, substrat özelliklerine göre de gruplandırılabilir. Günümüzdeki modern yaklaşım ise proteazları üç gruba ayırmaktadır (Şekil 6).



Şekil 6. Pro-kaspazlar iki aktif bölgesinde AspX den kesilerek aktifleşir.

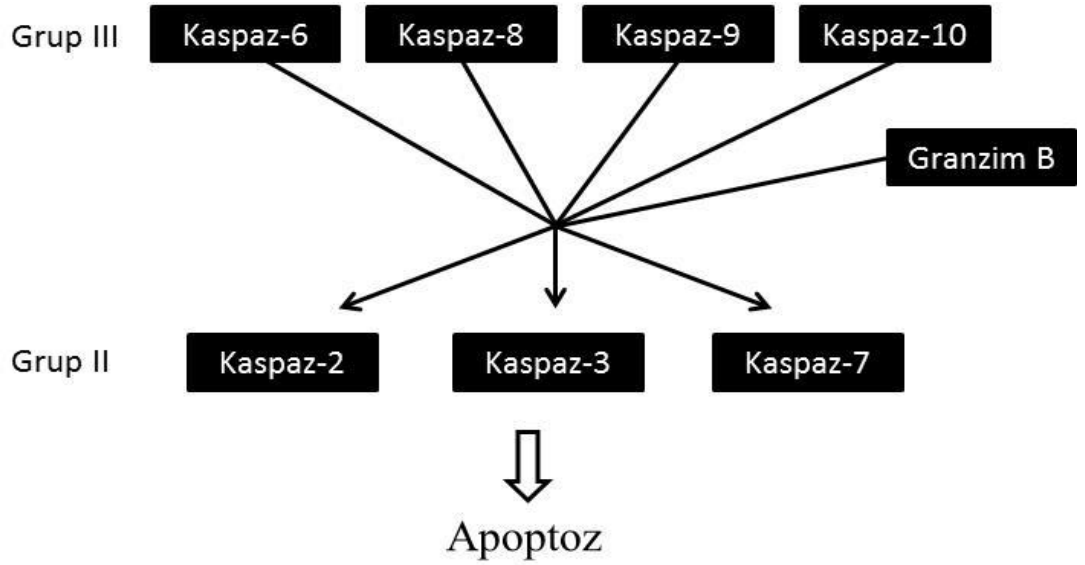
Grup 1: Sitokin matürasyonuna aracılık edenler (Kaspaz-1, 4, 5, 13) - ICE ailesi,

Grup 2: Apoptotik hücre ölümü sürecinde efektör görevi üstlenenler (Kaspaz-2, 3, 7) - Ced 3 ailesi,

Grup 3: Apoptotik hücre ölümünde aktivatörler (Kaspaz-6, 8, 9, 10) - Ced 3 ailesi (55).

Kaspazlar tetrapeptit motiflerini amino asit özelliklerine göre tanırlar ve p4 pozisyonundaki amino asitlere göre üç spesifik gruba ayrılır. Grup 1 kaspazlar (Kaspaz-1, 4, 5, 13) P4 pozisyonunda hidrofobik amino asitleri tanırlar ve sitokinlerin maturasyonuna aracılık ederler. Grup 2 kaspazların ayırma noktası hücre

ölümü sırasındaki pek çok proteinlerde gözlenir ve bununla ilişkili olarak da grup 2 kaspazlar (Kaspaz-2, 3, 7) apoptozun asal efektörleri olarak bilinirler. Grup 3 kaspazlar (Kaspaz-6, 8, 9, 10) ise P4 pozisyonunda alifatik amino asitleri tanır ve grup 2 kaspazların aktivasyonunda görev alır (Şekil 7). Kaspazlara ek olarak bir serin proteaz olan granzim-B gibi başka proteazlar da kaspaz aktivasyonunda görev alarak ve bazen de kaspazların yerine fonksiyon görerek apoptotik hücre ölümüne katkıda bulunur (Şekil 7).



Şekil 7. Kaspazların moleküler sıralanışı.

Bu sıralanmanın istisnaları da mevcuttur; örneğin Kaspaz-2 kendiliğinden aktive olabilir. Kaspaz-6 efektör ise proteaz olarak görev alabilir.

Kaspazlar inaktif üç parçalı proenzimler olarak sentez edilirler. Aktivasyonları sırasında aspartat (P1) - X (P2) bağının ayrılması ile proenzimden, küçük ve büyük alt üniteleri içeren aktif enzim oluşur. Ayrılma noktasında aspartatın bulunması kaspazın oto-aktif ya da aktive edilebilir olmasıyla uyumludur. Ayrılma işleminden sonra 2 büyük ve 2 küçük alt ünitelerden oluşan tetramer yapısına sahip kaspaz yapısı izlenir.

Kaspaz aracılı apoptozun aktivasyonunda üç ayrı yolun varlığı bilinmektedir;

- Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptoz
- Hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile tetiklenen apoptoz
- Endoplazmik retikulum aracılı apoptoz

1.4.1.1 Ekstrinsik Yolak: Hücre Yüzey Reseptörleri Aracılığı İle Tetiklenen Apoptoz

Fas ligand gibi bir ölüm faktörü ve ya tümör nekroz faktörü (TNF) sırası ile Fas reseptörü ve TNF reseptörü gibi transmembran ölüm reseptörü tarafından kabul edilir. Fas ligand komşu hücrelerin plazma membranına bağlıdır. Ligand ölüm reseptörlerine bağlandığı zaman yapısal bir değişiklik meydana gelir ve birkaç reseptör bir araya gelir, oligomerizasyon gerçekleşir. Böylelikle hücre dışından gelen moleküllerin bağlanmasıyla Kaspaz 8' i aktive eden sinyaller yayılır (56) (Şekil 8).

Kaspaz 8 ekstrinsik yolakta, başlatıcı kaspaz olarak görev yapar; çünkü reseptör ile apoptotik proteazlar arasındaki ilk bağlantıdır ve bir anahtar niteliğindedir. Aktive olan Kaspaz 8, diğer kaspazları (Kaspaz 3, 6, 7) kırar ve aktive eder. Sonuç olarak enzim kaskadı spesifik hedef proteinini kırar ve apoptoz meydana gelir. Elbette bu olay apoptoz inhibitörü c-flip tarafından inhibe edilebilir. Prokaspaz 8'in aktif Kaspaz 8'e dönüşünü engeller.

Sonuç olarak, enzim kaskadının hedeflediği proteinlerin proteolizi, hücre yıkımını meydana getirir. Hedef proteinler arasında hücre iskeleti proteinleri; aktin, nükleusun büzülmesine neden olan laminler ve DNA'yı nükleozomlar arasından kırarak DNA ladder oluşturan DNaz vardır. Apoptozun en önemli belirteçlerinden birinin, DNA laddering olduğu daha önce belirtilmişti.

1.4.2 Mitokondri/ Sitokrom C Aracılı İntrensik Yolak

Apoptozun intrinsik yolağı dışarıdan gelen uyarılara (FAS, TNF) duyarlı değildir. DNA hasarı ve oksidatif stres gibi hücre içinden gelen uyarı, apoptozun intrinsik yolağını mitokondrinin dış membranına etki eden Bcl-2 ailesi proteinleri aracılığıyla indükler (57).

1.4.2.1 Pro-apoptotik ve Anti-apoptotik Bcl-2 Ailesi Üyeleri

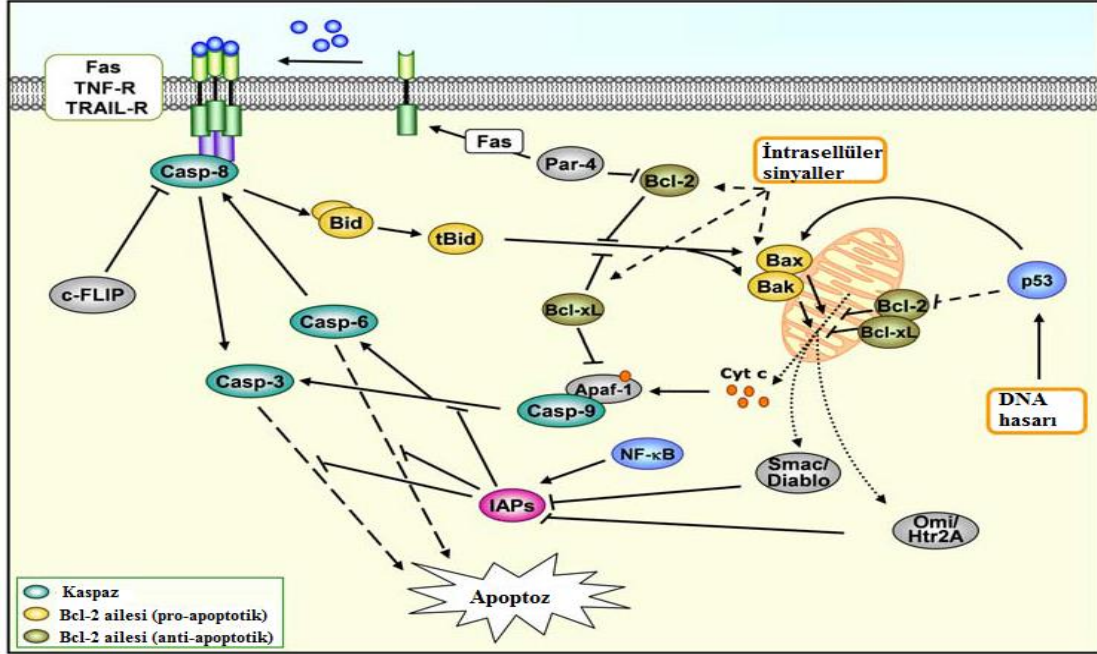
Bcl-2 ailesinin yaklaşık 20 üyesi vardır, hepsi en az bir Bcl-2 homoloji (BH) domaini içerir. Bu domain protein-protein ilişkisine aracılık yapar. Aile üyelerinin çoğu ya üç ya da dört BH domaini paylaşır. Bcl-2 proteinlerinin bir grubu apoptozu inhibe (anti-apoptotik) eder, diğeri ise teşvik eder (pro-apoptotik). Pro-apoptotik moleküllerden oluşan grup içinde BH3 only proteinleri olarak isimlendirilen alt grup vardır. BH3 only proteinleri pro-apoptotik moleküllerin aktivitesini ya indükler (BH3 only aktivatörleri) ya da anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerine bağlanarak inhibe eder. Mitokondri dış membranı üzerinde biraraya gelen bcl-2 ailesinden Bax ve Bak molekülleri, oligomerize olur ve membran üzerinde bir kanal oluşturur. Altı ya da 8 molekülün oligomerizasyonu, Bax ve Bak proteinlerinin şekilsel değişikliği sonrası insersiyonundan sonra meydana gelir. BH3 only proteinlerinden Bid ve Bim tarafından indüklenir. Mitokondri içinde bulunan Sitokrom c ve Prokaspaz 9'un salınımını sağlar (57).

Tablo 1: Pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri.

Anti-apoptotik üyeler	Pro-apoptotik üyeler	BH3-only pro-apoptotik üyeler
Bcl-2	Bax	Bid
Bcl-x _L	Bak	Bad
Bcl-w	Bok	Bim
Mcl-1	Bcl-G	Bik
Bcl2l10	Bcl-rambo	Bmf
Bfl-1	Bfk	Noxa
Bcl2l12		Puma

Sitoplazmaya serbestlenen Sitokrom c ve Prokaspaz 9 apoptozom adı verilen komplekste birikir ve aynı zamanda dATP de Apaf-1'e bağlanır. Sitokrom c'nin Apaf-1'e bağlanmasıyla tekerleğe benzer bir kompleks oluşur. Halkasal kompleks içerisinde CARD adı verilen bir domain bulunur. CARD domaini Prokaspaz 9'un APAF-1'e bağlanmasını sağlar.

Apaf-1 bir kofaktör proteindir ve Prokaspaz 9 aktivasyonu için gereklidir. Kaspaz 9 intrinsik yolağın anahtarı, başlatıcı kaspazıdır. Kaspaz 9 aktivasyonundan sonra Kaspaz 3,6 ve 7 aktive olur (Şekil 8) (57).



Şekil 8.Dış ve iç apoptotik yolaklar (58).

İntrinsik yolak, apoptoz inhibitör proteinleri (IAP) tarafından kontrol edilir. X kromozomu bağlantılı üye, XIAP, Kaspaz 3 ve Kaspaz 7'ye doğrudan bağlanarak aktivitesini inhibe eden IAP ailesi üyesidir. XIAP aynı zamanda Kaspaz 9'u da inhibe eder; fakat monomerik Kaspaz 9'a doğrudan bağlanır ve aktif yeri hatalı konformasyon nedeni ile kilitler. NFκB apoptozun potansiyel inhibitörüdür ve bir transkripsiyon faktörüdür. IAP'lerin transkripsiyonunu indükler. NFκB protein kompleksi birçok hayvan hücresinde bulunan, stres koşullarına, sitokinlere, serbest radikallere, ultraviyole ışın dalgalarına, bakteriyel, ya da viral enfeksiyonlara karşı oluşturulan hücresel cevapta görev alır. Kısaca, NFκB bağışıklık sisteminde düzenleyici rolündedir. NFκB nin hatalı regülasyonu kanser, inflamasyon ve otoimmün hastalıklar, septik şoklar ve viral enfeksiyonlara neden olur. NFκB hızlı etkili "rapid-acting" primer transkripsiyon faktörleri kategorisinde hücresel cevapta etkilidir bu kategori içerisinde; c-Jun, STAT, nüklear hormon reseptörleri gibi faktörler vardır. Bu faktörler hücre içerisinde ihtiyaç duyulmadığı süreçlerde inaktif

formda bulunur, herhangi bir infeksiyon ya da kontrolsüz hücre çoğalması durumunda hızla cevap vererek bağışıklık sistemini korur.

I κ B, NF κ B dimerlerini ayırarak inhibisyonunu sağlayan inhibitördür. Hücre dışından gelen aktivasyon sinyali, I κ B kinazları (I κ K) etkileyerek, I κ B nin yıkımına neden olur, I κ B ubiquitinasyonlanarak proteozomlarda yıkılır. Bu olay, NF κ B nin nukleusa serbestlenmesini sağlayarak, DNA üzerinde IAP lerin transkripsiyonunu sağlayacak bölgeye bağlanmasını sağlar. Bunun sonucunda, immun cevap, hücre canlılığının artması ve hücresel proliferasyon gerçekleşir. Bunun yanında NF κ B tarafından sağlanan hücre proliferasyonunun da düzenlenmesi gerekir. Bunu sağlayan molekül I κ B α dır ve bir feed back mekanizması ile NF κ B nin serbestlenmesini durdurur (59).

Smac/DIABLO, mitokondriden serbestlenen bir diğer regülâtördür, IAP ler tarafından meydana getirilen inhibisyonu elimine eder. Smac/DIABLO, aktive olan Kaspaz 9 ile XIAP ye bağlanmak için rekabete girer. Her iki molekül de XIAP ye bağlanan benzer tetrapeptid domaini içerir. Böylece kaspaz aktivitesi kaspaz kaskadını oluşturmak üzere devam eder.

İntrinsik yolak üzerindeki tüm moleküller, yapılan kanser çalışmalarında apoptozu kanıtlayacak birer hedeftirler. Bu moleküllerin belirlenmesinde kullanılan yöntemler bir sonraki bölümde anlatılacaktır.

Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerini kodlayan genlerin ekspresyonu p53 proteini tarafından kontrol edilir. *Fas* reseptörü, *Bax* ve *Bak* pro-apoptotik proteinleri kodlayan genlere birer örnektir. Bcl 2, Bcl x_L ve IAP ler gibi anti-apoptotik faktörlerin ekspresyonunu baskılayabilir. PUMA proteini de p53 ün hedefidir ve p53 tarafından apoptozun indüklenmesi için esastır (60). Tümör baskılayıcı protein p53, genomun gardiyanıdır. DNA hasarı ve hücresel strese karşı apoptozu indükleyerek görev yapar. DNA ya hasar veren ilaçlar, radyasyon, onkogenik aktivasyon ve hücre stresi tarafından indüklenen apoptoz, *PUMA* geni knock out (susturulmuş) farelerde bloke olmuştur. Kolorektal kanser çalışmalarında, PUMA nın apoptozu indüklemesinin Bax varlığına bağlı olduğu gözlenmiştir. P53 tarafından DNA hasarına karşı oluşturulan hücresel cevap, apoptoz olabildiği gibi

hücre büyümesinin durması da olabilir. Hücre büyümesinin durması bir CDK inhibitörü olan *p21* in transkripsiyonel aktivasyonu ile gerçekleşebilir. *p21* in hasarlı olduğu hücreler apoptoza gider. PUMA proteini Bcl x_L ile etkileşim yaparak Bax multimerizasyonunu ve mitokondriye bağlı apoptozun gerçekleşmesini sağlar. Hücrenin, büyümesinin durmasını mı yoksa apoptozu mu tercih edeceği diğer sinyal yollarıyla belirlenir (61).

1.5 Apoptoz ve Kanser İlişkisi

Kanserin altı özelliğinden biri apoptozdan kaçmaktır. Tümör hücreleri örneğin DNA hasarına cevap olarak birçok sinyal üretir ve onkojenik aktivasyon meydana gelir ve bu da normal apoptozu uyarır. Tümör baskılama yolları aracılığı ile çoğu hücre apoptoz tarafından elimine edilen karsinojenik karakteristik özellik kazanır. Bununla birlikte mutasyona uğrayan tümör hücreleri apoptotik cevaptan kaçabilir, sonuçta sağkalım olur ve çoğalırlar. Apoptozdan kaçma mutasyonların birikimine yol açar. Bu da tümör hücreleri ve normal hücreler arasında gelişen farka dikkati çekmektedir. Tümör hücreleri, normal hücrelere kıyasla birçok apoptozu uyaran sinyal (örneğin oksidatif stres ve onkogen aktivasyonu) aldığı için, tümör hücreleri normal hücrelere oranla apoptotik cevabı tetiklemeye çok daha yatkındır. Bununla birlikte, apoptotik yol tümör hücrelerinde çoğu kez hatalıdır. Tümör hücrelerinde p53 ü hedef alarak apoptotik yolun onarımı, yeni kanser terapötiklerinin tasarımı açısından değerli bir stratejidir.

Veriler, kanser hücrelerinin stres karakteristikleri nedeni ile kanser hücreleri ve normal hücreler arasında, kaspaz aktivasyon durumunda esaslı farklar olduğunu göstermektedir. Kanser hücreleri, upregüle IAP ler tarafından inhibe edilen aktif kaspazları içerir, normal hücreler ise proteolitik kırılmaya gerek duyan inaktif prokaspazları içerir. Bu nedenle kanser hücreleri, normal hücrelere kıyasla apoptotik cevabı tetiklemeye daha yatkındır. Bu bulguyu desteklemek için tümör hücrelerinde işlenmiş Kaspaz 3 saptanmıştır. Normal hücrelerde aktive olan kaspazlar IAP ler tarafından inhibe edilir ve apoptozun indüksiyonu IAP inhibisyonundan kurtulmaya bağlıdır. Özetle, normal hücrelerde apoptotik sinyaller prokaspaz işlemini stimüle

eder, diğer taraftan kanser hücrelerinde apoptotik sinyaller IAP inhibisyonunun durdurmasını stimüle eder.

Karsinogenez sırasında apoptozun intrinsik yolundaki değişimler, ekstrinsik yoldaki değişimlerinden daha olağandır. İntrinsik yolda meydana gelen değişimlerin başlıcası p53 yolunu etkileyen mutasyonlardır. Bcl 2 ailesi genlerinin çoğundaki hatalı ekspresyonu da karsinogenezle ilgilidir. Bcl 2 ailesinin tüm anti-apoptotik üyeleri onkogen olarak işlev yapabilir ve pro-apoptotik üyeler de tümör baskılayıcı genler olarak etki eder. Pro-apoptotik proteinleri kodlayan genlerdeki, örneğin *Bak* ve *Bid*, mutasyonları bazı tümörler için karakteristiktir. Kolon tümörlerinin spesifik bir sınıfında *Bax* % 50 nin üzerinde mutasyona uğramıştır. Hatırlanacağı üzere, p53, birçok *Bcl 2* ailesi genlerini regüle eder. Bu durumda p53 deki mutasyonlar tümörlerde olağandır ve hedef genlerin transkripsiyonel regülasyonunu etkiler buna Bcl-2 ailesi genleri de dahildir (62).

1.6 Otofaji

Otofaji embriyonik gelişim, homeostaz ve hastalıklarda önemli bir katabolik süreçtir. Otofaji, hücre içi makromoleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozomla birleşerek burada parçalanmasına yol açan mekanizmadır. Hücre içerisinde uzun ömürlü ve kısa ömürlü proteinlerin parçalanma mekanizmaları değişmektedir; örneğin kısa ömürlü proteinler ubiquitin ile işaretlenerek parçalanırken, uzun ömürlü proteinler ve organeller lizozomlar tarafından otofaji mekanizması ile parçalanırlar, oluşan yapı taşları tekrar kullanılmak üzere hücre metabolizmasına katılır. Otofaji, kelime anlamı olarak kendi kendini (*auto*) yeme (*phagy*) anlamına gelir ve hücrenin açlıkla karşılaştığı fizyolojik koşullarda, besin elde etmek için hücre içindeki yapıları nasıl parçalandığını ifade etmek amacı ile kullanılmıştır. Yapılan ilk çalışmalarda otofajinin, besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak hücrenin stres ortamına uyumuna yardım ettiği böylelikle hücre homeostazisinin korunmasında etkili bir yol olduğu gösterilmiştir (63). Son on yılda yapılan çalışmalar ise otofajinin; metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenez, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında da etkili bir rol

oynadığını ortaya koymuştur (64,65). Ayrıca araştırmalar, otofaji anormalliklerinin, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli sağlık sorunlarının da nedenleri arasında yer aldığını göstermektedir (66).

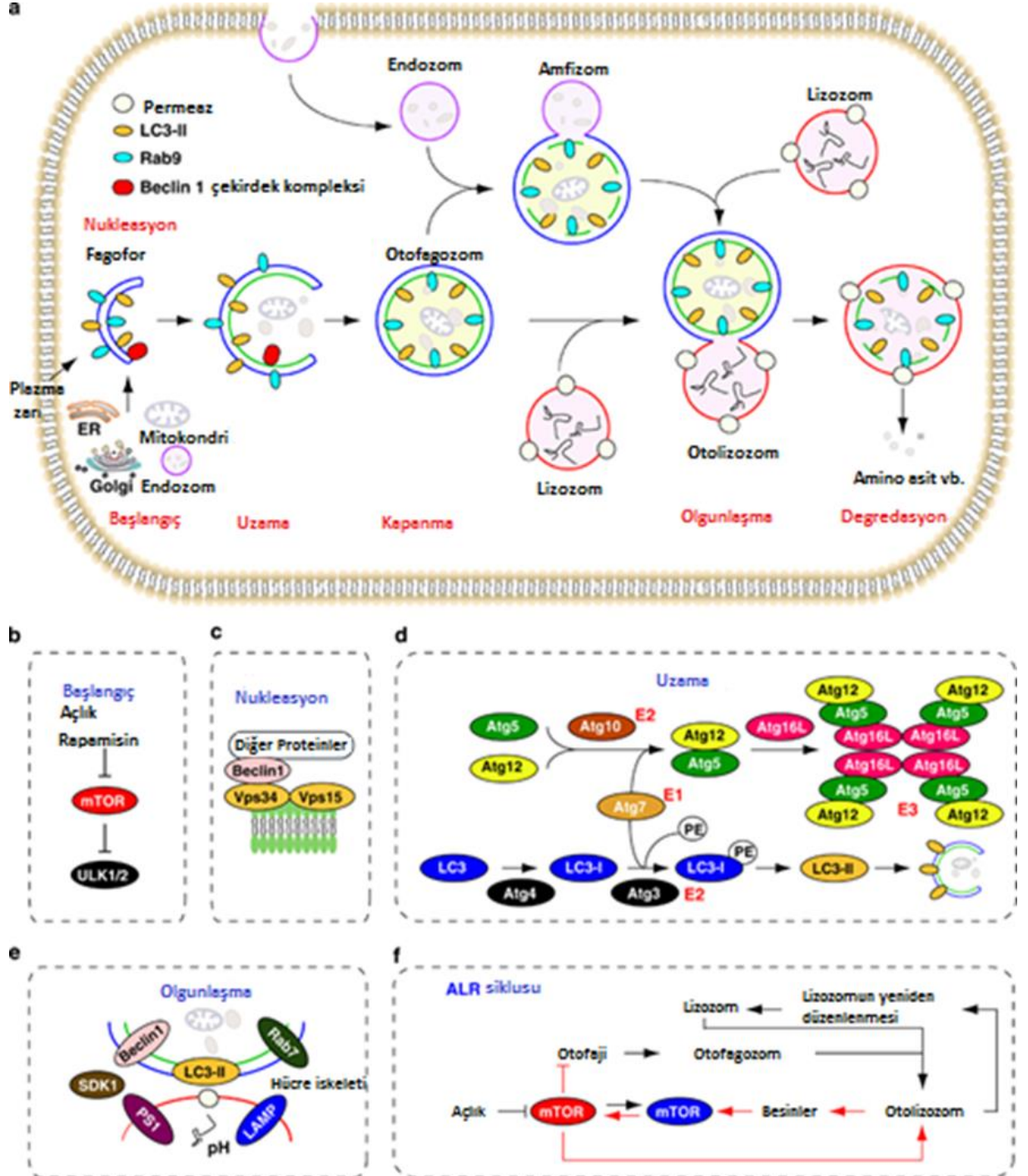
Otofaji 4 formda açıklanabilir; çift membranla sınırlı organellerin sitoplazma içinde parçalanması olan makrotofaji, membran invajinasyonu ile sitoplazmanın lizozom içine taşınması olan mikrotofaji, spesifik moleküllerin lizozom içine alınması olan şaperon bağımlı otofaji ve kanonik olmayan-alternatif (Atg5/7 bağımsız) makrotofaji (67).

Otofaji oluşum merkezleri yani otofagozom mekanizmasının yürütücü elamanları 'otofaji ile bağlantılı proteinler (Atg)' dir. Mayalarda yapılan çalışmalar sonucunda bir otofagozom biyogenezinde rol oynayan birçok çeşit Atg proteini bulunmuştur. Bunların görevleri, otofajik kesecikler oluşturmaktır. Otofagozom yapılarının ilk oluşumu sırasında, Atg5-12-16L ve Atg8 yolakları otofagozomdaki çift membran yapılarının oluşması için gereklidir. Ubikutin benzeri bir modifikasyon ile öncelikle Atg12, Atg5'e Atg7 ve Atg10 aracılığı ile kovalent bağ kurar, ikincil olarak Atg8, lipid, fosfatidil etanolamini (PE) modifiye eder ve Atg4'e degrade olur. Atg5-Atg12 kompleksinin otofagozomu başlatan Atg8 için gerekli Atg16L ile etkileşime girmesi gerekmektedir. Önemli olarak Atg8 proteinleri p62 ve NBR1 gibi ubikuitin bağlayıcı/ayırıcı proteinler için bağdaştırıcıdır, yanlış katlanmış protein agregasyonunu denetler, diğer ubikutinlenmiş yapıları düzeltir ve genişleyen otofagozom membranlarını ayırır (68,69).

1.6.1 Otofajinin Düzenlenmesi

Otofajinin indüklendiği durumlar, açlık, hipoksia ve çeşitli stres şartlarıdır. Bu durumlarda otofajinin aktivasyonu için TOR kompleksi devreye girmektedir. TOR kompleksi, hücrenin enerji metabolizmasının diğer bir deyişle protein sentezi ve hücre büyümesini kontrol eden anahtar proteindir. İlk olarak mayada mantara karşı kullanılmak üzere geliştirilen bir immun baskılayıcı ajan olan rapamisin'in hedef molekülü olarak saptanmıştır. Memelilerde izoformu bulunan TOR kompleksi mTOR olarak geçmektedir ve bu proteinin baskılanması ya da çeşitli gen

modifikasyonları ile *TOR* geninin susturulması otofajinin indüklenmesini sağlamaktadır.



Şekil 9. Otofajinin düzenlenmesi (70).

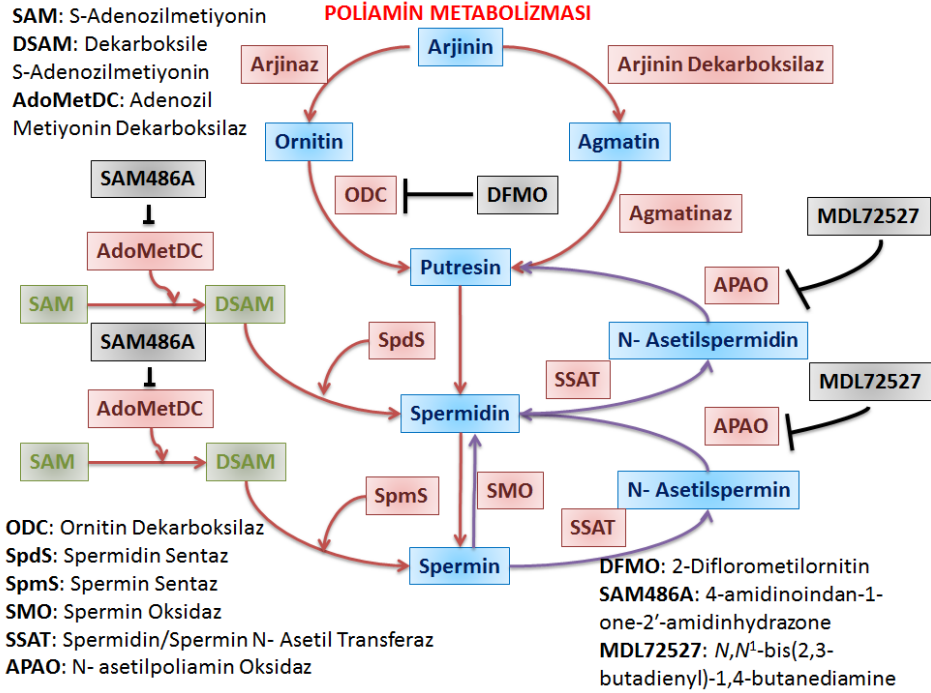
1.7 Hücre Ölümü ve Sağ Kalımı ile İlişkili Sinyal Yolakları

1.7.1.1 Poliaminler

Poliaminler; küçük alifatik polikasyonlardır. Putresin, $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, spermidin, $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, ve spermin, $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ doğal poliaminlerdir ve hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda hücre büyümesi için gereklidir Çünkü poliaminler nükleik asitler, özellikle RNA ve ATP, spesifik proteinler ve fosfolipitler ile etkileşim kurabilirler. Kanserli dokular, normal dokulara göre daha fazla poliamin miktarı içermektedir ve poliamin biyosentez inhibitörleri; tümör büyümesini ve metastazı inhibe etme potansiyeli vardır (71,72).

1.7.1.2 Hücrelerde Poliamin İçeriğinin Düzenlenmesi

Hücre poliamin içeriği biyosentez, degradasyon, alım ve atılım tarafından düzenlenmektedir (71). Putresin; ornitin dekarboksilaz (ODC) tarafından ornitinden sentezlenir. Dekarboksillenmiş S-adenozilmetiyonin; S-adenozilmetiyonin karboksilaz (SAMDC) enzimi tarafından S-adenozilmetiyoninden sentezlenir. Bu iki enzim, ODC ve SAMDC, poliamin biyosentezinde hız-sınırlayıcı enzimlerdir. Spermidin; putresinden ve spermin de spermidinden sentezlenir. Bu reaksiyonlar spermidin sentaz ve spermin sentaz enzimleri tarafından gerçekleşir. Bu olaylar ile poliamin biyosentezi gerçekleşir. Poliamin katabolizmasında ise spermin oksidaz (SMO) ile direkt olarak sperminden spermidin oluşabilir veya spermidin/spermin N^1 -asetiltransferaz (SSAT) ve asetilpoliamin oksidaz (APAO) ile hem sperminden spermidin hem de spermidinden putresin dönüşümü katalizlenebilir (Şekil 10).



Şekil 10 Poliamin metabolizmasının gösterilmesi. Kırmızı oklar poliamin biyosentezi, mor oklar ise poliamin katabolizması yolunu göstermektedir. Görevli enzimler bordo, inhibitörler ise siyah renkli yazılmıştır.

1.7.1.3 Poliaminler Tarafından Hücre Devrinin İlerlemesinin ve Apoptozun Düzenlenmesi

Poliamin seviyesinin azalması hücre devrinin ilerlemesini engellemektedir. Hücreler G_1/S fazında kalmaktadır. Poliamin eksikliği DNA sentezi oranı düşmektedir. Bu koşullar altında $p27^{Kip1}$ ve $p21^{Cip1/WAF1}$, sikline-bağımlı protein kinazlar CDK2 ve CDK4 inhibitörleri artmıştır. Poliamin eksikliği DNA Polimeraz- α , timidin kinaz, DNA ligaz I, Flap endonükleaz aktivitesinde azalmaya neden olmaktadır (73). Bu enzimlerdeki aktivitelerinin azlığının DNA sentezi inhibisyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (74).

Poliamin eksikliğin apptozu etkilediği yönünde bulgular anti-kanser ajanı olarak poliamin metabolizması ile ilişkili ajanların etkili olabileceği yönünden ümit vaatmektedir (75) ve DNA fragmentasyonu ile sonuçlandığı rapor edilmiştir (73). Poliamin eksikliğine bağlı olarak T hücre hibridomaları ve birçok kanser hücre hattında tümör nekroz faktör- indüklü apptoz (76-79) meme kanseri hücrelerinde

epidermal büyüme faktörü-indüklü apoptoza (80) neden olduğu görülmüştür. Bunun aksine Jurkat hücrelerinde interferon bağımsız antiviral cevap boyunca poliaminler tarafından apoptoz uyarılmıştır (81). Bu durumda interferon düzenleyici faktör 3 tarafından arginaz II aktivitesinin gelişmesi nedeniyle poliamin içeriği artmıştır. Böylelikle Jurkat T hücrelerinde poliaminlerin akümüasyonu hücre büyüme inhibisyonuna ve apoptoza neden olmuştur. Yapılan başka bir çalışmada, poliamin seviyesinin azalması kaspaz-3 aktivasyonunu indüklemiştir ve mitokondriyal membran potansiyelinin bozulmasına neden olmuştur. Bcl-x_L anti- apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi, aşırı ifadesi mitokondriyal membran potansiyelini, kaspaz aktivitesini ve hücre ölümünü inhibe etmiştir. Bu sonuçlar; intraselüler poliamin havuzlarının tükenmesinin mitokondri- aracılı apoptotik yolu kaspaz aktivasyonu aracılığıyla tetiklediğini ve Bcl-x_L'in poliaminler tarafından nasıl düzenlendiğini göstermektedir (82,83).

1.7.1.4 Poliamin Metabolizmasında Görevli Kritik Enzimler

Poliamin metabolizması enzimleri; çeşitli büyüme faktörleri, karsinojenler, virüsler ve onkogenler tarafından aktive olmaktadır.

- **Ornitin Dekarboksilaz, ODC**

Poliamin biyosentezinde, ornitinden putresin dönüşümünü katalizleyen ilk enzimdir. ODC; dimer halinde aktiftir ve monomerlerinin arayüzünde iki tane aktif bölge bulunmaktadır. ODC' nin aktivitesi için pridoksal 5'- fosfata (PLP) bağımlı olduğu bulunmuştur. ODC; ornitini dekarboksilleyerek putresine dönüşümünü sağlar. ODC aktivitesi ve poliamin konsantrasyonunun artması tümör artışı ve ilerleyişi ile ilişkilidir (84). ODC; hücre transformasyonu için esas olduğundan onkogen olarak da rol oynayabilmektedir (85) ve ODC aktivitesi; tümör büyüklüğünün ve agresifliğinin ölçümünde biyolojik markır olarak kullanılmaktadır. ODC' nin inhibe edilmesiyle meme, deri, kolon, prostat kanseri gibi kanser tiplerinde hücrelerinde proliferasyonun, koloni formasyonunun ve göçün inhibe edildiği gösterilmiştir (86). Dolayısı ile ODC ifadesindeki artış genel olarak bozulan homeostası ve karsinogenez ile ilişkili olarak gösterilmektedir.

- **Spermidin/Spermin-N1-Asetiltransferaz, SSAT**

Poliamin metabolizmasındaki önemli bir enzimdir (87). Spermin ve spermidinin aminopropil uçlarına asetil grupları ekler, bu asetilasyon poliaminlerin yükünü azaltır. Bunu asidik makromoleküllere bağlanmak ve onların fonksiyonlarını etkilemek için gerçekleştirir ve bu asetile olmuş ürün türevleri asetilpoliamin oksidaz (APAO) için iyi bir substrattır (87,88). SSAT seviyesi; poliaminler tarafından düzenlenebilmekte ve ekspresyonu sağlanabilmektedir. SSAT; poliamin homeostazisini korumada, normal ve neoplastik büyüme gibi hücrel işlemlerin etkilenmesinde anahtar role sahiptir. Ayrıca yakın zamanda SSAT' nin obesite/glukoz toleransı, integrin fonksiyonu, stres cevabı ve oksijen homeostazisinde rolü olduğu gösterilmiştir (89).

- **Asetilpoliamin Oksidaz, APAO**

APAO; FAD-bağımlı amin oksidazdır ve N¹- asetile olmuş poliaminleri okside eder. Bunun sonucunda spermidin veya putresin meydana gelir. APAO aktivitesi; SSAT tarafından asetile edilmiş poliamin substratları tarafından sınırlandırılmaktadır. İnsan meme kanseri hücrelerinde yüksek miktarda APAO ekspresyonu olduğu gösterilmiştir (90).

- **Spermin Oksidaz, SMO**

Spermini okside ederek direk spermidin oluşmasını sağlar. Ayrıca yan ürün olarak reaktif oksijen türü olan hidrojen peroksit (H₂O₂) ve 3-aminopropanal oluşturur. SMO; anti-tümör poliamin analogları da dahil pekçok uyarıcı tarafından ekspresyonu kolaylıkla tetiklenebilir (87,91).

- **S-Adenozilmetiyonin Dekarboksilaz, AdoMetDC**

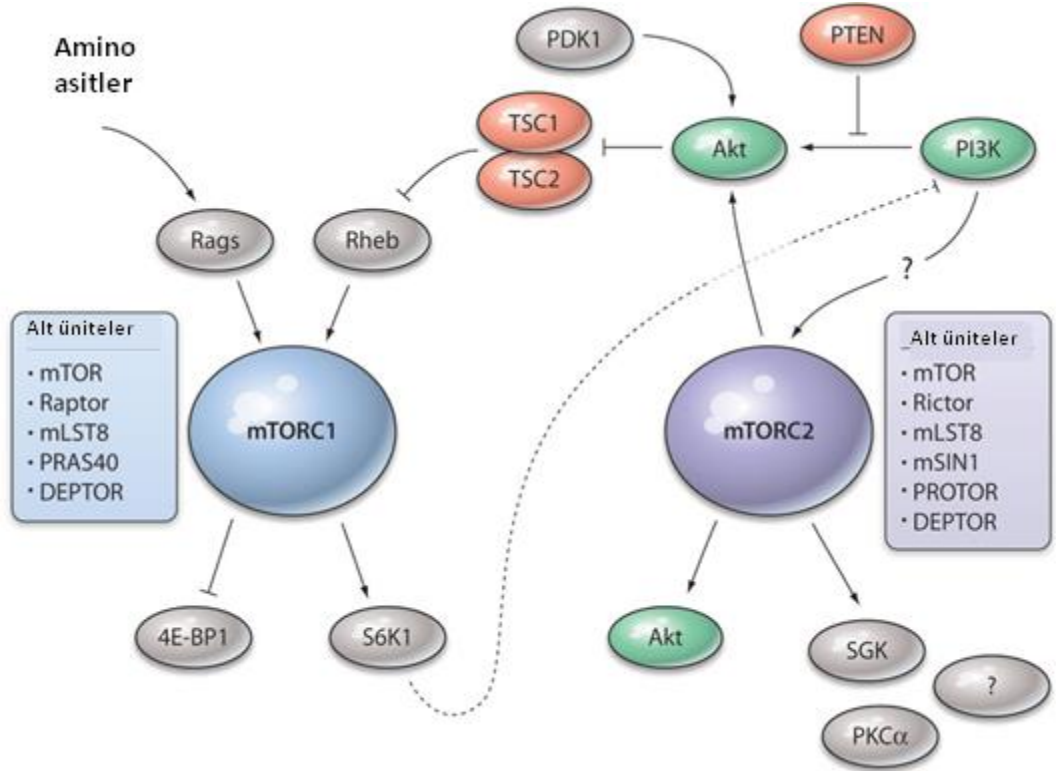
S-Adenozilmetiyoninin dekarboksilasyonu; AdoMetDC tarafından gerçekleştirilir, spermidin ve spermin oluşumunu sağlar (92).

1.7.2 mTOR Sinyal Yolu

TOR bir serin/treonin protein kinaz olup hücre büyümesi, hücre döngüsünün, devamlılığı, besinlerin hücre içine alınımı, protein sentezi ve otofajiyi düzenler (93). Antifungal bir ajan olan rapamisin substratı olan TOR'un memeli hücrelerinde

analoğu mTOR'dur (94). mTOR, mTORC1 ve mTORC2 olmak üzere iki ayrı kompleksten oluşur.

Besinin ortamda az bulunması ile otofaji indüklenirken, besinin bol bulunduğu ortamda TOR proteini Atg13 ü fosforile ederek otofajiyi baskılamaktadır. Açlık durumlarında ise TOR proteinin inaktivasyonu ile Atg13 defosforile hale gelir ve bir serin treonin kinaz olan Atg1'e bağlanır. Atg1 aktivasyonu doğrudan otofajini indüklenmesi ile ilgilidir. Memelilerde bu kompleksin karşılığı ULK:Atg13: FIP200 (200 kDa fokal adezyon kinaz ailesi ile etkileşen protein) proteinleridir. Çok yakın zamanda ULK1 ve ULK2 proteinlerinin mTOR kinaz ve AMPK (Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz) ile direkt etkileşerek ve memelilerde otofajinin başlamasına eşlik ettiği gösterilmiştir (95). Bu durumun aksine Tor yolağında yer alan proteinlerden ribozomal S6 proteinin hedefi olan S6K proteinin fosforilasyonu ise otofajinin baskılanmasının bir işaretidir (96).



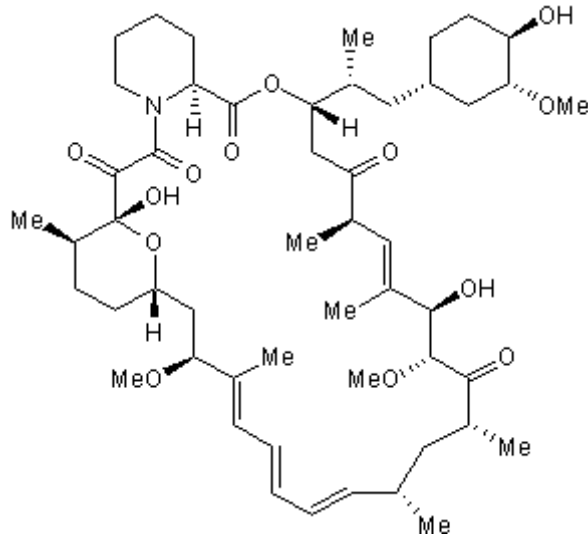
Şekil 11. mTOR sinyal yolağı (97).

1.7.3 Rapamisin

Rapamisin, diğer adıyla sirolimus, 1975 yılında Paskalya adasında bulunan toprak numunesinden elde edilen *Streptomyces hygroscopicus* adlı bakteri ailesinden izole edilmiş bir peptittir. Kimyasal formülü $C_{51}H_{79}NO_{13}$ 'dür. Orjinalinde antifungal

rolü olan rapamisin, daha çok organ transplantasyonlarında T ve B lenfositlerinin interlökin 2 (IL-2) 'e karşı oluşturdukları cevabı engelleyerek immün baskılayıcı olarak görev yapmaktadır. Rapamisin ve analogları hücre döngüsü progresyonunda G1 fazında G1'den S fazına kadar olan sinyal iletim yollarını düzenleyerek hücre proliferasyonunu engeller.

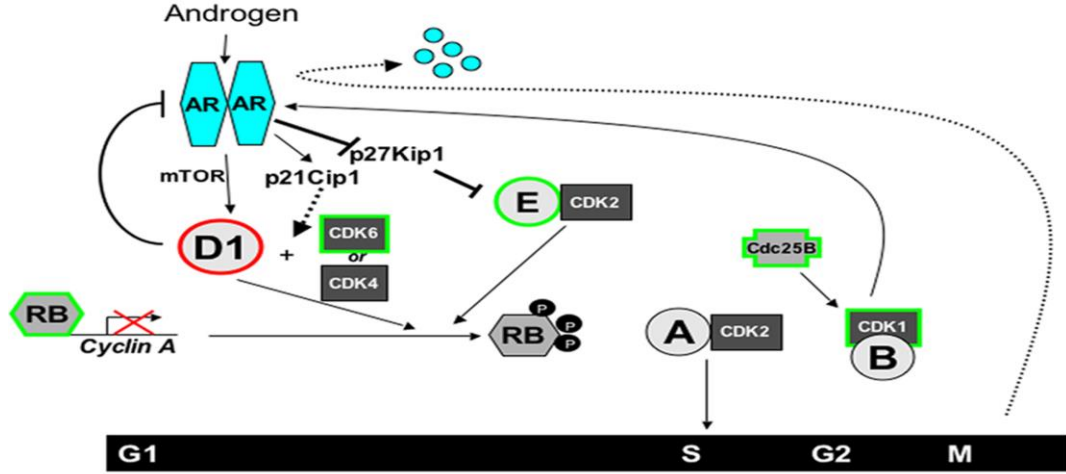
Rapamisinin hem *in vitro* hem de *in vivo* da kanser hücrelerinin geniş oranda proliferasyonlarını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu ajanın günümüzde antikanser tedavilerin klinik gelişiminde kullanıldığı bilinmektedir. İnsan kanser hücrelerindeki öncü klinik çalışmalar, rapamisinin prostat, küçük hücreli akciğer, glioblastoma, T hücreli lösemi, renal hücre ve meme kanserleri tedavisinde etkili olabileceğini göstermiştir. Rapamisin FKBP 12 adlı immunofilin ailesinden FK 506 bağlayıcı proteinlerden birine bağlanarak serin/treonin kinaz yolağının inhibisyonu ile antiproliferatif etkiler sergilemektedir.



Şekil 12. Rapamisinin kimyasal yapısı.

Kanser olgularında hücre döngüsünün baskılanması önemli bir stratejik terapi modelidir. Birçok faktör tarafından etkilenen hücre döngüsünde AR'nin kontrol ettiği hücre proliferasyon mekanizmaları G1-S faz ilerlemesinin esas düzenleyicisi olarak rol oynar, G1 siklin bağımlı kinaz (CDK) aktivitesini yöneten sinyalleri uyarır, retinoblastoma tümör supressor (RB) fosforilasyon ve inaktivasyonunu uyarır ve dolayısıyla androjen bağımlı proliferasyonu yönetir. Hücre devri mekanizmasının birkaç bileşenleri hücre devri boyunca AR aktivitesini düzenler. Böylece AR ve

hücre devri yolları arasındaki karşılıklı etkileşim androjene karşı mitojenik cevabı düzenler. Androjen G1-S geçişinin kritik bir düzenleyicisidir. Bu aşamada aktif AR, mTOR yoluyla Siklin D1'in birikimini uyarır, CDK4' ü uyarır ve retinoblastoma (RB) tümör baskılayıcının fosforilasyonunu yönetir.

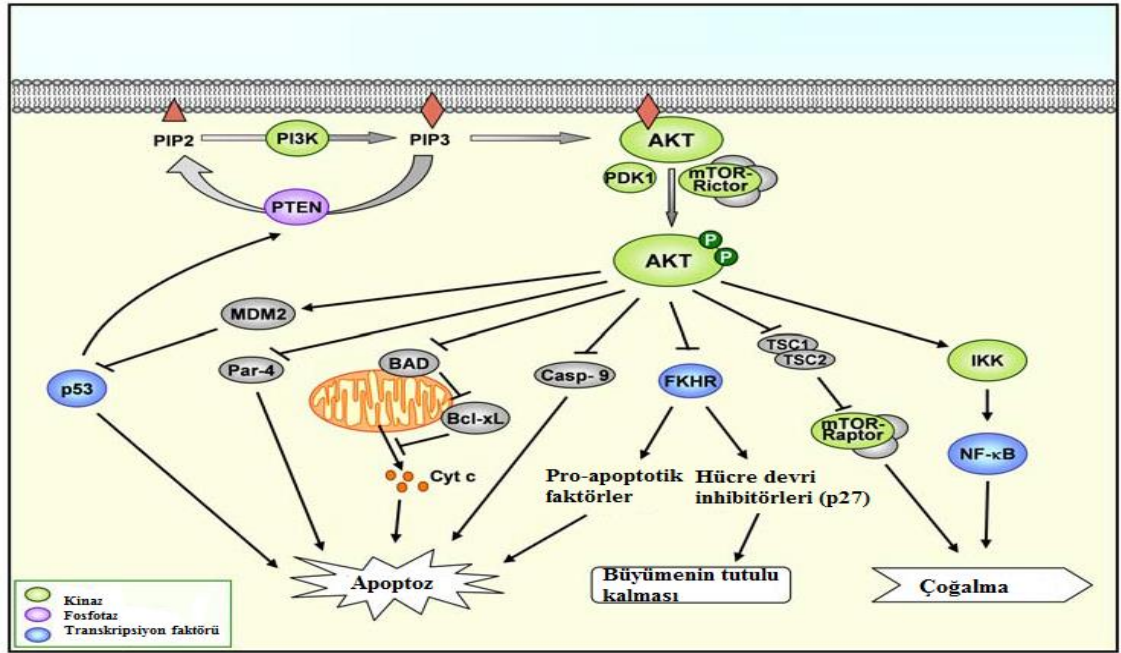


Şekil 13. Prostat kanser hücrelerinde AR bağımlı hücre devri ilerlemesi gösterilmiştir. Aktif AR mTOR yoluyla Siklin D1'in birikimini uyarır, CDK4'ü uyarır ve retinoblastoma (RB) tümör baskılayıcının fosforilasyonunu yönetir. AR ile uyarılmış p21Cip1 ekspresyonu ve p27Kip1 degradasyonu RB'nin siklinD1/CDK4 ve cycE/CDK2 bağımlı inaktivasyonu artırır ve siklin A (CycA) gibi E2F hedef genlerin ekspresyonuna izin verir. Siklin A G1-S faz geçişini harekete geçirmek için CDK2 'yi aktive eder. Daha sonra hücre devri mekanizmasının bileşenleri androjen cevabını düzenler. Yükseltilmiş siklin D1 AR aktivitesini azaltmak için negatif feedback döngüsü gibi davranır, böylece androjen aktivitesini ayarlar. G2 fazında, CDK1 AR'nin aktivasyonunu ve fosforilasyonunu yönetir. Fakat AR M fazında indirgenir ve DNA replikasyonu için bir 'lisans faktör' olması amaçlanır. AR fonksiyonunun baskılayan bileşenler kırmızıyla gösterilmiştir. AR aktivitesinin pozitif efektörleri ise yeşille gösterilmiştir (98).

1.7.4 PI3K/Akt Sinyal yolağı

PI3K/AKT sinyal iletim yolağı, hücre çoğalmasını uarması ve apoptozu engellemesinden dolayı onkogenik transformasyonda önemli bir role sahiptir (99). Bu yolağın farklı komponentleri insan kanserlerinin büyük kısmında düzenlenmesinin azaldığı bulunmuştur. AKT serin/treonin kinaz ailesi son derece korunmuş üç üyeye sahiptir: AKT1, AKT2 ve AKT3. AKT nin aktivasyonu

membrana proteininin bağlanması ve iki farklı bölgede fosforilasyonunu sağlar. Bu işlemde, iki farklı kinaz vardır: PDK1 ve mTOR-Rictor kompleksi (100). Tamamen aktif halde olan AKT plazma mebranından ayrılır ve sitoplazma ve nukleusta yer alan substratları hedef alır. AKT yolağının bileşenleri Şekil 11 de özetlenmiştir. Aktif haldeki Akt de TOR'u aktive ederek otofajiyi bloke etmektedir. Bir tümör baskılayıcı protein olan PTEN ise PI3K/Akt yolağı ile ters yönde çalışarak otofajinin artırılmasında görev yapmaktadır. Nitekim PTEN molekülünde meydana gelen mutasyonların otofajiyi baskıladığı gösterilmiştir (101).



Şekil 14. PI3K/AKT yolağı. Fosfotidilinositol fosfatın fosforilasyonu fosfotidilinositol 3-kinaz tarafından gerçekleştirilir ve iki kinaz PDK1 ve mTOR-Rictor kompleksi AKT aktivasyonu ve fosforilasyonu sonucunda oluşur. (102)

1.7.5 Otofaji ve Apoptotik Yolak Arasındaki Önemli Oyuncular: Bcl-2 ve Bcl-x_L

Otofaji ve apoptoz arasındaki ilişki üç farklı durumda özetlenebilir. Otofaji apoptozun baskılandığı durumlarda, hücrelerin ölümüne neden olabilirken, apoptozu baskılayarak hücrenin hayatta kalmasını sağlayabilir. Bir diğer durum ise, apoptoz için ön koşul olabilmesidir.

Birer anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ve Bcl-x_L apoptozu inhibe edebildiği gibi otofajiyi de otofagozom yapılarının oluşumunda görev alan proteinler ile bağlantı kurarak inhibe edebilmektedir. Otofagozum yapılarını oluşumunda önemli görevi olan Vps34 PI3K aktivasyonu, Atg6/Beclin tarafından kontrol edilir. Bcl-2 ve Bcl-x_L, Beclin proteininin BH3 bölgesine bağlanır ve böylece otofajiyi inhibe eder (103). Bcl-x_L, JNK tarafından fosforile edildiğinde inaktif forma geçer ve Beclin'e bağlanması engellenir, otofaji aktif formda kalır. Beclin yanında, Vps34 düzenleyici proteinlerden biri olan Bif-1 de hücre ölümü ile ilişkilidir. Bif-1, otofaji yanında, Bax/Bak aktivasyonu ile apoptozu da düzenlemektedir.

1.8 Amaç

Bu çalışmanın amacı, mTOR sinyal yolağının indirgendiği durumlarda, CDK inhibitörleri roskovitin ve purvalanol'un terapötik etkilerinin androjene bağımlı LNCaP ve androjenden bağımsız DU 145 ve PC3 prostat kanseri hücre hatlarında hücre sağkalım ve ölüm ile ilişkili olarak sinyal yollarının irdelenmesidir. Bu amaçla tez çalışması kapsamında, otofaji ve apoptoz ile ilişkili anahtar moleküller ve mTOR sinyal yolağı ile ilişkili hücre sağ kalım mekanizmasında yer alan anahtar oyuncuların ifade düzeyleri 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 prostat kanseri hücre hattıdır. PC3 (ATCC CRL 1435) hücre hattı gibi androjene duyarsızdır. PC3 hücreleri p53 ve AR ifadesinden yoksundur.

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, siRNA ve Plazmidler

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

2.2 YÖNTEMLER

2.2.1 Hücre Kültürü

LNCaP (ATCC CRL 1740), DU 145 (ATCC HTB 81) ve PC3 (ATCC CRL 1435) prostat kanseri hücreleri önerilen besiyerlerinde % 5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik etüvde RPMI1640 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 gerçekleştirildi.

2.2.2 Hücre Canlılığının Belirlenmesi (MTT testi)

3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür ile (MTT ayıracı), canlı hücrelerde mor renkli formazon tuzu oluşturması sonucu kolorimetrik yöntemle hücre canlılığı belirlenmiştir. 1×10^4 hücre/kuyu 96 kuyucuklu petri kaplarında ekildikten sonra gece boyunca yapışmaları beklenir. Hücreler 10 nM rapamisin varlığında veya yoksunluğunda, roscovitin/purvalanol (0-50 μ M) ile 24 saat boyunca muamele edildikten sonra, MTT tetrazolium tuzu (10 μ l) ile 4 saat bekletilen örneklerde oluşan kesilmiş formazan bileşikler canlı hücrelerin hücre yüzeyinde birikir. Daha sonra MTT ayıracı eklenmiş besiyeri hücrelerden çekilmiş ve her kuyucuğa 100 μ l DMSO eklenmiştir. Örnekler karanlıkta 5 dakika boyunca bekletildikten sonra mikropilaka okuyucuda, ikili dalga boyunda 570 nm ve 655 nm' de absorbans ölçümü yapılmıştır (104).

Etkin doz için hücre canlılığını indirgeyici doz izobologram eğrisi aracılığı ile mTOR inhibitörü varlığında sinerjistik, antagonistik veya arttırıcı (additive) doz olarak sunulmuştur.

2.2.3 Kombinasyon Denemeleri için Veri Analizi

CDK inhibitörleri ve rapamycin için kombinasyon dozu izobolografik analiz ile gerçekleştirilecektir. Bu amaçla toksisite değerleri için kombinasyon indeks değeri (CI) değeri Ichite ve ark. tarafından önerilen yöntem ile hesaplanacaktır (105). Eğer CI değeri 1,3 ten büyük ise antagonistik, CI 1,1-1,3 arasında ise ılımlı

antagonizm, CI 0,9 ile 1,1 arasında ise additive etki, CI 0,8 ile 0,9 arasında ise az sinerji, CI 0,6 ile 0,8 arasında ise orta sinerji, CI 0,4 ile 0,6 arasında ise sinerji ve 0,2 ve 0,4 arasındaki değerler kuvvetli sinerjistik etki olarak ifade edilecektir.

2.2.4 Hücre Sağkalımı

Prostat kanseri hücreleri her bir kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde 12 kuyucuklu petrilere ekildi. İlaç uygulamalarını takiben belirlenen bu zaman dilimlerine göre her 24 saatte bir olacak şekilde hücrelerin sayımı iki tekrarlı şekilde gerçekleştirildi. Bu amaçla önce örnekler PBS ile yıkanır ve tripsin ile kaldırılır. Santrifüj edilen hücrelerin üzerine 50 µl 0.4 % (w/v) Tripan Mavisi eklenir ve bu karışımdan 10 µl çekilerek Neubauer hemositometresinde sayıldı.

2.2.5 Protein İfadesinin Belirlenmesi

2.2.5.1 Protein İzolasyonu

Toplam protein izolasyonu için 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekildi. İlaç uygulamasını takiben hücreler kazıyıcılar ve 1X PBS yardımıyla petri yüzeyinden kaldırılır. Soğuk santrifüjleme işlemiyle hücre pelleti elde edilir. Toplam protein içeriği eldesi için hücre özütleme tamponu (Ek D) içerisine alınan hücreler 15 dakika oda ısısında çalkalayıcıda inkübe edilir. 20 dakika 13200 rpm'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüjlenen örneklerin üst sıvısı yeni bir tüpe alınarak -80°C 'de saklandı.

2.2.5.2 Bradford Yöntemiyle Protein Miktar Tayini

Protein miktar analizi Bradford yöntemi kullanılır (Bio-Rad). Burada proteinler Coomassie brilliant blue G-250 ye bağlanır ve tayini bu sayede yapılır. 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 örneklerde 1 µl olacak şekilde kuyucuklara eklenir ve üzerlerine 200 µl Bradford solüsyonu eklenip karanlıkta 5 dakika beklendikten sonra 595 nm de ölçüm yapılır.

2.2.5.3 SDS-PAGE Jel Hazırlanması

SDS-Page (sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektroforez) proteinlerin moleküler büyüklüğünü analiz etmek için kullanılmaktadır. Poliakrilamid jellerle yapılan elektroforez, örnekteki bileşenlerin daha iyi ayrışmalarına yol açar çünkü ayrışım hem moleküler ayırım hem de elektroforetik harekete dayanır.

2.2.5.4 Protein Örneklerin Hazırlanması

Immunoblotlama yöntemi için her bir örnekten alınan protein miktarı Bradford sonuçlarına göre standart eğriye göre protein örnekleriyükleme tamponu ile 1:5 oranında karıştırılarak 95°C' de 5 dakika tutuldu ve buza alındı.

2.2.5.5 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) yürütüldü. Jel üzerinde olan protein örnekleri PVDF membrana transferedildikten sonra (% 15 Metanol içeren 1X Transfer Tamponu), yağsız süt tozu ile 2 saat oda sıcaklığında çalkalandı. (100 ml %0,001 Tween-20 içeren Tris Tuz Solüsyonu için 5g süt tozu).

2.2.5.6 Immunoblotlama İçin Birincil ve İkincil Antikorların Girilmesi ve Sonucun Filme Fiksasyon İşlemi

Uygun birincil antikorla (1:1000; antikor: % 5 süt solüsyonu) gece boyu +4°C inkübe edildi. 15'er dakikalık üç kez TBS- T ile yıkama sonrasında uygun ikincil antikorla (1:5000; antikor: % 5 süt solüsyonu) gece boyu +4°C inkübe edildi. Daha sonra uygulamaların ardından 15'er dakikalık TBS-T ile iki kez yıkama ve 15 dakikalık TBS ile yıkama sonrasında örnekler oda sıcaklığına getirilmiş

kemiluminesans madde ile 1 dakika boyunca muamele edildiler. Daha sonra streç filme sarılan membranlar, ışık geçirmez kasetlerde film üretmek üzere karanlık odaya götürüldü. Geliştirici ve sabitleyici film çözeltileri ile istenilen görüntü elde edilinceye kadar yıkanarak, en son aşamada filmler soğuk suda yıkanarak kurumaya bırakıldılar. Sonuçlar β -aktin yükleme kontrolü ile karşılaştırılarak tartışıldı.

2.2.6 Apoptotik hücre ölümünün belirlenmesine yönelik yöntemler

2.2.6.1 Floresan Problar Aracılığı ile Hücre Ölümünün Belirlenmesi

• Propidyum Iodür (PI)

Hücrelere ilaç uygulanmasından 24 saat sonra hücreler 5mg/ml PI ile 37⁰C de 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra invert floresan mikroskobunda Ex:536 nm/Em: 617 nm olacak şekilde inceleme yapılmıştır.

• DiOC₆

Hücrelere ilaç uygulanmasından 24 saat sonra hücreler 4 nM DiOC₆ ile 37⁰C de 15 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra invert floresan mikroskobunda Ex: 488 nm/Em: 535 nm olacak şekilde inceleme yapılmıştır.

• DAPI

Hücrelere ilaç uygulanmasından 24 saat sonra hücreler 5mg/ml DAPI ile 37⁰C de 10dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra invert floresan mikroskobunda Ex: 350 nm/ Em: 570 nm olacak şekilde inceleme yapılmıştır.

• MitoTracker

Hücrelere ilaç uygulanmasından 24 saat sonra hücreler 100 nM Mito Tracker Red ile 37⁰C de 5dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra invert floresan mikroskobunda Ex: 579 nm/ Em: 599 nm olacak şekilde inceleme yapılmıştır.

2.2.6.2 DNA Fragmentlerinin Belirlenmesi

Hücrelerde CDK inhibitörleri için seçilen etken dozun apoptotik parametrelere olan etkisinin gösterilebilmesi amacı ile, sitoplazmik histona bağlı DNA parçacıklarının kantitatif belirlenmesi hedeflenmektedir. 1×10^4 hücre/kuyu 96 gözlü petri kabına ekildikten sonra, uygun zaman ve konsantrasyonda roscovitin/purvalanol uygulanacaktır. Hücreler bir kere 1X PBS ile yıkandıktan sonra steril pipet ucu ile özütleme tamponunda özütlenir. Elde edilen örnekler biotin ile işaretlenmiş anti-histon antikoru ile bekletileceklerdir. Peroksidaz işaretli Anti-DNA antikoruca tanınan biotin ile işaretlenmiş örnekler substrat varlığında spektrofotometrik olarak taranacaktır (Abs 405-480).

2.2.6.3 CDK İnhibitörlerinin Kaspaz Yolağı Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Roskovitin/Purvalanol için seçilen dozlar ile belirlenen zamanlarda tetiklenen apoptotik yolağın kaspaza bağımlı olup olmadığı, pan-kaspaz inhibitörü, (z-VAD-FMK), kaspaz-3 inhibitörü, (z-DEVD-FMK), kaspaz-9 inhibitörü, (z-LEHD-FMK), kaspaz-8 inhibitörü, (z-IETD-FMK) ile 1 saat öncesinde hücrelerin herbiri 20 μ M olmak üzere uygulama yapılması sonucunda elde edilen MTT hücre canlılığı testine göre belirlenecektir. Kontrol hücrelere negatif kaspaz kontrolü (z-FA-FMK) eklenerek sonuçlar elde edilecektir. Böylece CDK inhibitörleri tarafından tetiklenen apoptoz mekanizmasının mTOR ve poliamin biyosentezi özgül inhibitörleri varlığında kaspaz yolağı ile ilişkisi irdelenecektir. Aynı zamanda, hücrelerden elde edilen total protein özütlerinde kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz 9 antikorları ile immunoblotlama yapılacaktır.

2.2.7 Poliamin Düzeylerinin Belirlenmesi

HPLC ile hücrelerde poliamin içeriklerinin belirlenmesi: Roskovitin/Purvalanol uygulaması ve/veya inhibitor (rapamisin ve DFMO) uygulamasına bağlı olarak, prostat kanseri hücrelerinde hücre poliamin içeriği ve asetile-poliamin ürünlerinin miktarı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak belirlenecektir. Bu nedenle uygulama sonrasında poliamin içeriği benzoil klorür (Sigma-Aldrich 240540) yöntemi ile poliamin standartları kullanılarak

(Put, Spd, Spm) poliamin analizi yapılacaktır. İç standart olarak, 1,-7, diaminoheptan (Fluka) belirlenecektir.

2.2.8 Otofajinin İrdelenmesi ile İlgili Yöntemler

2.2.8.1 Otofajik Vakuollerin Monodansilkadaverin (*monodansylcadaverine*, MDC) ile İşaretlenmesi

Hücreler CDK inhibitörleri ve diğer inhibitor maddeler uygulaması sonrasında 0,05mM MDC (PBS içerisinde) ile 10 dakika 37°C de bekletilir (Biederbick et al., 1995). Otofajik vakuollerini MDC ile işaretleyebilmek için hücreler lamel üzerinde büyütüldükten sonra otofajik sürece tabi tutulurlar. Lameller dört kez 1 x PBS yıkamasını takiben ters bakışlı floresan mikroskopta vakuoller CCD kamera ile incelenir.

2.2.8.2 LysoTracker® Red DND-99 ile Asidik Organellerin Belirlenmesi

Bir saat boyunca 0,1 nitrik asit içerisinde bekletilen ve ardından %100 etanole maruz bırakılarak steril edilen ve 6 kuyucuklu petrilere yerleştirilen lamellerin herbirinde, 5×10^5 DU 145 ve LNCap prostat kanseri hücreleri olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Yapışan hücreler 2, 4 ve 8 saat boyunca, 10 μ M rapamisin ile muamele edilmiştir. Her bir lamele 1 μ M LysoTracker® Red DND-99 boyası eklenerek, 30 dakika etüvde inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Hücreler 1X PBS ile yıkandıktan sonra lameller lam üzerine konulmuş ve floresan mikroskobu ile görüntü elde edilmiştir.

2.2.8.3 GFP-LC3 Plazmit Eldesi ve Hücre Lokalizasyonunun Analizi

• Kompetent Hücre Hazırlanması

E. coli kompetent hücresi (HB101) -80°C den çıkartılıp buza alındıktan sonra 5 ml LB besi yerinde 37°C de gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün 100 ml LB besi yeri üzerine eklenip orbital çalkalayıcıda 37°C de inkübasyona devam edildi. Bakteri yoğunluğu spektrofometre yardımıyla OD (Optik Densite) 600nm de ölçüldü ve ölçüm değeri 0,6 yi aştığı anda 50 ml steril tüpe alınarak 10 dakika buzda bekletildi.

Daha sonra hücreler +4°C de 3200 rpm de 7 dakika santrifüj edildi. Daha sonra peletlerin üzerine 10 ml soğuk CaCl₂ eklendi ve 5 dakika 3200 rpm de santrifüj edildi. Aynı işlemi tekrarlanarak santrifüj yapmadan örnekler 30 dakika buzda beklemeye bırakıldı. Daha sonra santrifüjlenen hücrelerin üzerine CaCl₂ eklenerek -80°C kaldırıldı.

• Transformasyon

Komponent hale gelmiş hücreler çıkarılıp eritildi ve saflaştırılmış plazmit ile karıştırılarak 30 dakika buzda inkübe edildi. Daha sonra tüp 42°C de 45 saniye tutulup tekrar geri buza 2 dakikalığına alınır. Üzerine 80 µl SOC medya eklenip 1 saat 37°C de orbital çalkalayıcıda inkübe edilir. Daha sonra kültürden seçici (Ampicilin eklenmiş) LB agar petrilere aktarılır ve gece boyu 37°C de inkübe edilir.

• Plazmid izolasyonu ve Miktar Tayini

LB agardan seçilen tek bir koloni daha sonra giderek büyütülen hacimlerde sıvı kültürlerle alınır. Sıvı kültürler uygun yoğunluğa erişince santrifüjle pelletler çöktürülür ve QIAGENPlazmid Mini Kit yardımı ile uygun protokol izlenerek plazmid elde edilir. Daha sonra elde edilen plazmidin kantifikasyonu spektrofotometrede ölçülür. 260/280 oranına bakılarak Plazmidin saflığı belirlenir ve konsntrasyonu; $Kons=260 \text{ nm absorbans} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 50$ formülüyle hesaplanır.

• Transfeksiyon

İlk adım olarak hücreler 6 kuyucuklu petri kaplarında cam lameller üzerine 5×10^4 olacak şekilde ekildi. Daha sonra hücreler % 80 yoğunluğa ulaşınca ekim yapılmak üzere 100 µl toplam hacim olmak üzere 1 µg/kuyu GFP-LC3 plazmid, 3 µl Eugene HD ve kalan hacim kadar besiyeri eklenerek ile bir kokteyl hazırlanarak 15 dakika boyunca bekletildi. Daha sonra bu karışım hücrelere 1ml tam besiyeri ile birlikte verilir. Örnekler 48 saat boyunca LC-3-GFP plazmidi ile muamele edildikten sonra önerilen ilaçlar (CDK inhibitörleri, rapamisin varlığında ve yoksunluğunda) 24 saat boyunca uygulandı.

2.2.9 siRNA Yöntemi ile Gen Sessizleştirilmesi

2.2.10 Hücrelerin Hazırlanması

2×10^4 LNCaP, DU 145 ve PC3 hücresi 6 kuyucuklu petri kaplarına ekilerek bir gece petri kabına yapışmaları beklendikten sonra hücelere Beclin siRNA ve LC3 siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Beclin siRNA ve LC3 siRNA uygulaması 48 saat gerçekleştirildikten sonra 24 saat ilaç uygulamasını takiben hücre canlılığı üzerine etkileri MTT hücre canlılığı analizi ile incelendi.

2.2.11 siRNA Transfeksiyonu

30 nM LC3 ve Beclin 1 siRNA, 1:6 oranda transfeksiyon ajanı ile uygulanmıştır. LC3 ve Beclin siRNA FBS içermeyen besiyeri içerisinde belirtilen oranda hazırlanıp, 15-20 dakika oda sıcaklığında bekletilmesinin ardından, hücrelerin üzerinde bulunan besiyeri üzerine damla damla eklenip, petri kabı halkasal hareketlerle nazikçe çalkalanır. LC3 ve Beclin siRNA 48 saat boyunca uygulanmıştır. Bu süre sonunda siRNA içeren besiyeri atılıp, yukarıda belirtilen oranlarda ilaç içeren besiyeri eklenir.

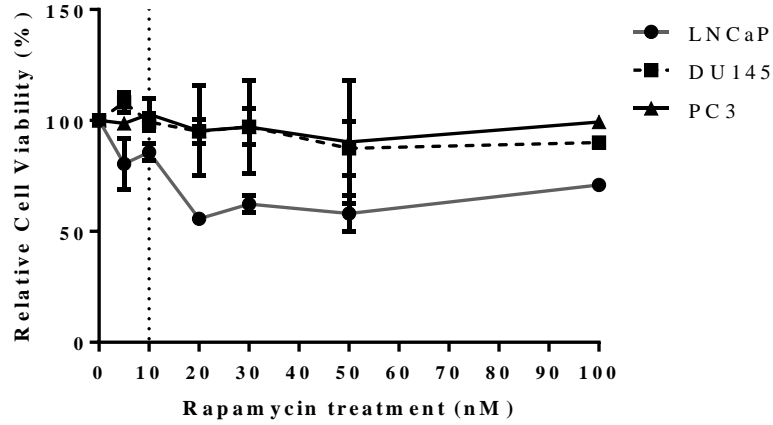
2.2.12 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizlerin yapılabilmesi amacıyla elde edilen veriler Graph Pad programı aracılığı ile t-testi, çoklu veri analizi ANOVA ile değerlendirildi. Ayrıca immunoblotlama sonuçları Image J programı ile yükleme kontrolü örneklerine göre değerlendirildi. Tüm test sonuçları ilgili şekillerin altında istatistiksel anlamlılık sınırları ile birlikte sunulmaktadır.

3. SONUÇLAR

3.1. Rapamisin AR (+) LNCaP, AR (-) DU 145 ve PC3 prostat kanseri hücre çoğalmasını inhibe etmektedir

Farklı genomik özelliklere sahip LNCaP AR (+), DU 145 ve PC3 AR (-) prostat kanseri hücrelerine 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0-100 nM) rapamisin uygulanmıştır. Rapamisin, LNCaP AR (+) hücrelerinde çoğalmaya ket vurmasının yanı sıra 10 nM rapamisin % 20 oranında hücre canlılığında azalmaya neden olmuştur. Ancak DU 145 ve PC3 hücrelerinde hücre sayısında anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 15).

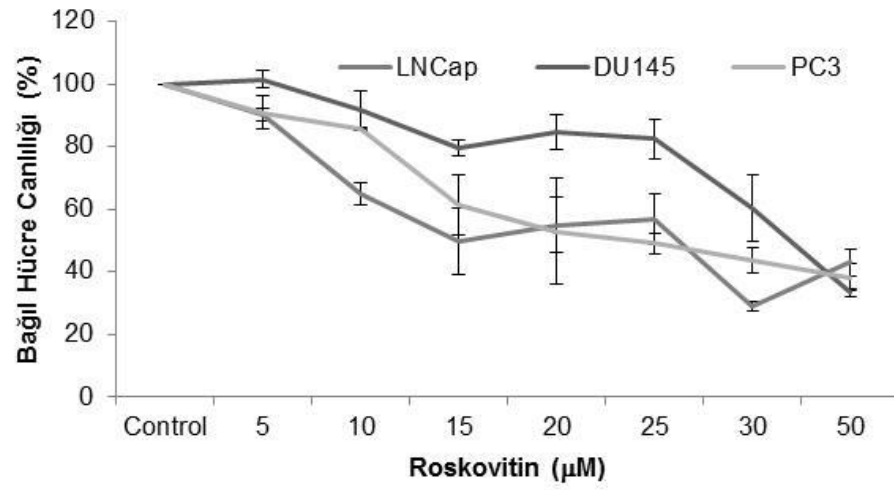
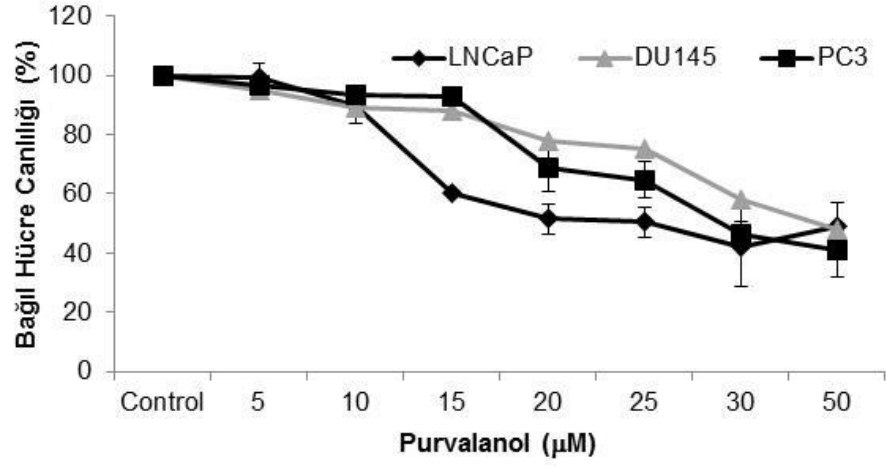


Şekil 15. Rapamisin'in (0-100 nM) AR (+) LNCaP, DU 145 ve PC3 AR (-) prostat kanseri hücre canlılığı etkisinin doza bağlı olarak değişimi. Hücreler 24 saat boyunca ilaç dozları ile inkübe edildikten sonra 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi ile analiz edildi. Yapılan deney grupları 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır.

10 nM rapamisin literatür verileri ile uyumlu olarak deneyler kapsamında ele alınmıştır. 10 nM rapamisin aynı zamanda Tablo 1 de yer alan CI verileri ile her bir CDK inhibitörü üzerinde sinerjistik etki gösterdiği anlaşılmıştır. Bu nedenle en fazla CDK inhibitörlerine cevap veren LNCaP hücrelerinde CI verilerinin sinerjistik etki

gösterdiği 10 nM rapamisin dozu tercih edilmiştir. Ek olarak 10 nM rapamisin uygulaması LNCaP hücrelerinde limit en az sitotoksosite gösteren rapamisin dozu şeklinde Şekil 16 da yer almaktadır. Diğer hücre hatlarında 10 nM rapamisin hücre canlılığında anlamlı bir değişikliğe yol açmamaktadır. Prostat kanseri hücre hatlarında her bir CDK inhibitörünün hücre canlılığı üzerine etkisi Şekil 16 de gösterilmektedir. 0-50 µM arasında 24 saat boyunca uygulama yapılan hücrelerde MTT hücre canlılığı analizi sonuçlara göre, LNCaP AR (+), DU 145 ve PC3 AR (-) prostat kanseri hücrelerine uygulanan purvalanol (20 µM) LNCaP hücre canlılığında yaklaşık olarak % 40, DU 145 ve PC3 hücre canlılığında % 30 oranında azalmaya neden olmuştur. Roskovitin (30 µM) LNCaP hücre canlılığında yaklaşık olarak % 50, DU 145 ve PC3 hücre canlılığında yaklaşık olarak % 40 oranında azalmaya neden olmuştur (Şekil 16).

Ayrıca roskovitin ve purvalanol için belirlenen inhibitör konsanstrasyonlar ile rapamisinin kombine etkisi “Combination index (CI)” hesaplama yöntemi ile irdelenmiştir. Bu amaçla ilaca hassasiyet gösteren LNCaP hücre hatlarında sinerjistik etki sağlayan dozların tüm hücre hatlarına uygulanması gerektiği ilk aşamada önerildiği hali ile kalmıştır. Dolayısı ile analizler % 50 hücre canlılığına ket vuran purvalanol ve roskovitin dozlarında sinerjistik etki oluşturan rapamisin uygulaması hedeflenerek gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla purvalanol ve roskovitin için seçili dozlar 10 nM rapamisin ile kombine edilmiş ve CI değeri elde edilmiştir. CI değerleri 1’den küçük olarak bulunduğu için etki sinerjistik olarak görülmüştür. DU 145 ve PC3 hücrelerinde ise antagonist (>1) veya sadece PC3 hücrelerinde purvalanol için sinerjistik (<1) etki olarak saptanmıştır (Tablo 1).



Şekil 16 CDK inhibitörleri hücre canlılığı üzerine doza bağlı olarak ket vurucu etki göstermektedirler. LNCaP, DU 145 ve PC3 prostat kanseri hücre hatları 1×10^4 hücre her bir kuyucukta olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre petrisine ekildiler, ardından 0-50 μM CDK inhibitörleri ile 24 saat boyunca muamele edildiler. Değerler en az 5 tekrarlarla gerçekleştirilen üç farklı MTT hücre canlılığı testinden elde edilen ortalama \pm st. hata verileridir.

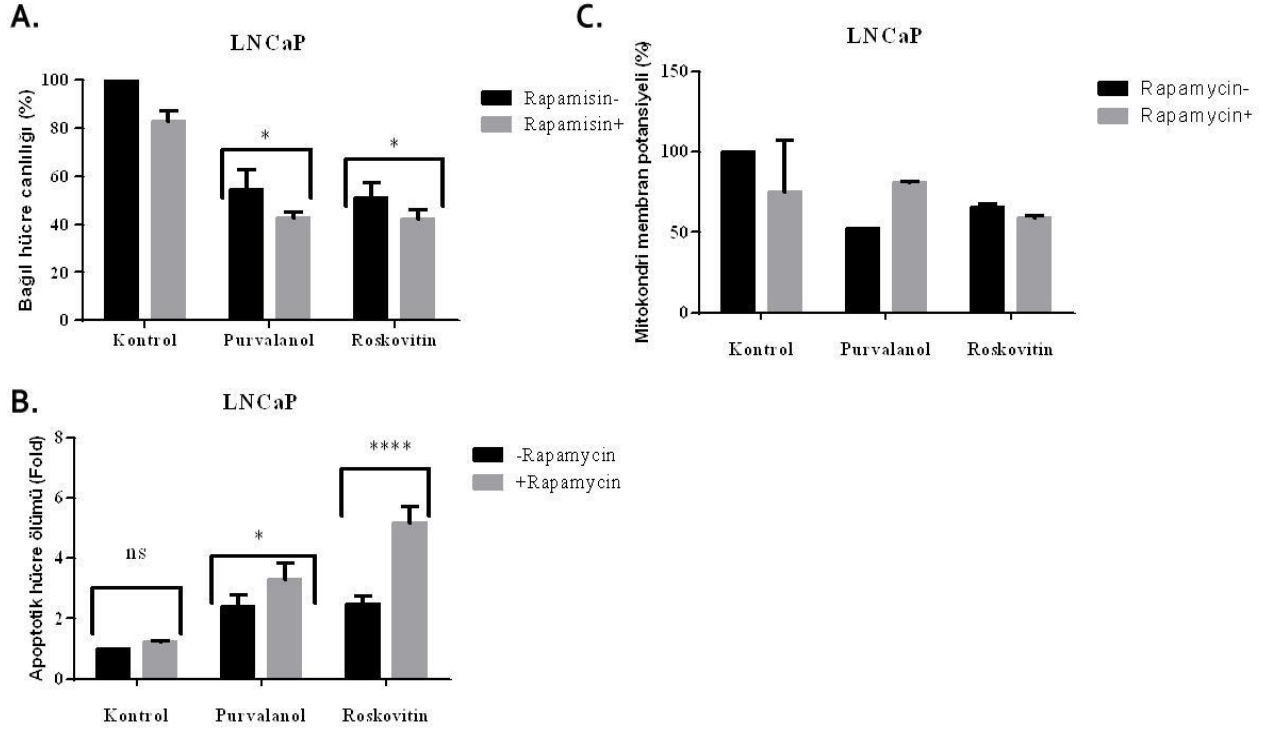
Tablo 1 Her bir hücre hattı için, CDK inhibitörlerinin rapamisin ile kombine uygulanması sonucunda elde edilen MTT hücre canlılığı verilerinin kombinasyon index (CI) yöntemi ile incelenmesi.

LNCaP AR (+) prostat kanseri hücreleri					
	Tek ilaç	Rapamisin (5 nM) kombine	Rapamisin (10 nM) kombine	CI değeri	CI değeri
Purvalanol	54,46669	83	43	1,53	0,78
Roskovitin	51,02075	60	42	1,19	0,83
DU 145 AR (-) prostat kanseri hücreleri					
	Tek ilaç	Rapamisin (5 nM) kombine	Rapamisin (10 nM) kombine	CI değeri	CI değeri
Purvalanol	69,04549	75	83	1,09	1,20
Roskovitin	62,51933	63	78	1,01	1,25
PC3 AR (-) prostat kanseri hücreleri					
	Tek ilaç	Rapamisin (5 nM) kombine	Rapamisin (10 nM) kombine	CI değeri	CI değeri
Purvalanol	69,73368	53	61	0,76	0,87
Roskovitin	57,60049	68	68	1,19	1,18

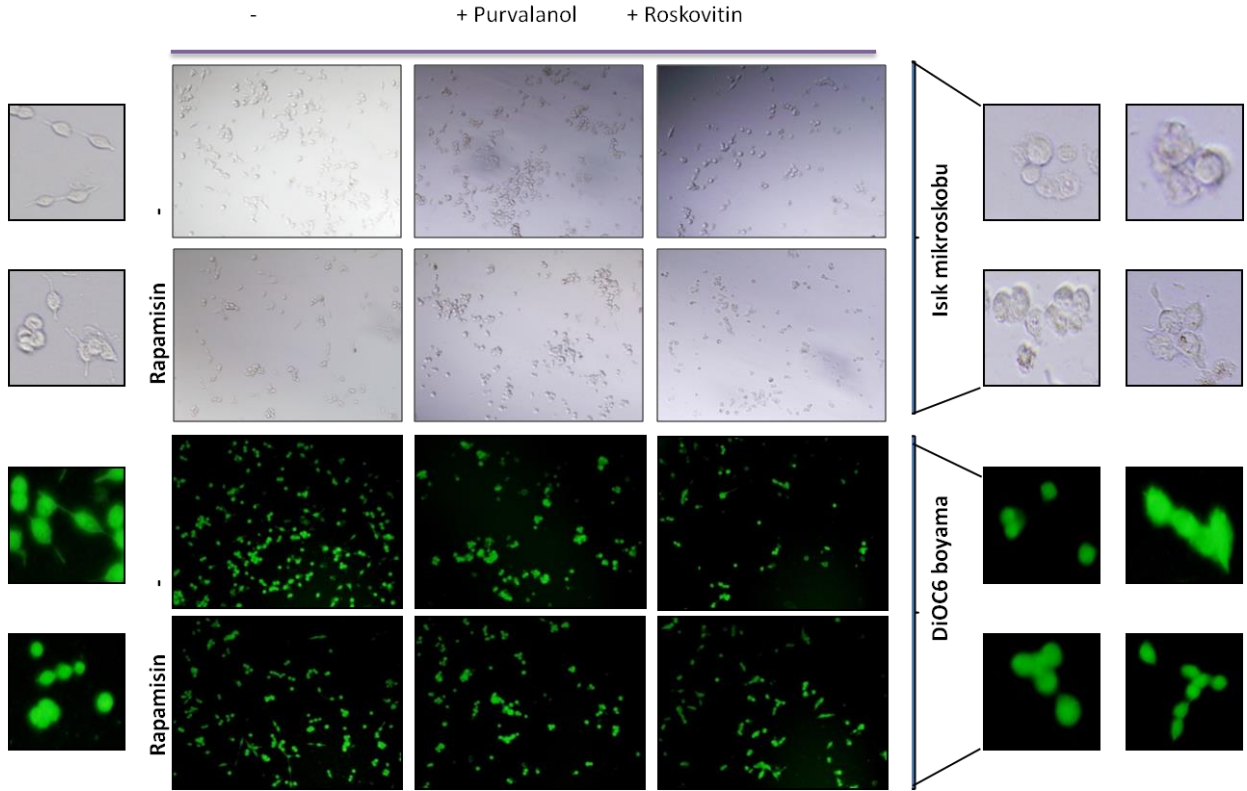
3.2.Androjene duyarlı LNCaP hücrelerinde CDK inhibitörleri ile kombine edilen rapamisin apoptotik hücre ölümü üzerinde sinerjistik etki yaratmaktadır

Hücre canlılığı ve CI hesaplamalarından yola çıkılarak, hücre canlılığında uygulanan doz ve kombine terapi modellerinde hücre ölümü parametreleri araştırılmıştır. DNA kırıklarının belirlenmesi yolu (ELIZA) ve hücre akım sitometrisi ile purvalanol ve roskovitin hücre canlılığında neden olduğu azalmaya bağlı olarak apoptozu teşvik ettikleri gösterilmiştir. Purvalanol (20 µM) ve roskovitin (30 µM) apoptotik etkisine ek olarak rapamisin (10 nM) mTOR yolağını baskılamasıyla hücre ölümünde ne gibi değişikliklere yol açacağı incelenmiştir. Yapılan MTT hücre canlılığı analizi sonuçlarına göre, LNCaP prostat kanseri hücrelerinde rapamisin (10 nM) hücre canlılığına yaklaşık % 20 oranında ket vurmıştır (Şekil 17). Hücre canlılığındaki azalmanın apoptotik mekanizma sonucu ile gerçekleştiğini anlamak üzere yapılan DNA kırıklarını hücrelerde belirlemeye yönelik gerçekleştirilen ELIZA sonuçlarına göre rapamisin eş uygulaması hem purvalanolün hem de roskovitin apoptotik etkinliğini arttırmıştır. Bu veriyi kontrol etmek üzere hücrelerde mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) DiOC6 boyama ile floresan mikroskobu ve fluorometre ile belirlenmiştir. Purvalanol ve roskovitin sırasıyla % 50 ve % 40 oranında kontrole oranla MMP de azalmaya neden olmuştur. Rapamisin özellikle roskovitin ile eş uygulama sonucunda MMP kaybında daha fazla artışa neden olmaktadır (Şekil 17).

Floresan mikroskopi yöntemi ile 4,6 –diamidino-2'-fenilindol (DAPI) ve Propidium iyodür (PI) boyaları ile hücrelerde boyama gerçekleştirildi. PI membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücrelere nüfuz ederek ölü hücrelerin görünür hale gelmesini sağlar. Yalnız purvalanol ve roskovitin uygulaması ölü hücre sayısında artışa neden olmuştur. Rapamisin ile CDK inhibitörlerinin kombinasyonu daha önce yapılan MTT hücre canlılığı analizi sonucunu destekleyecek şekilde çıkmıştır. Bir nükleik asit boyası olan DAPI hücre nükleusunu belirgin hale getirerek DNA kırıklarının görünür hale gelmesini sağlar. Purvalanol ve roskovitin uygulamaları sonucu, bir geç zamanlı apoptoz belirteci olan DNA kırıkları görünür hale gelmiştir (Şekil 18-19).

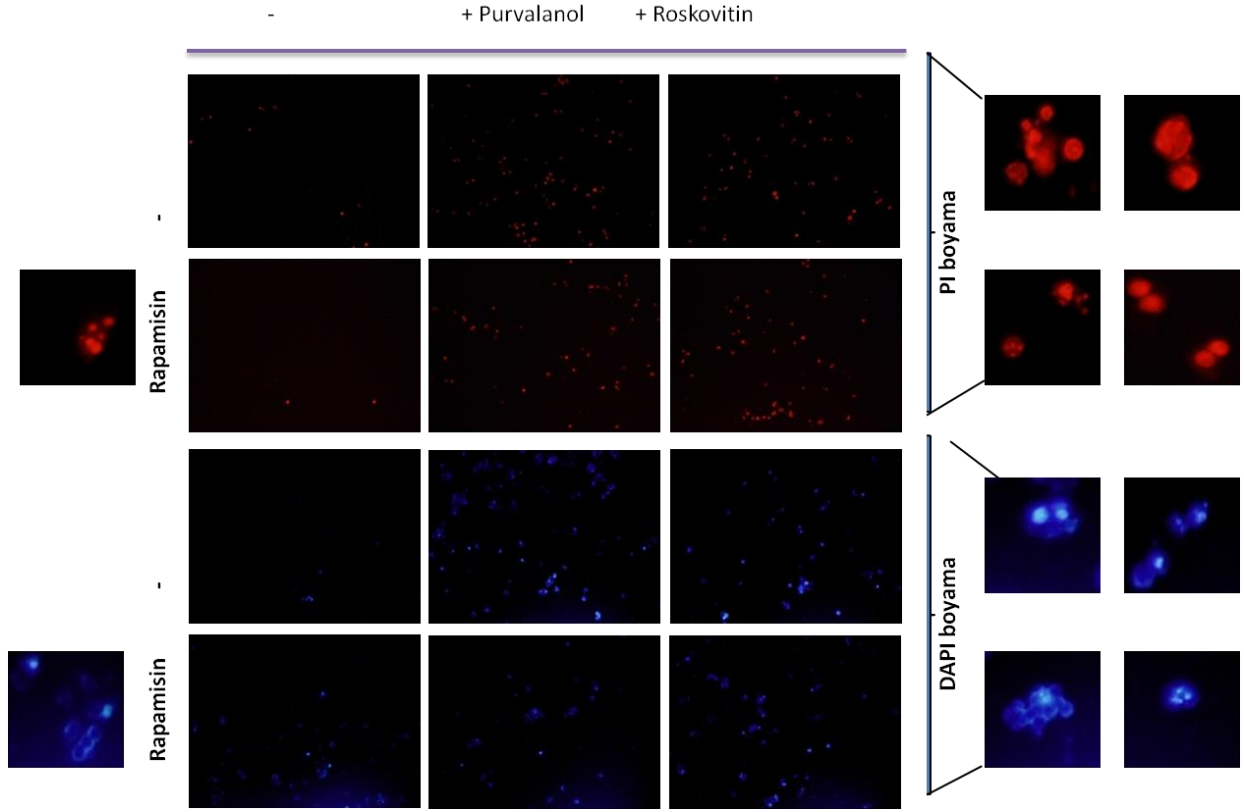


Şekil 17. Rapamisin, CDK inhibitörlerinin, purvalanol ve roskovitine, apoptotik hücre ölümü mekanizması üzerinde etkisinin modellenmesi. A. LNCaP AR (+) prostat kanseri hücre hatlarına 24 saat boyunca rapamisin (10 nM) ile purvalanol (20 µM) veya roskovitine (30 µM) yalnız ve ya kombine edilerek uygulandı. MTT hücre canlılığı testi ile hücrelerde ilaçların etkisi gözlenmiştir. Anlamlılık testi iki yönlü ANOVA testi ile Bonferroni çoklu karşılaştırma testi uygulanarak elde edilmiştir (p=0,0003 ;*p=0,0087). Kolon grafikte yer alan sonuçlar en az 5 farklı deney setinde yer alan 4 tekrarın ortalaması ve standart sapma olarak sunulmaktadır. B. İlaçların her birisinin ya da rapamisin ile kombine edilmesi yolu ile LNCaP hücreleri üzerindeki 24 saalike apoptoz üzerine etkileri DNA fragmantlerinin belirlenmesi yolu ile (Cell Death ELİZA) ile belirlendi. Her bir deney sonucu en az iki deney setinde yer alan 2 tekrarın ortalama ve standart sapması olarak ifade edilmektedir. İki yönlü Anova uygulamasında Bonferroni çoklu karşılaştırma testi ile elde edilen anlamlılık sonuçlarına göre * p= 0,012, **** p<0,0001. C. Rapamisin ile kombine edilen purvalanol veya roskovitinin LNCaP hücrelerinde mitokondri membran potansiyelinin bozulmasına bağlı olarak, hücre canlılığındaki azalmaya olan etkisi DiOC6 boyama ile en az 3 deney setinde yer alan 4 tekrarın ortalaması ve standart sapması olarak sunulmaktadır. Örnekler fluorometrede 485 – 538 nm’de saptanmıştır.**



Şekil 18. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörlerinin LNCaP prostat kanseri hücrelerinde hücre morfolojisi ve mitokondriyal membran potansiyeline olan etkisinin ışık ve floresan mikroskopunda incelenmesi. CDK inhibitörleri, purvalanol (20 μ M) veya roskovitin (30 μ M), rapamisin (10 nM) varlığında veya yokluğunda 24 saat boyunca LNCaP hücrelerine uygulandı. DiOC6 (4 nM) ile boyanan hücreler ışık veya floresan mikroskopunda incelendi (x20-x40).

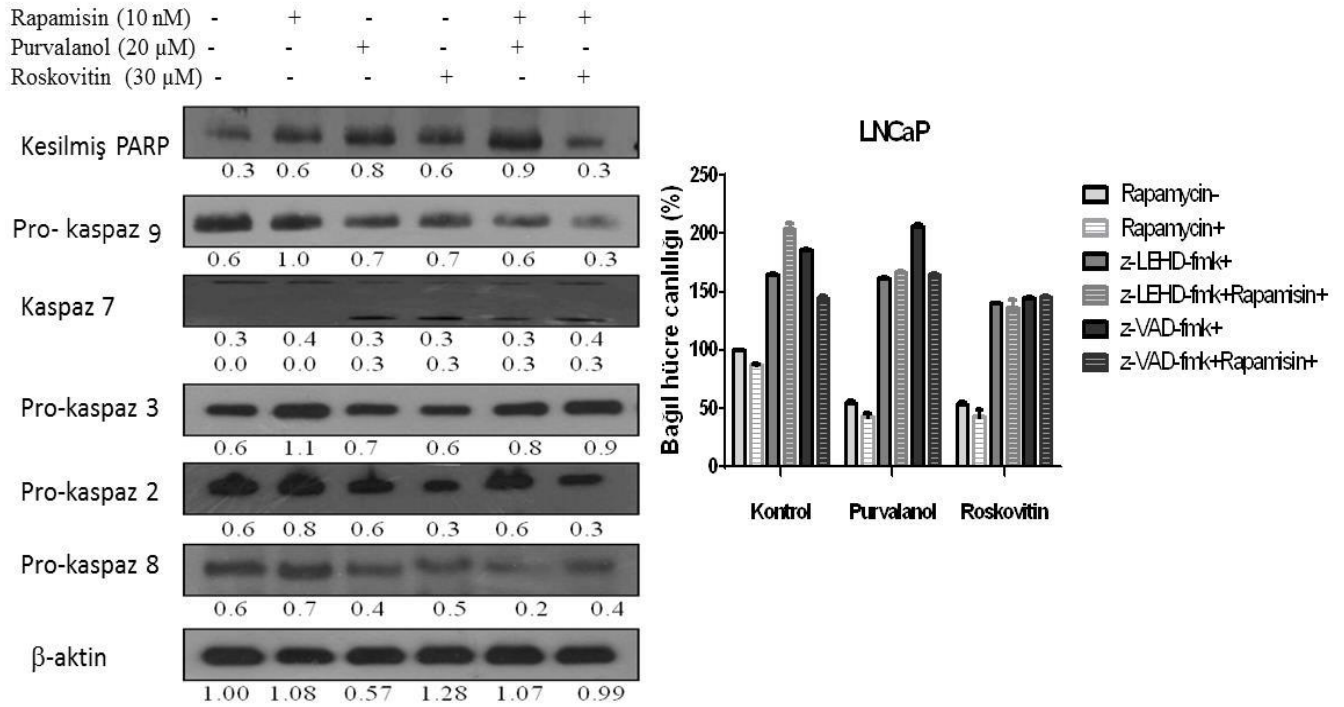
Rapamisin ile CDK inhibitörlerinin kombinasyonu ile AR(+) LNCaP hücreleri kaspaza bağımlı apoptotik ölüm yolağını seçmektedir. Rapamisin ile CDK inhibitörlerinin her birinin LNCaP AR (+) prostat kanseri hücrelerinde PI ve DAPI boyama ile irdelenilen apoptotik etki (Şekil 19), apoptoza özgü PARP, Kaspaz 3, Kaspaz 7, Kaspaz 2, Kaspaz 8 gibi moleküllerin ifade düzeylerinin immunoblotlama yöntemi ile belirlenerek incelendi. Rapamisin ile purvalanol kombinasyonu kesilmiş PARP oranını artırırken, rapamisin roskovitin ile birlikte aynı etkiyi göstermemektedir. Rapamisin 24 kDa PARP kesilmiş fragmentine kendi başına da LNCaP hücrelerinde neden olmaktadır.



Şekil 19. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörleri ile tetiklenen hücre ölümünün LNCaP prostat kanseri hücrelerinde floresan proplar ile belirlenmesi. Rapamisin (10 nM) ile purvalanol (20 μM) veya roskovitin (30 μM) ile tek tek veya kombine edilerek LNCaP hücrelerine 24 saat boyunca hücelere uygulandı. Propidium iyodür (PI) ve DAPI ile boyanan hücreler floresan mikroskopunda incelendi (x20-x40).

Purvalanol veya roskovitin uygulamasına tabi tutulan hücrelerde, Prokaspaz 7 ve 3'ün Kaspaz 7 ve 3 fragmentine kesilmesine neden olmuştur. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörleri ise benzer etkiyi Kaspaz 3 aktivasyonu için göstermemişlerdir. Benzer şekilde, CDK inhibitörlerinin ölüm sinyal yolağını apoptozu tetiklemek için Kaspaz 8 ve 2 yolu ile aktive ettikleri Şekil 20'de görülmektedir. Özellikle roskovitin anlamlı olarak Kaspaz-2 aktivitesine neden olmaktadır. Her iki CDK inhibitörü Kaspaz 8 i benzer oranlarda aktive etmekte ve rapamisin bu etkiyi arttırmaktadır. Her iki CDK için elde edilen apoptotik veriler ve MMP kaybı ile uyumlu olarak ilaçların hücrede tüm apoptotik yolları aktive edebildiğini düşündürmektedir. Bu amaçla hücelere ön uygulama ile (1 saat) pan-kaspaz inhibitörü (z-VAD-FMK) veya Kaspaz-9 inhibitörü (z-LEHD-FMK) uygulandı. Ardından ilaçlar tek tek veya kombine olarak uygulandılar ve bu süreçte her bir kaspaz inhibitörü ilaçların sitotoksik etkisini önlediği belirlendi.

Ancak bu önleme mekanizması purvalanol ve roskovitin arasında mekanizma etkinliğinde bir farklılık olabileceğini düşündürmektedir. Çünkü purvalanol kaspaz inhibitörleri varlığında hiç etkin olamazken, roskovitin halen kontrol hücelere oranla kaspaz inhibitörleri varlığında hücre bölünmesini durdurma yönünde etkili olmaktadır (Şekil 20).



Şekil 20. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörlerinin kaspaza bağımlı apoptoz üzerinde etkisinin belirlenmesi. A. Rapamisin (10 nM) ile purvalanol (20 µM)/roskovitin (30 µM) yalnız veya kombine edilerek 24 saat boyunca hücelere uygulandı. Total protein izolasyonunun ardından 30 µg protein %12' lik SDS-PAGE jel ile ayrıldı ve immunoblotlama yöntemi ile PARP, kaspaz-2.3.7.8 protein ifadeleri incelendi. β-aktin yükleme kontrolü olarak uygulandı. B. Kombine ilaç uygulamasının kaspaza bağımlı yolak üzerindeki etkisini belirlemek üzere, genel kaspaz inhibitörü (Z-VAD) ve kaspaz 9 inhibitörü (z-LEHD) ilaç uygulamalarından 1 saat önce 10 µM olacak şekilde uygulandı. Kaspaz inhibitörlerinin hücelere üzerindeki etkisi MTT hücre canlılığı analizi ile incelendi. Kolon grafikte yer alan sonuçlar 2 farklı deney setinde yer alan en az 4 tekrarlı sonuçların ortalama ve standart sapması olarak sunulmuştur.

Rapamisin varlığında veya yokluğunda purvalanol veya roskovitin LNCaP hüceleri üzerindeki apoptotik etki mekanizmasının anlaşılmasına yönelik olarak, pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 protein ailesi üyelerinin ifade düzeyleri incelenmiştir. Rapamisin LNCaP prostat kanseri hücelere, Bim L ve S formlarını tetiklemiş, Bak ifadesinin artmasına neden olmuş ve Mcl-1'in azalmasına neden olmuştur. Bu veriler daha önce sunulmuş olduğumuz MTT hücre canlılığı ve MMP sonuçları ile uyumludur.

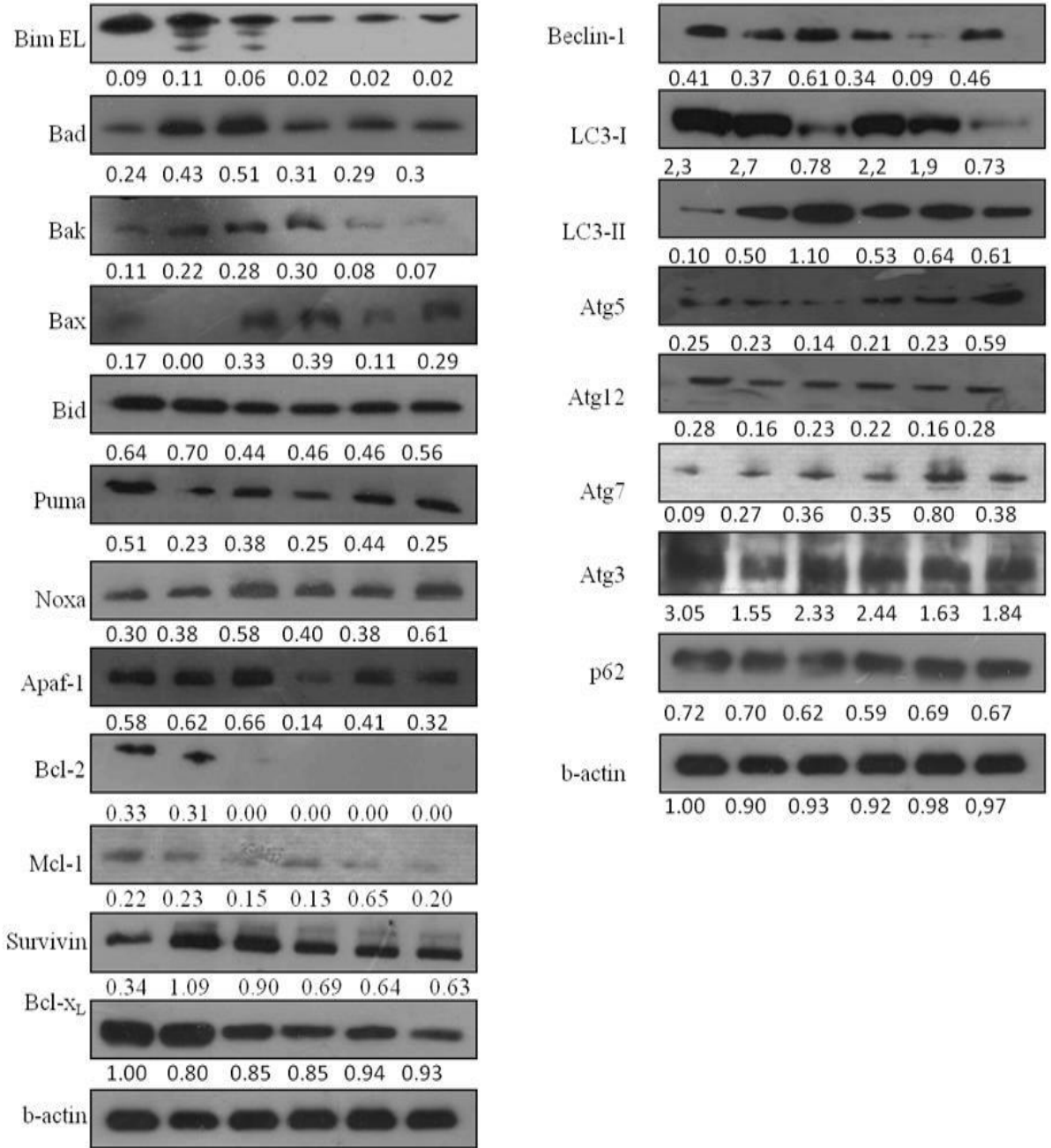
Ayrıca Bim kısa formlarının oluşması üzerinde purvalanol de benzer etki göstermiş ancak roskovitin sadece BimEL düzeyinde azalmaya neden olmuştur. Her iki ilaç Bak ve Bax ifadelerini kaydadeğer düzeyde arttırmıştır. Bak ve Bax'ta görülen bu artış her iki ilacın mitokondri üzerinden apoptotik etkinlik gösterebileceklerine dikkati çekmektedir. Bid ifade düzeyi CDK inhibitörleri tarafından azaltılmış ancak bu etki rapamisin kombinasyonunda ortadan kalkmıştır. Rapamisin bu anlamda oldukça dikkat çekici bir kombinasyon ajanıdır. Bak ifade düzeyi rapamisin ile CDK inhibitörleri kombine edildiğinde kontrol hücrelere oranla hiç değişmezken, Bax ifadesi özellikle roskovitin ile rapamisin kombine edildiğinde korunmuş ancak rapamisin purvalanol ile beraber zıt etkiye neden olup, Bax'ın ifade düzeyinin artmasını engellemiştir. Pro-apoptotik Bcl-2 ailesinin görevine benzer şekilde görev alan Apaf-1 apoptozom kompleks ile Kaspaz 9 varlığında aktive olmaktadır. Bu süreçte purvalanol Apaf-1 ifade düzeyinde artışa neden olmuştur. Ancak roskovitin zıt etki göstermiş ve ancak rapamisin ile kombine edildiğinde Apaf-1 ifade düzeyi artmıştır. Pro-apoptotik proteinlerin ifade düzeylerine bakıldığında her iki CDK inhibitörünün farklı Bcl-2 ailesi üyeleri ile interaksiyon göstererek apoptotik karara neden oldukları düşünülebilir. Ancak bu verilere rağmen, antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerindeki uyumlu azalma, CDK inhibitörlerinin anti-apoptotik üyeler üzerinde baskı mekanizması yolu ile hücre ölümünde görev aldıklarını düşündürmektedir.

Bcl-2, Bcl-x_L ve Mcl-1 ifade düzeyleri CDK inhibitörleri varlığında anlamlı düzeyde azalmaktadır ve rapamisin koruyucu etki göstermemektedir. Survivin benzer şekilde apoptoz inhibitör proteinleri (IAPler) gibi anti-apoptotik etkilere sahiptir. Kontrole oranla rapamisin survivinin ifade düzeyini arttırmaktadır. Benzer şekilde CDK inhibitörleri de survivin ifade düzeyini arttırmakta ancak rapamisin kombine edildiğinde bu etki azalmaktadır. Dolayısı ile CDK inhibitörlerine Bcl-2 ailesi üyelerinin alt sinyal yollarında bir direnç mekanizması LNCaP hücrelerinde oluşabilir ancak Bcl-2 ailesi anti-apoptotik üyelerinin baskılanmaları hücrelerde apoptoza neden olmaktadır (Şekil 21). Aynı deney düzeneği bu kez otofajik belirteçlerin taranmasına yönelik olarak kullanıldı. Şekil 21'de sağ panelde görülen immunoblotlama sonuçlarına göre, Beclin-1, Atg12 ve Atg3 rapamisin varlığında azalırken, LC3-I/II ifadesi artmıştır. Purvalanol Beclin-1 üzerine etki göstermemiştir. LC3-I/II, Atg7 ve Atg-3 ifadesi artmış ve p62 azalmıştır. Bu veriler rapamisin kadar purvalanolün de apoptoz kadar otofaji üzerinde de etkili olduğunu göstermektedir.

Benzer şekilde roskovitin LC3-I/II, Atg5, Atg12, Atg3 ifadelerini arttırmıştır. Ancak her iki ilacın etkinlik dereceleri bu mekanizmalar üzerine farklı zamanlarda yer almaktadır. Bu nedenle toplam protein ifadesi üzerinden 24 saat uygulama sonuçları genel bir veri sağlama potansiyelindedir. Rapamisin ve purvalanol uygulaması sonucunda Beclin-1 azalmış, LC3-I/II ifade düzeyi sadece purvalanol uygulamasına göre azalmış, Atg-5, Atg7 ve p62 sadece purvalanol uygulamasına göre artmıştır. Bu nedenle rapamisin purvalanolün otofaji üzerine etkinliğini daha erken otofagozom oluşumu şeklinde modifiye etmiştir. Hücre canlılığı azalmakta ve ölüm gerçekleşmektedir ancak hücre ölümünün tipi rapamisin varlığında purvalanol uygulaması için aynı zamanda otofajiyi de düşündürmektedir. Roskovitin rapamisin ile kombine edildiğinde ise Beclin-1 ifadesi değişmemekte, Atg5 ve Atg7 ifade düzeyleri sadece roskovitin uygulamasına göre artış göstermektedir.

Rapamisin ile kombinasyonun otofajik markırlar üzerindeki etkisini anlamak üzere otofaji anahtar moleküllerine yönelik olarak susturma yolu ve monodansil kadaverin (MDC) boyama ile otofajik yapıların aşamaları incelenmiştir (Şekil 22-23). Rapamisin otofajik yapılarda belirgin bir artışa neden olmuştur. Yalnız purvalanol uygulaması otofajik yapılarda belirgin bir artışa neden olmazken, roskovitin purvalanole kıyasla daha çok otofajik yapılar oluşmasına neden olmuştur. Her iki ilacın rapamisin ile kombinasyonu otofagozom yapılarını arttırmıştır.

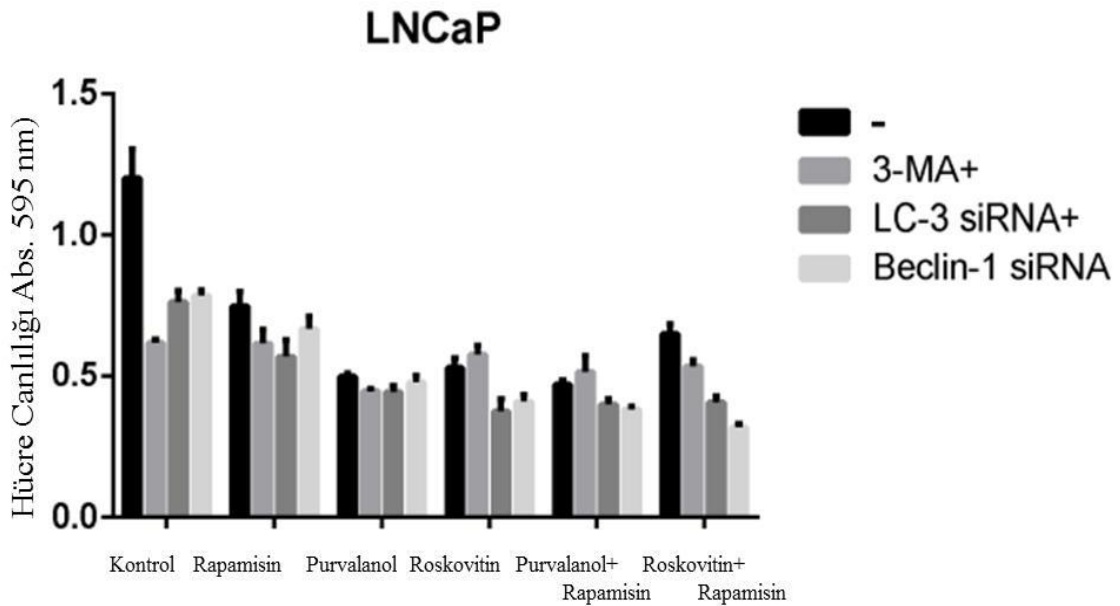
Rapamisin (10 nM)	-	+	-	-	+	+
Purvalanol (20 µM)	-	-	+	-	+	-
Roskovitin (30 µM)	-	-	-	+	-	+



Şekil 21. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörlerinin pro- ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi (A), ve otofaji belirteçleri (B) üzerine etkileri immunoblotlama yöntemi ile belirlendi. Total protein izolasyonunun ardından 30 µg protein her bir örnek için %10-12 SDS-PAGE ile ayrıştırıldı. Immunoblotlama işlemlerinin ardından ilgili proteinlere ait bantlar kemiluminisans yöntem ile belirlendi.

3.3. Otofaji yolağının farklı stratejilerle baskılanması ve CDK inhibitörlerinin rapamisin ile kombinasyonu ile prostat kanseri hücrelerinde etkinliklerinin belirlenmesi.

Otofaji inhibitörü 3-MA ve Beclin-1/LC3 siRNA ile gerçekleştirilen otofaji yolağının baskılanmasına yönelik olarak deney kurgularında LNCaP hücre canlılığı ve bu hücrelerde MDC vesikül boyaması esas alınmıştır. Rapamisin bir otofaji tetikleyici ajan olarak her hücre tipinde CDK inhibitörlerinin terapötik etkinliğinde farklılıklar göstermektedir. Şekil 22’de yer aldığı üzere her üç strateji ile birlikte otofajinin indirgenmesi kontrol hücrelerine oranla hücre canlılığına ket vurucu etkiye neden olmaktadır. En anlamlı etki LC3 siRNA veya Beclin-1 siRNA ile hücrelerde otofajik sinyal yolağı baskılandığı zaman roskovitin ve roskovitin+rapamisin kombinasyonu için belirlenmiştir (*p<0,05 her bir koşul için; roskovitin vs roskovitin+LC-3 siRNA, rapamycin+roskovitin vs LC3 siRNA veya Beclin-1 siRNA +). Bu nedenle purvalanol ve roskovitin LNCaP hücrelerinde farklı hücre yolaklarını hedef aldıkları hipotezi geliştirilmiştir. Ancak LNCaP prostat kanseri hücrelerinde otofajinin indirgenmesi aynı zamanda kontrol hücrelerine oranla hücre canlılığında negatif bir etkiye neden olmuştur (Şekil 22).



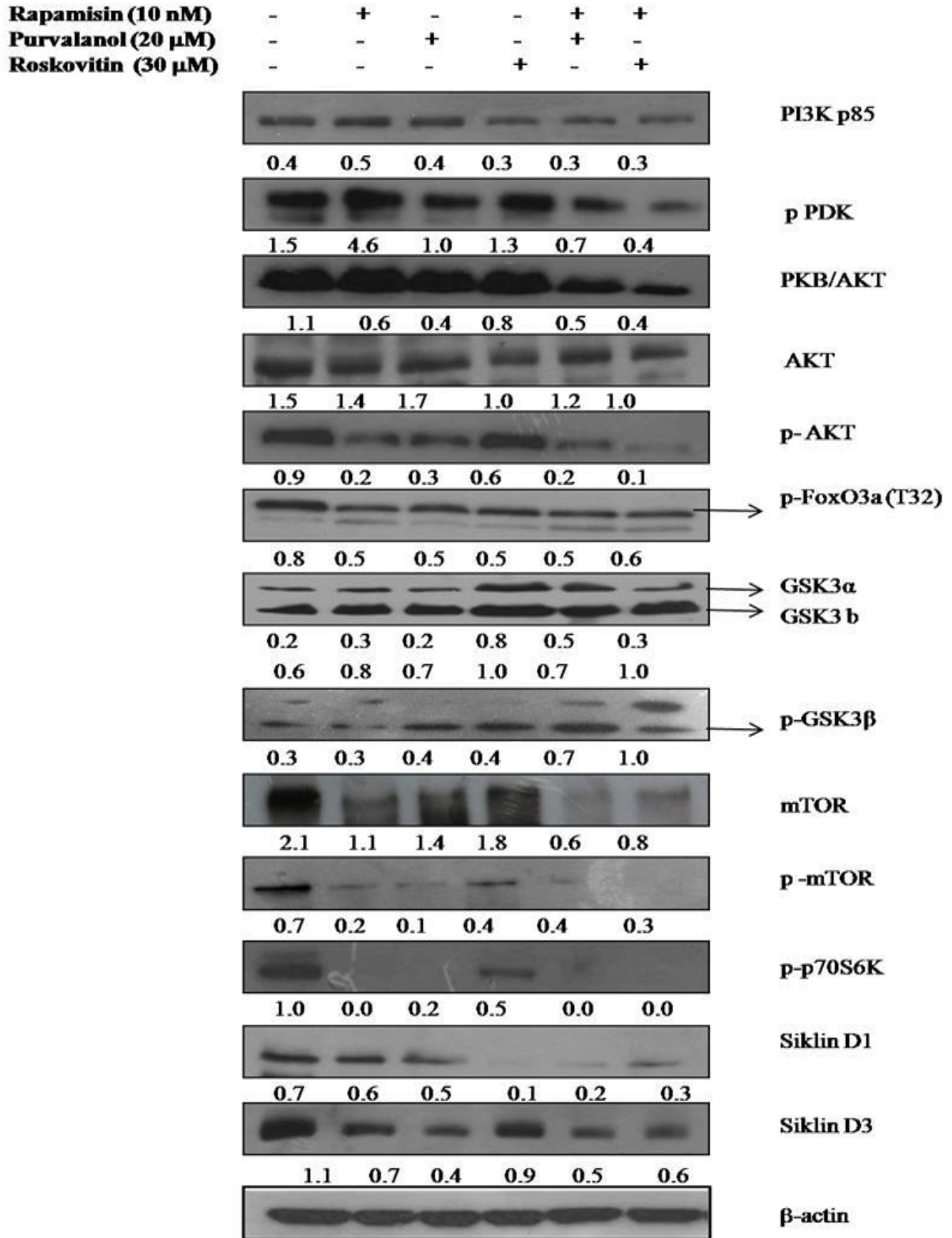
Şekil 22. Androjene duyarlı LNCaP prostat kanseri hücrelerinde 3-MA, LC3 siRNA veya Beclin-1 siRNA uygulaması ile otofaji yolağının baskılandığı durumlarda CDK inhibitörleri ve rapamisinin etkisinin hücre canlılığı verileri ile irdelenmesi.

3.4. PI3K/Akt yolağı otofaji ile apoptoz arasındaki denge/geçiş sürecini etkilemektedir

Rapamisin ile CDK inhibitörleri ile kombinasyonunun PI3K/ Akt sinyal yolağı üzerindeki etkisini belirlemek üzere immunoblotlama yöntemi ile PI3K, PDK, Akt, p-FoxO3a (T32 veya T24), GSK3 α,β , mTOR, p-mTOR, p-p70S6K, Siklin D1 ve D3 ifade düzeyleri incelenmiştir (Şekil 3,8). Rapamisin PI3K p85, GSK3 α ve p-FoxO1 (T24) ifade düzeylerini arttırırken ve Akt ve p-FoxO1 (T32) ifade düzeylerini azaltmıştır. Purvalanol, PI3K p85 ve Akt ifadesinde belirgin bir etkiye neden olmamıştır, fakat rapamisin ile kombinasyonu PI3K ve Akt ifadesini azaltmıştır. Roskovitin, tek başına PI3K p85 ifadesini azaltmıştır. Rapamisin ile kombine edildiğinde PI3k p85 ifadesindeki azalma yalnız roskovitin uygulandığındaki etki ile aynı olmuştur. Roskovitinin PI3K p85 ifadesini azaltması, aynı sinyal yolağında bulunan Akt ifadesinde de azalmaya neden olmuştur. PI3K'in alt sinyal yolağında yer alan PDK ifadesinin fosforile düzeyi rapamisin varlığında azalmaktadır. AKT, serin / treonin kinaz fosfatidilinositol 3-bağımlı kinaz 1 (PDK1) tarafından fosforillenerek aktive olur. Buna göre rapamisin varlığında p-Akt düzeyi de azalmıştır. Purvalanol p-Akt düzeyinin baskılanmasında roskovitine kıyasla daha etkili olmuştur.

Transkripsiyon faktörü olan Forkhead ailesi (FoxO) aktif formda iken hücre siklusunun durdurulması, apoptoz gibi tümör baskılayıcı özelliklere sahip bir protein ailesidir. Akt tarafından fosforile edildiğinde hücre canlılığının devam etmesine yol açmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre, rapamisin p-FoxO3a ifadesini azaltmıştır. Purvalanol ve roskovitin kontrol ile kıyaslandığında fosfo-FoxO3a ifade düzeyini azaltmıştır. Her iki ilacın rapamisin ile kombinasyonu p-FoxO3a ifadesinde daha etkili bir azalmaya neden olmuştur. Bu etki hücre siklusunun durdurulmasında görev alan diğer proteinleri etkilemiştir. PI3k/ Akt sinyal yolağının etkilediği ve hücre çoğalması, apoptoz gibi metabolizmada önemli rolü olan glikojen sentaz kinaz (GSK3) ifadesi purvalanol uygulaması ile artmıştır, rapamisin kombinasyonu GSK3 β ifadesinde azalmaya neden olmuştur. Roskovitin kontrole ile kıyaslandığında GSK3 α ve β ifade düzeylerinde azalma saptanmıştır. Rapamisin ile CDK inhibitörlerinin kombinasyonu da aynı etkiye neden olmuştur. Hücrede enerji metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rolü olan mTOR düzeyinin baskılanması hücre siklusunda görev alan proteinleri etkileyerek hücre proliferasyonunu engellemektedir. Rapamisin mTOR inhibitörü olması nedeniyle mTOR ifadesini baskılamıştır. Purvalanol ve roskovitinin kontrole kıyasla mTOR ifade düzeyini azaltması CDK inhibitörlerinin hücrede enerji metabolizmasına ket vurduğunu göstermektedir. Purvalanol Serin 2448 bölgesinden

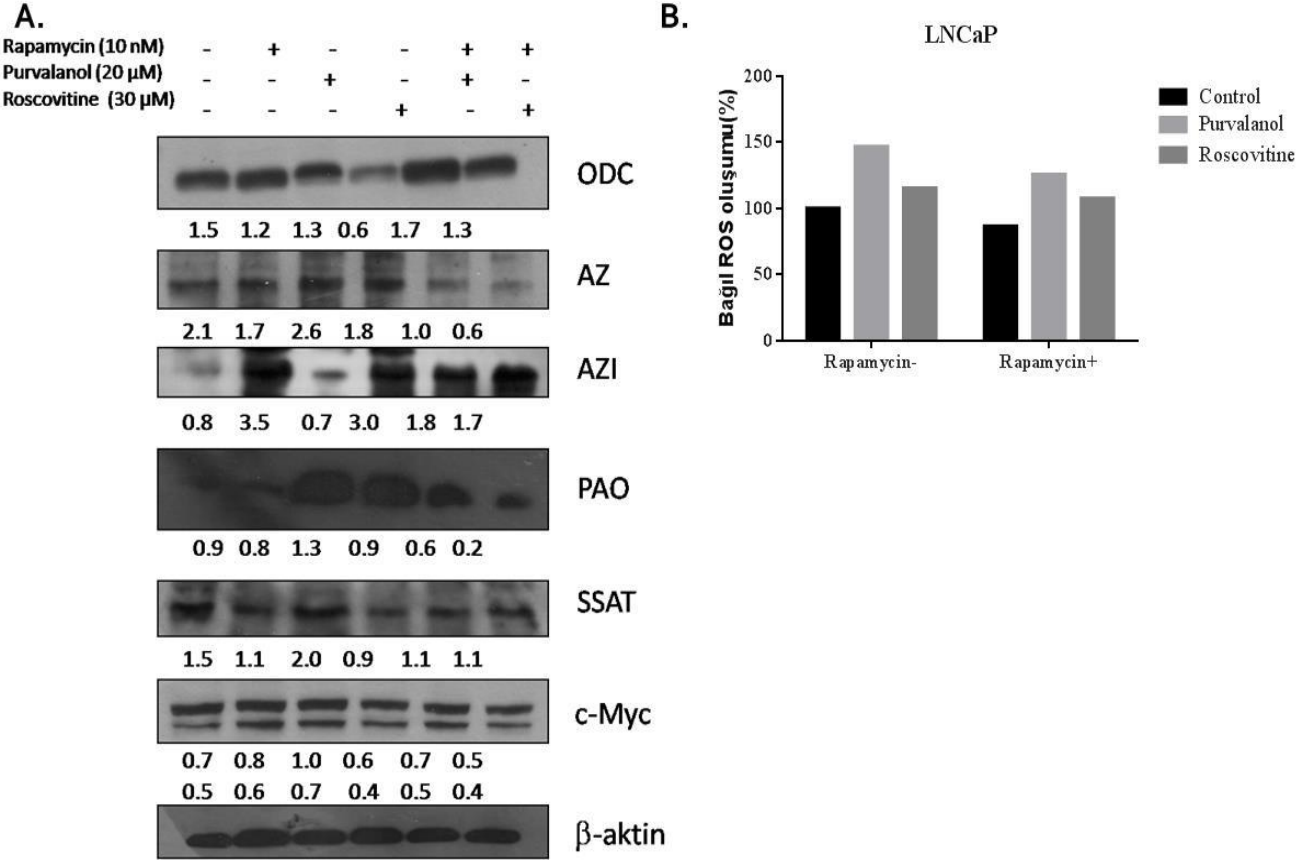
fosforile olan mTOR ifadesini azaltmıştır. Purvalanol ile PI3k/Akt/mTOR sinyal yolağı inhibe edilmesiyle Siklin D1 ve Siklin D3 ifade düzeylerinde kaydadeğer bir azalma görülmüştür. Roskovitin kontrol ile kıyaslandığında mTOR ve p-mTOR ifadesini azaltmıştır; fakat bu etki purvalanol ile kıyaslandığında purvalanolün daha etkili olduğu görülmüştür. mTOR alt sinyal yolağında translasyonel aktivasyonda görevi olan p70S6K fosforile formu rapamisin varlığında tamamen baskılanmıştır. Bu sonuca benzer olarak, p-Akt düzeyinde olduğu gibi purvalanol p-p70S6K ifadesi üzerinde roskovitinden daha etkili olmuştur. Siklin D1 ifade düzeyinin azalmasında roskovitin daha etkili olurken, Siklin D3 ifadeleri ile kıyaslandığında purvalanol daha etkili olmuştur. Bu etki her iki CDK inhibitörünün hücre siklusunu farklı noktalarda durdurduğuna bir kanıt olarak gösterilebilir. Her iki ilacın rapamisin ile kombinasyonu mTOR ve p-mTOR ifade düzeylerini daha da azaltmıştır. Rapamisin ile purvalanol kombinasyonu Siklin D1 ve Siklin D3 ifadesinde de daha etkili bir azalma sağlamıştır. Rapamisin ile roskovitin kombinasyonu, tek başına roskovitin Siklin D1 ifadesinde yarattığı etkiyi geri çekerken; Siklin D3 ifadesinde daha kayda değer bir azalmaya yol açmıştır (Şekil 23).



Şekil 23. Rapamisin ile CDK inhibitörleri kombinasyonu PI3K/AKT/mTOR sinyal iletiminde yer alan protein ekspresyon düzeylerini etkilemektedir. Total protein izolasyonunun ardından 30 µg protein %12 lik SDS-PAGE jel ile ayrıldı ve immunoblotlama yöntemi ile PI3K p85, p-PDK, AKT, pAkt, GSK3, mTOR, p-mTOR, p-p70S6K, p-FoxO3 (T32) protein ekspresyon seviyeleri incelendi.

3.5. Rapamisinin CDK inhibitörleri ile eş uygulanması ODC'nin baskılanmasını engelleyerek hücre içi poliamin seviyesinin düşmesini engellemektedir

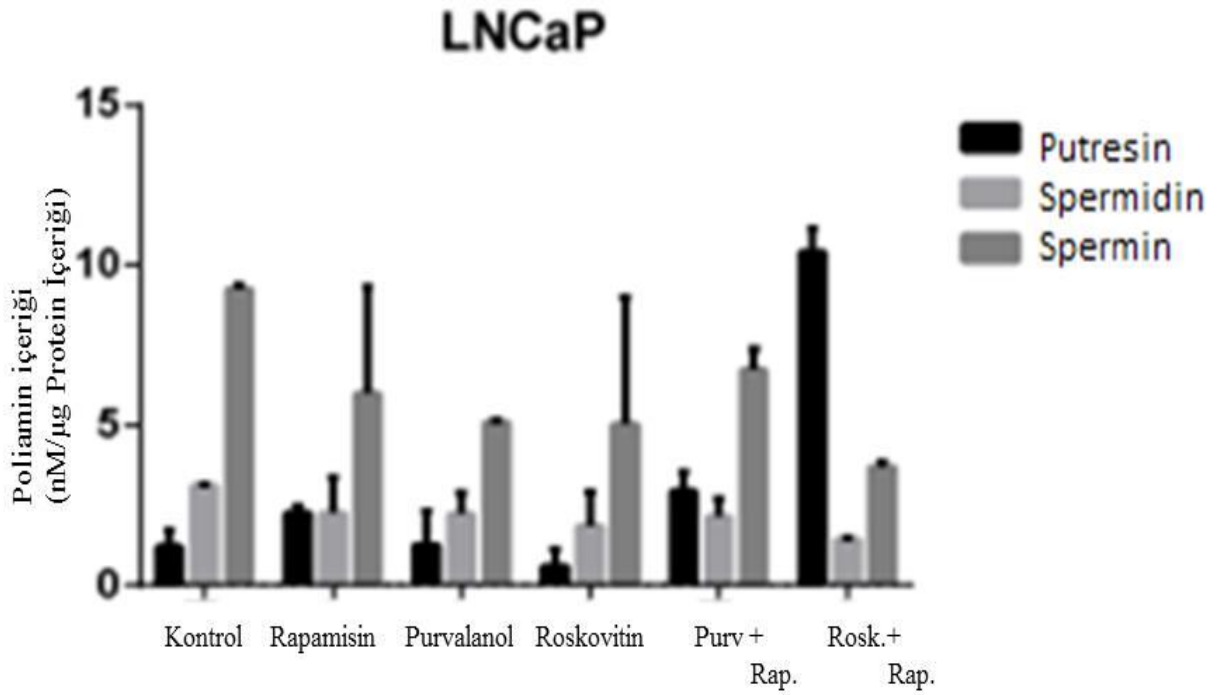
mTOR sinyal yolağı enerji metabolizması ile hücrede büyüme, çoğalma, protein sentezi gibi yaşamsal faaliyetleri düzenlemektedir. Bazı aminoasit türevlerinin eksikliği otofajiye neden olarak hücrenin stres koşullarında ölümden kaçışını sağlamaktadır. Bir amin türevi olan poliaminlerin CDK inhibitörleri ile tetiklenen apoptotik/otofajik süreçte etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu etkiyi belirlemek üzere immunoblot yöntemi ile ODC, PAO, SSAT ifade düzeyleri incelendi (Şekil 24). Poliamin biyosentez enzimi olarak görev alan ODC'nin ifade düzeyi, purvalanol uygulaması ile kayda değer bir şekilde etkilenmemiştir, fakat roskovitin ODC ifadesini belirgin bir şekilde azaltmıştır. Her iki ilacın rapamisin ile kombinasyonu ODC seviyesinde artışa neden olmuştur. Poliamin metabolizmasında ODC'yi baskılayan antizim (AZ) ifadesinde rapamisin varlığında azalma görülmüştür. Antizim inhibitörü (AZI) ifadesinde ise bu veriyi destekleyecek şekilde rapamisin varlığında artış gözlenmiştir. Rapamisin poliamin katabolizmasında rol oynayan PAO ifadesinde belli bir değişiklik yaratmamıştır. Her iki CDK inhibitörü PAO ifadesini yüksek miktarda arttırmıştır. Bu sonuçtan yola çıkarak purvalanol ve roskovitin hücre içi poliamin seviyesinde azalmaya neden olduğunu gösterilmiştir. Her iki ilacın rapamisin ile kombinasyonu PAO ifadesinde purvalanol ve roskovitin yarattığı etkinin geri çekilmesine neden olmuştur. Poliamin katabolizmasında rol oynayan bir diğer enzim SSAT ifadesinde rapamisin uygulanmasıyla azalma gerçekleşmiştir. Purvalanol SSAT ifadesini arttırmış; fakat roskovitin kontrolle kıyaslandığında SSAT ifadesinde azalmaya neden olmuştur. Rapamisin kombinasyonu purvalanolün yarattığı etkiyi geri çekerek, SSAT ifadesinde azalmaya sebep olmuştur. Rapamisin ile roskovitin kombinasyonu SSAT ifadesini kontrolle kıyaslandığında azaltmıştır. Rapamisinin kombinasyonu ile poliamin katabolizmasında görev alan enzimlerin azalması hücrede poliamin katabolizması ile oluşan reaktif oksijen türlerinde (ROS) azalmıştır. ROS seviyesindeki azalma apoptoz ile otofaji arasındaki denge/geçiş sürecini etkileyen bir diğer veri olmuştur.



Şekil 24. Rapamisin ile CDK inhibitörleri kombinasyonu hücre içi poliamin seviyesini üzerinde etkili olmaktadır. A.Total protein izolasyonunun ardından 30 μ g protein SDS-PAGE jel ile ayrıldı ve immunoblotlama yöntemi ile PAO, ODC, SSAT c-Myc protein ifade düzeyleri incelendi. β -aktin yükleme kontrolü olarak gösterilmektedir. B. Kombine ilaç uygulamalarından sonra hücre metabolizmasındaki reaktif oksijen türlerindeki (ROS) değişim, DCFDH-DA (1 mM) floresan boyama ardından 485-530 nm de florometre ile ölçüldü.

Bu araştırma kapsamında hücre sağkalmı, apoptotik hücre ölümü arasındaki ilişkinin poliamin yolağının hedef alınarak sorgulanması ile ilgili amaçlar doğrultusunda putresin, spermidin ve spermin içerikleri HPLC ile benzoilasyon yöntemi sonucunda standart putresin, spermidin ve spermin okumalarına göre sırası ile örneklerde belirlenmiş ve toplam protein düzeyinde hesaplanarak aşağıda yer alan Şekil 25'te sunulmaktadır. Tüm hücreler için poliamin içerikleri ile ilgili deneyler en az iki farklı kültür ortamından elde edilen 2 tekrarlı örneklerde belirlenmiş olup, halen çalışmalar laboratuvarlarımızda devam etmektedir. Özellikle poliaminlerin; spermidin ve spermin'in otofaji ve apoptotik mekanizmalar ile ilgili ilişkileri oldukça yeni tartışılmakta olan araştırma konularından olup, ilgili doğal poliaminlerin sentetik analoglarının bu anlamda terapotik etkinlikleri umut vaatmektedir.

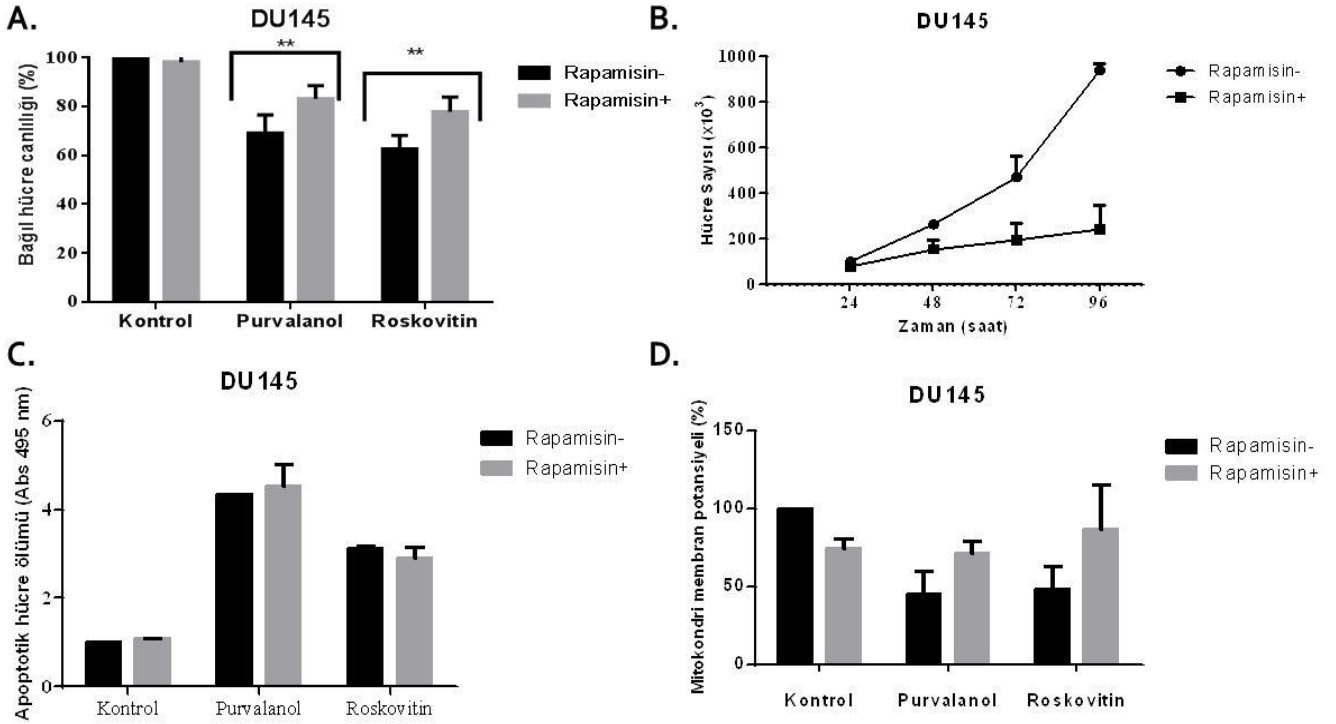
Bu nedenle tez çalışması kapsamında ODC ile birlikte çalışan c-myc, bir protoonkogen PI3K-AKT-RAS sinyal ekseninin hedeflerinden bir tanesi olarak incelenmesi gerektiği düşünülmüştür. Bu nedenle poliamin düzeylerinin irdelenmesi yolu ile poliaminlerin hem biyosentez hem de katabolik yönden, hücre sağ kalım/apoptoz kararına katıldıkları gösterilmiştir. Ek olarak, hücre içerisinde biyosentezi kontrol eden AZI ve OAZ ifade düzeylerine ek olarak bu dönem içerisinde c-myc ODC ifadesi ile ilişkili olarak sorgulanmıştır. Roskovitin ile rapamisin uygulanması sonucunda putresin düzeylerinde görülen değişim sadece rapamisine veya roskovitin uygulamalarına oranla anlamlı düzeyde değişime neden olmuştur (Şekil 25. Bonferroni'nin çoklu Anova testine göre ** p=0,0016 vs rapamisin, *** p=0,002 vs roskovitin).



Şekil 25 Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörlerinin, purvalanol ve roskovitin uygulamasının LNCaP prostat kanseri hücrelerinde hücre içi poliamin düzeylerine etkisinin gösterimi. Kolon grafik 2 farklı kültür ortamından elde edilen 2 tekrarlı örneklerin ortalama±standard hata olarak sunulmaktadır.

3.6. DU 145 AR (-) Prostat Kanseri Hücrelerinde Rapamisin, CDK inhibitörlerinin hücre canlılığında yarattığı etkiyi geri çekmektedir

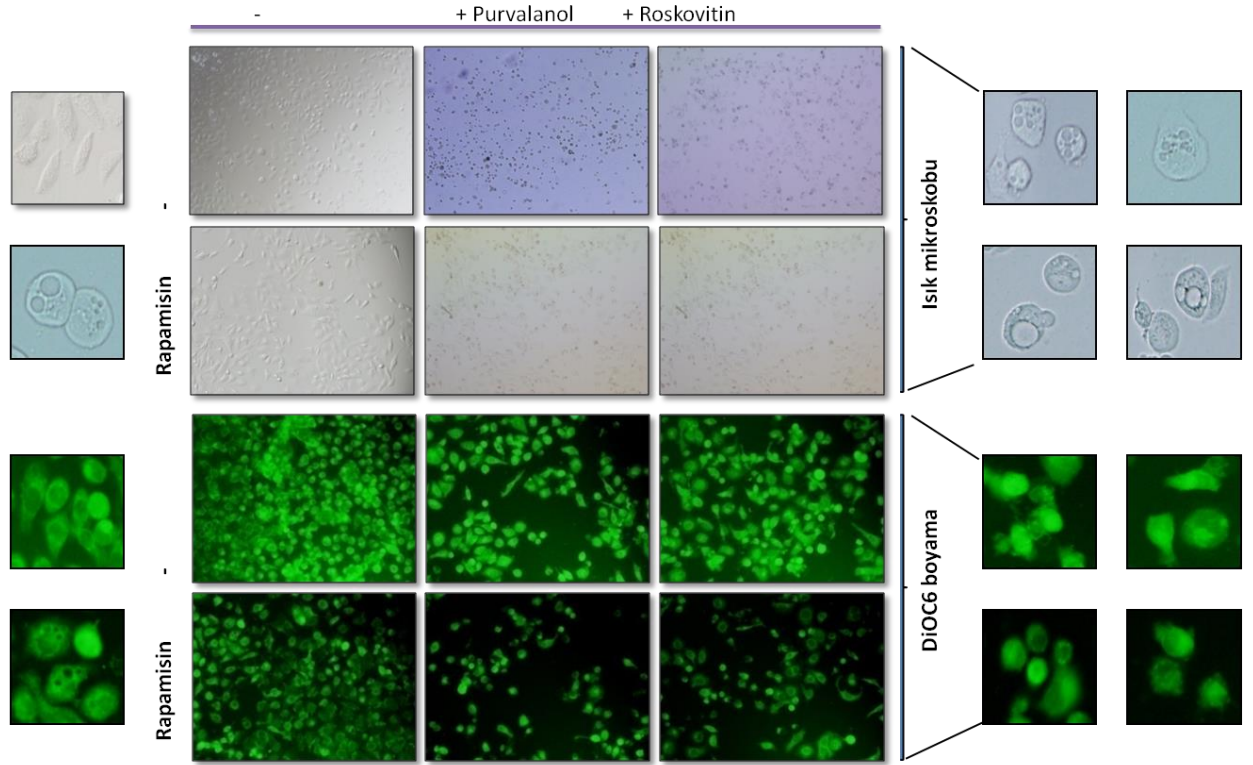
Rapamisin (10 nM) ile CDK inhibitörleri, purvalanol (20 µM) veya roskovitin (30 µM) kombinasyonunun DU 145 AR (-) prostat kanseri hücre canlılığına olan etkisini belirlemek üzere MTT hücre canlılığı testi gerçekleştirildi. Rapamisin tek başına hücre canlılığını anlamlı düzeyde etkilememiştir. Purvalanol ile kombine edildiğinde, purvalanolün hücre canlılığındaki azalmaya olan etkisini geri çekmiştir. Roskovitin ile kombine edildiğinde de benzer sonuçlar görülmüştür (Şekil 26A). Rapamisinin zamana bağlı olarak hücre canlılığında oluşturduğu etkiyi belirlemek üzere tripan mavisi ile hücreler boyanarak haemositometrede sayılmıştır. Tripan mavisi boyaması ile hücrelerde 96 saat boyunca rapamisin varlığında hücre çoğalması kontrol edilmiştir. Tripan mavisi ile boyanan hücreler toplam sayılan hücreden çıkartılarak eksponential büyüme kinetiği eğrisi elde edilmiştir. DU 145 hücreleri uygulama yapılmadan sürekli bölünürken, rapamisin varlığında bölünme indeksi baskılanmıştır (Şekil 26B). Bu veri MTT hücre canlılığından elde edilen verilerle benzer şekilde değerlendirilmiştir. Rapamisin hücre canlılığına ket vurmamakta ama hücrelerin bölünme indekslerini baskılayıcı etki göstermektedir. Rapamisin CDK inhibitörleri beraber uygulandığında, CDK inhibitörlerinin hücre canlılığına ket vurucu etkisini önlemektedir. Rapamisinin terapötik yetkinliğinin sorgulanabilmesi amacı ile apoptotik süreç ile ilgili ilişkisini tartışmak üzere DNA kırıkları Cell Death ELİZA testi ile belirlendi (Şekil 26C). DU 145 prostat kanseri hücrelerinde purvalanol uygulaması yaklaşık 4,5 kat oranında apoptotik hücre ölümü tetiklerken, roskovitin hücre ölümünü yaklaşık 3 kat arttırmıştır. Bu oran hiç uygulama yapılmayan kontrol hücrelerine göre anlamlı bir artış olarak belirlenmiştir. DU 145 prostat kanseri hücrelerinde rapamisin DNA kırıklarını 24 saat uygulama sonrasında tetiklememekle birlikte, CDK inhibitörlerinin apoptotik etkinliğini değiştirmemektedir (ns= p>0,01 İki yönlü ANOVA Bonferroni çoklu karşılaştırma testi). Bu sonuçlar her iki CDK inhibitörünün DU 145 prostat kanseri hücrelerindeki apoptotik süreci farklı noktalarda tetiklediğini düşündürmektedir. Elde edilen bu bulguların doğrulanması amacı ile MMP, DiOC6 boyama ile florometre ölçümleri ve floresan mikroskopunda görüntüleme ile belirlenmiştir (Şekil 26D). Rapamisin MMP kaybını her iki CDKi ile arttırmıştır. Bu sonuçtan yola çıkılarak CDK inhibitörlerinin rapamisin ile kombinasyonu apoptozun intrinsik sinyal yolağı üzerinden hücre ölümüne neden olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 26. Rapamisin, CDK inhibitörlerinin, purvalanol ve roskovitin, apoptotik hücre ölümü mekanizması üzerinde etkisinin modellenmesi. A. DU 145 AR (-) prostat kanseri hücre canlılığı MTT testi ile hücrelerde ilaçların etkisi gözlenmiştir. Anlamlılık testi iki yönlü ANOVA testi ile Bonferroni çoklu karşılaştırma testi uygulanarak elde edilmiştir (p=0,0025 purvalanol vs. purvalanol+rapamisin ;**p=0,0016 roskovitin vs. roskovitin+rapamisin). Kolon grafikte yer alan sonuçlar en az 5 farklı deney setinde yer alan 4 tekrarın ortalaması ve standart sapma olarak sunulmaktadır. B. Tripan mavisi ile boyama yöntemi ile ölü-canlı hücrelerin sayımı ile gerçekleştirildi. Çizgi grafik 3 farklı deney düzeneğinden elde edilen verilerin ortalama ve standart sapması olarak sunulmuştur. C. CDK inhibitörlerinin rapamisin varlığında veya yokluğunda DNA fragmantasyonu üzerine olan etkisi DNA kırıklarının belirlenmesi yolu ile belirlendi. D. Rapamisin ile kombine edilen purvalanol ve roskovitin DU 145 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelinin bozulmasına bağlı olarak, hücre canlılığındaki azalmaya olan etkisi DiOC6 boyama ile en az 3 deney setinde yer alan 4 tekrarlı sonuçların ortalama ve standart sapması olarak yer almaktadır. Sonuçlar florometrede 485 – 538 nm’de ölçülmüştür.**

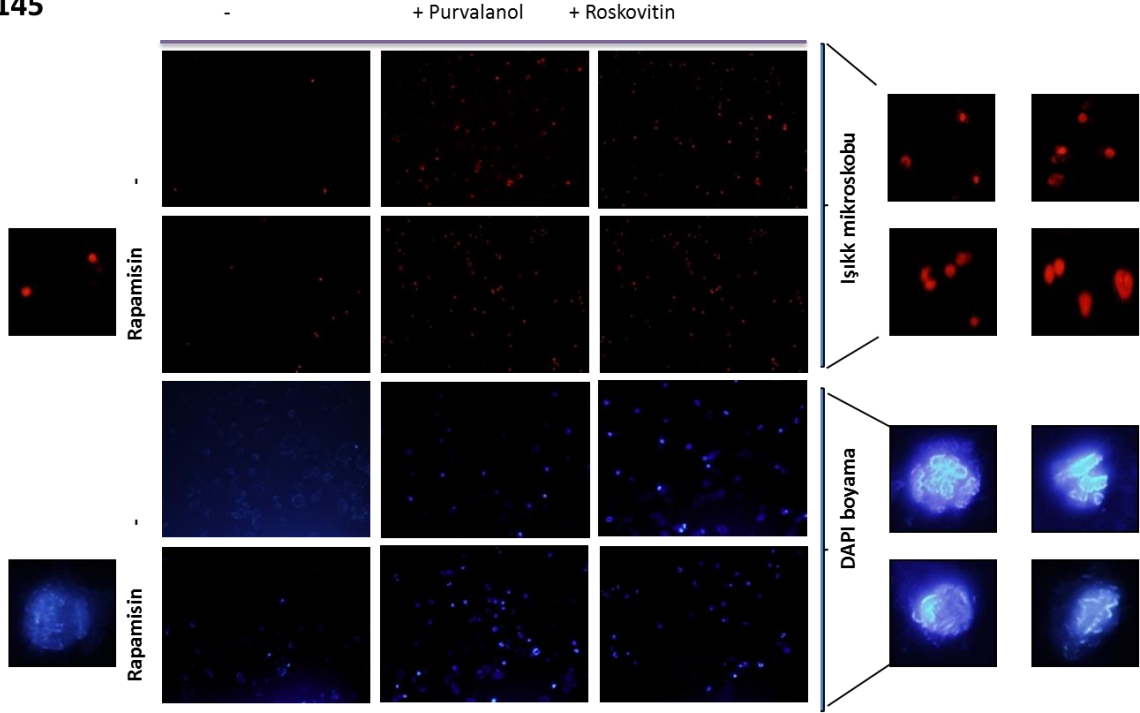
DU 145 prostat kanseri hücrelerinin CDK inhibitörlerinin uygulanması sonucu rapamisin varlığında veya yokluğunda ışık mikroskobu görüntüleri incelenmiştir. Işık mikroskobu gözlemlerinde vakuol yapılarının arttığı gözlenmiştir. Özellikle rapamisin eş uygulamaları sonucu bu yapılarda artma daha da belirgin hale gelmiştir (Şekil 27). MTT hücre canlılığı verileri rapamisin eş uygulaması purvalanol veya roskovitin hücre canlılığındaki azalmaya olan etkisini geri çekmesine rağmen, eş uygulamanın hücre canlılığını yaklaşık % 20 oranında azalttığı gösterilmiştir. Bu verileri doğrulamak üzere, floresan mikroskopi yöntemi ile 4,6 –diamidino-2’-fenilindol (DAPI) ve propidium iyodür (PI)

boyaları ile DU 145 prostat kanseri hücrelerinde boyamaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 28). PI membran bütünlüğü bozulmuş (ölu) hücrelere nüfuz ederek ölu hücrelerin görünür hale gelmesini sağlamaktadır. Purvalanol ve roskovitin uygulaması ölu hücre sayısında artışa neden olmuştur. Rapamisin ile CDK inhibitörlerinin kombinasyonu daha önce yapılan MTT hücre canlılığı analizi sonucunu destekleyecek şekilde saptanmaktadır. Bir nükleik asit boyası olan DAPI hücre nükleusunu belirgin hale getirerek DNA kırıklarının görünür duruma gelmesini sağlamaktadır. Purvalanol ve roskovitin bir geç zamanlı apoptoz belirteci olan DNA kırıklarının oluşuma neden olmaktadır.



Şekil 27. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörlerinin DU 145 prostat kanseri hücrelerinde mitokondriyal membrana potansiyeline olan etkisinin gösterilmesi. CDK inhibitörleri, purvalanol (20 µM), roskovitin (30 µM) rapamycin (10 nM) varlığında veya yokluğunda 24 saat boyunca uygulandı. DiOC6 (4 mM) ile boyanan hücreler floresan mikroskobunda incelendi (x20-x40).

DU145

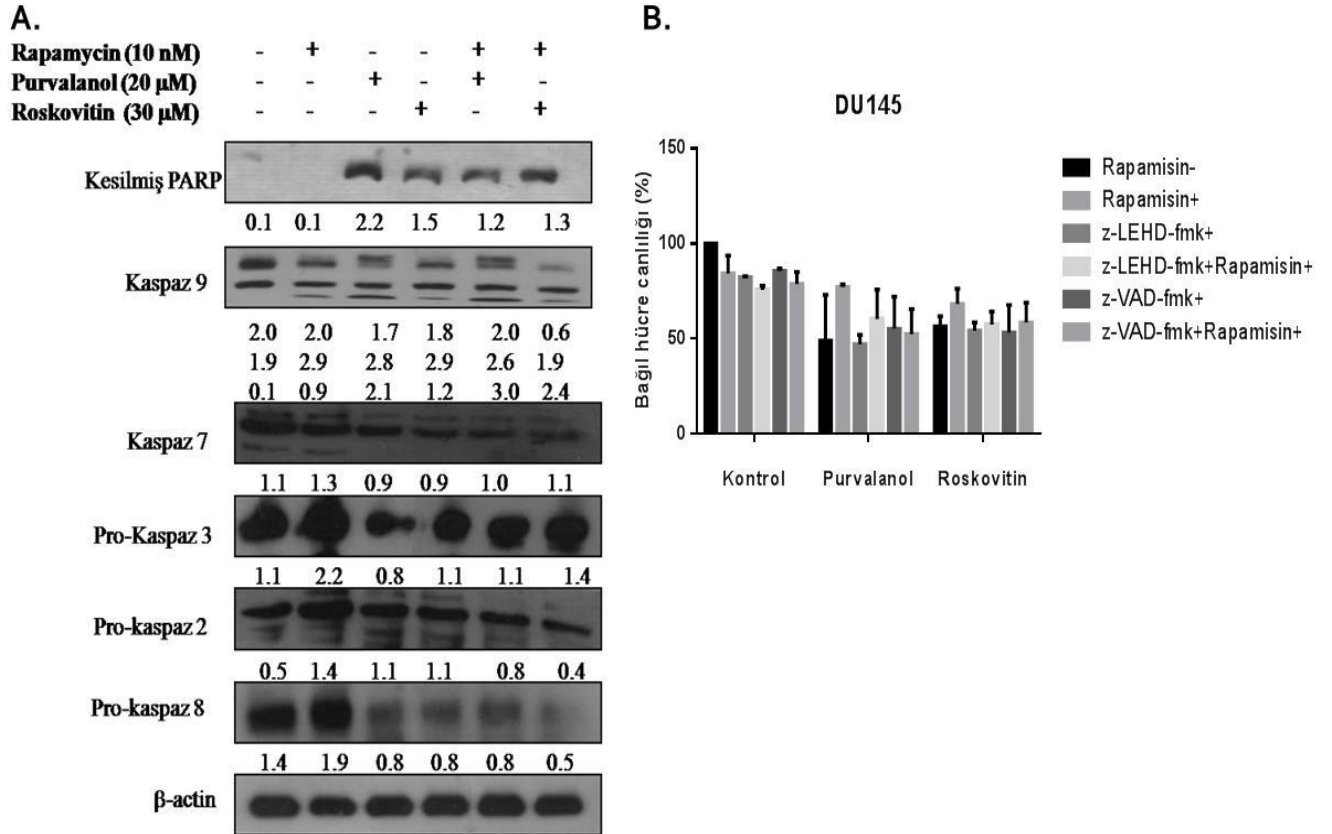


Şekil 28. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörleri ile tetiklenen hücre ölümünün DU 145 prostat kanseri hücrelerinde gösterimi. CDK inhibitörleri, purvalanol (20 µM), roskovitin (30 µM) rapamisin (10 nM) varlığında veya yokluğunda 24 saat boyunca uygulandı. Propidium iyodür (PI) (1 mM) ve DAPI (0,5 mM) ile boyanan hücreler floresan mikroskobunda incelendi (x20-x40).

3.7. Rapamisin Kaspaza Bağımlı Apoptozu İnhibe Etmektedir

Rapamisin ile kombine edilerek uygulanan purvalanol veya roskovitin'in apoptotik etkinliği DU 145 AR (-) prostat kanseri hücrelerinde apoptoza özgü PARP kesilimi, kaspaz 3, kaspaz 7, kaspaz 2 proteinlerinin incelenmesi ile yolu ile irdelenmiştir. Rapamisin tek başına uygulandığında DU 145 hücrelerinde PARP'nin fragmentlerine ayrılmasına neden olmamaktadır. Purvalanol ve roskovitin PARP kesilimini kayda değer bir şekilde arttırmıştır. Ancak rapamisin purvalanol tarafından tetiklenen PARP fragmentlerini indirgerken, roskovitinin etkinliğini arttırmaktadır. Hernekadar Cell Death ELIZA sonuçları, rapamisinin ilaçların apoptotik etkilerini değiştirmedeğini gösterse de, PARP kesimi üzerinde rapamisin purvalanol ve roskovitin kombinasyonu DU 145 prostat kanseri hücre hatlarında apoptoz üzerinde farklı etkiler yaratmıştır. Bunu desteklemek üzere kaspaz 7 ifade düzeyi incelendiğinde her bir CDK inhibitörü tek başına pro-kaspaz 7 ifade düzeyini azaltmıştır. Bu durum kaspaz-7 aktivasyonu olarak kabul edilmiştir. Rapamisin ile CDK inhibitörlerinin

kombinasyonu pro-kaspaz 7 ifade düzeyini azaltmıştır. Rapamisin pro-kaspaz 3 üzerinde belirgin bir değişikliğe yol açmamıştır. Purvalanol pro-kaspaz 3 ifade düzeyini azaltmıştır. Purvalanol DU 145 prostat kanseri hücre hatlarında apoptozu kaspaza bağımlı bir şekilde gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Roskovitin ise pro-kaspaz 3 ifade düzeyini değiştirmemiştir. Rapamisin kombinasyonu her iki CDK inhibitörü için pro-kaspaz 3 düzeyinde belirgin bir değişiklik meydana getirmemiştir. CDK inhibitörlerinin ölüm domeni (DD) yolağını apoptozu tetiklemek üzere seçerek Kaspaz 2 aktivasyonunda belirgin bir değişikliğe neden olmamıştır. Rapamisin pro-kaspaz 2 ifade düzeyini kontrol ile kıyaslandığında arttırmıştır. Rapamisin ile roskovitin eş uygulaması pro-kaspaz 2 ifade düzeyini azaltmıştır (Şekil 29). Bu sonuçlardan yola çıkarak DD yolağının CDK inhibitörlerinin seçilen dozları için primer bir yolak olmadığı anlaşılmıştır.



Şekil 29. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörlerinin kaspaza bağımlı apoptoza etkisi. A. Total protein izolasyonunun ardından 30 µg protein %12' lik SDS-PAGE jel ile ayrıldı ve immunoblotlama yöntemi ile PARP, Kaspaz-2.3.7, protein ifadeleri incelendi. B. Kombine ilaç uygulamasının kaspaza bağımlı yolak üzerindeki etkisini belirlemek üzere, genel kaspaz inhibitörü (Z-VAD) ve kaspaz 9 inhibitörü (z-LEHD-fmk) ilaç uygulamalarından 1 saat önce 10 µM olacak şekilde uygulandı. Kaspaz inhibitörlerinin hücreler üzerindeki etkisi MTT hücre canlılığı analizi ile incelendi.

Her iki CDK inhibitörünün rapamisin ile eş uygulamasıyla DU 145 prostat kanseri hücreleri üzerinde apoptotik mekanizmaları farklı yönde etkiledikleri belirlenmiştir. Bu veriyi desteklemek üzere hücrelere ön uygulama ile (1 saat) pan-kaspaz inhibitörü (z-VAD-FMK) veya kaspaz-9 inhibitörü (z-LEHD-FMK) uygulandı. Ardından ilaçlar tek tek veya kombine olarak uygulandılar. Bu süreçte kaspaz inhibitörlerinin etkisi MTT hücre canlılığı tespiti ile incelendi. Elde edilen sonuçlara göre, kaspaz inhibitörleri uygulandığında ilaçların sitotoksik etkilerinin devam ettiği gösterilmiştir. Purvalanol ile pan-kaspaz inhibitörü ön uygulaması yapılan hücrelerde canlı hücre sayısında artış gözlenmiştir. Purvalanol ve roskovitin hücre canlılığını farklı mekanizmalar üzerinden inhibe etmektedirler (Şekil 29B). Rapamisin her iki CDK inhibitörünün hücre canlılığını baskılayıcı etkisini ortadan kaldırmıştır.

Rapamisin varlığında veya yokluğunda purvalanol veya roskovitin DU 145 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin anlaşılmasına yönelik olarak, pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 protein ailesi üyelerinin ifade düzeyleri incelenmiştir. Rapamisin BimEL ifade düzeyinde belirgin bir etki yaratmamıştır. Bunun tersine, CDK inhibitörleri; purvalanol ve roskovitin BimEL ifade düzeyini anlamlı düzeyde azaltmıştır. Rapamisin kombinasyonu BimEL düzeyinde purvalanol ve roskovitin oluşturduğu etkiyi bir miktar geri çekmiştir. Yine rapamisin ile kombine edilen her bir CDK inhibitörünün DU 145 hücrelerine uygulanması sonucunda Bad ifade düzeyi azalırken, p-Bad artmıştır. Rapamisin ile roskovitin eş uygulaması p-Bad ifade düzeyini PARP ve kaspaz 7 kesilimi ile benzer sonucu vererek arttırmıştır. Mitokondriyal membran permeabilizasyonunda önemli görevi olan Bak ifade düzeyi rapamisin ile kontrol hücrelere oranla artmış, ancak her iki CDK inhibitörü Bak ifade düzeyini belirgin bir şekilde arttırmıştır. Rapamisin ile CDK inhibitörlerinin kombinasyonu Bak ifade düzeyini arttırıcı etki göstermektedir (Şekil 30).

Bax ifade düzeyi purvalanol ve roskovitin uygulaması sonucunda kontrol hücrelere göre kayda değer düzeyde artarken, rapamisin kombinasyonu ile bu etki ortadan kalkmıştır. Bid ifade düzeyinde belirgin bir değişiklik saptanmamıştır. Bak/Bax ile iletişim halinde olduğu bilinen Puma ifadesi her bir CDK inhibitörünün rapamisin kombinasyonu sonucunda tek tek ilaç uygulanmasına göre artış göstermektedir. Bu sonuca benzer şekilde, kaspaz 9 ile etkileşim halinde olan Apaf-1 ifade düzeyi her bir CDK inhibitörü tarafından arttırılmış ve rapamisin eş uygulaması bu etkiyi arttırıcı etkinlik göstermiştir. Puma gibi p53 tarafından transkripsiyonu gerçekleştirilen Noxa ifade düzeyi purvalanol ile artmıştır. Roskovitininin

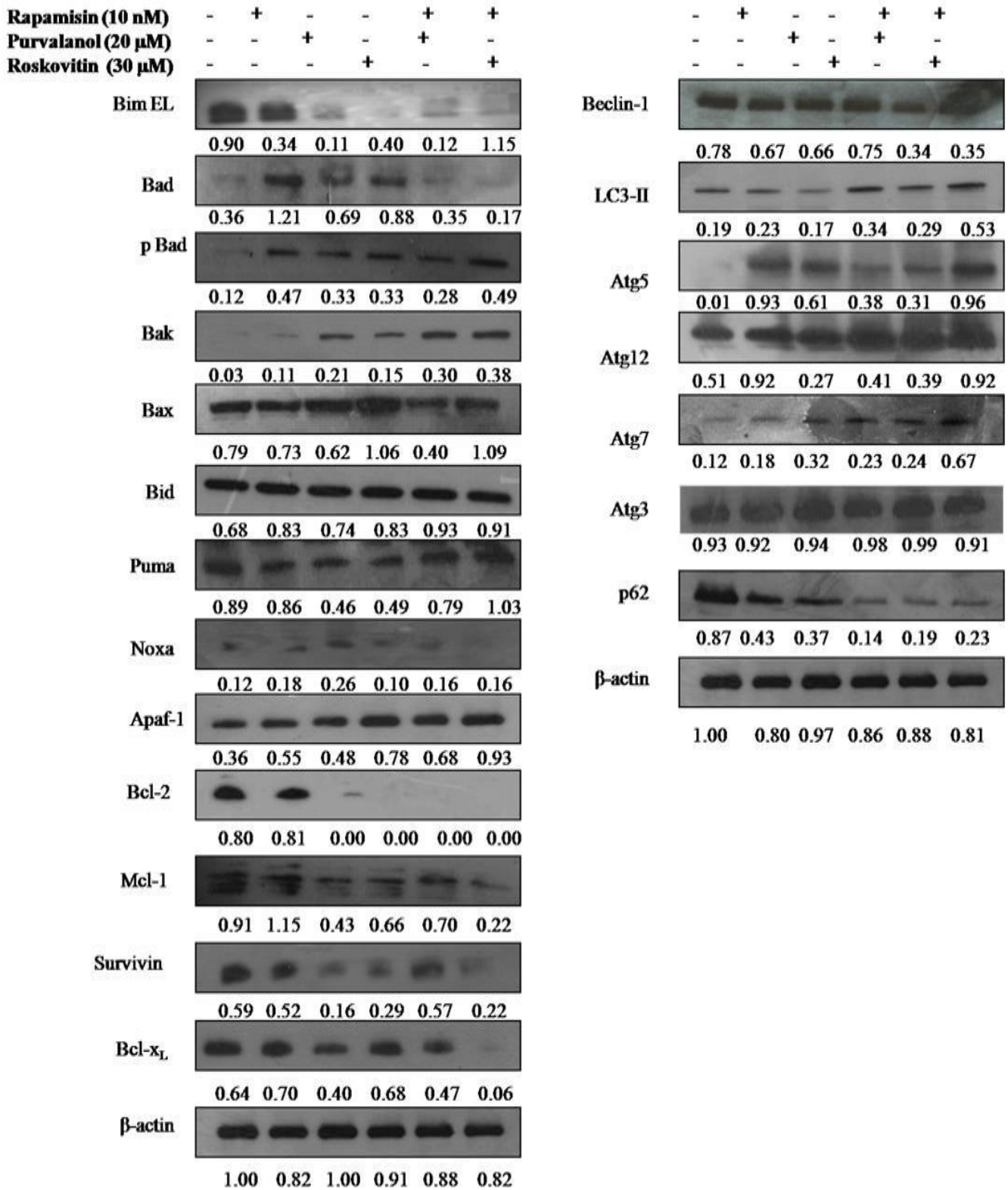
etkisi ise purvalanole göre daha az olarak saptanmıştır. Ancak her iki ilacın etkisi rapamisin kombinasyonu ile azalmıştır. Tüm bu sonuçlardan yola çıkarak, pro-apoptotik proteinlerin ifade düzeyleri incelendiğinde her iki CDK inhibitörünün farklı Bcl-2 ailesi üyeleri ile etkileşime girerek apoptotik karar üzerinde etkili oldukları ileri sürülebilir. Özellikle roskovitin ile rapamisin kombinasyonu, purvalanol ile rapamisin kombinasyonuna göre apoptotik mekanizma üzerinde daha etkili olmaktadır. Ancak Bcl-2 ailesi üyeleri arasındaki dengenin anlaşılabilmesine yönelik olarak ayrıca anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin ifade düzeyi aynı deney düzeneğinde incelenmiştir. Bcl-2 ve Bcl-x_L ifade düzeyleri CDK inhibitörleri tarafından azaltılmış ve rapamisin bu etkiyi arttırmıştır. Ancak CDK inhibitörlerinin Mcl-1 üzerindeki baskılayıcı etkisi rapamisin ile kombine edildiğinde her bir ilaç için farklı etkileşime neden olmuştur. Rapamisin roskovitin ile eş uygulandığında Mcl-1 ifadesini daha fazla azaltmakta ancak purvalanol üzerinde böyle bir etki göstermemektedir. Anti- apoptotik mekanizma ile ilişkili olarak rol alan survivin ifade düzeyi her iki CDK inhibitörü uygulaması sonucunda azalmıştır. Rapamisin eş uygulaması purvalanolün survivin üzerindeki etkisini azaltmıştır. Roskovitin ile rapamisin kombinasyonu survivin ifade düzeyinin daha da azalmasına yol açmıştır (Şekil 30A).

Purvalanol veya roskovitin DU 145 prostat kanseri hücrelerinde apoptotik mekanizma üzerindeki etkinliklerinin daha iyi tartışılabilmesi için doğal bir otofaji indükleyicisi olan rapamisin ile kombine edilen ilaçların otofajik regülasyon üzerindeki rollerinin incelenmesine karar verilmiştir. Bu amaçla, otofajik yapıların oluşmasında görev alan markırların; Beclin-1, LC3I/II, Atg5, Atg12, Atg7, Atg3, p62 ifade düzeyleri immunoblotlama yöntemi ile incelenmiştir. Beclin-1 ifade düzeyi her iki CDK inhibitörleri uygulanması durumunda bir değişiklik göstermemiştir.

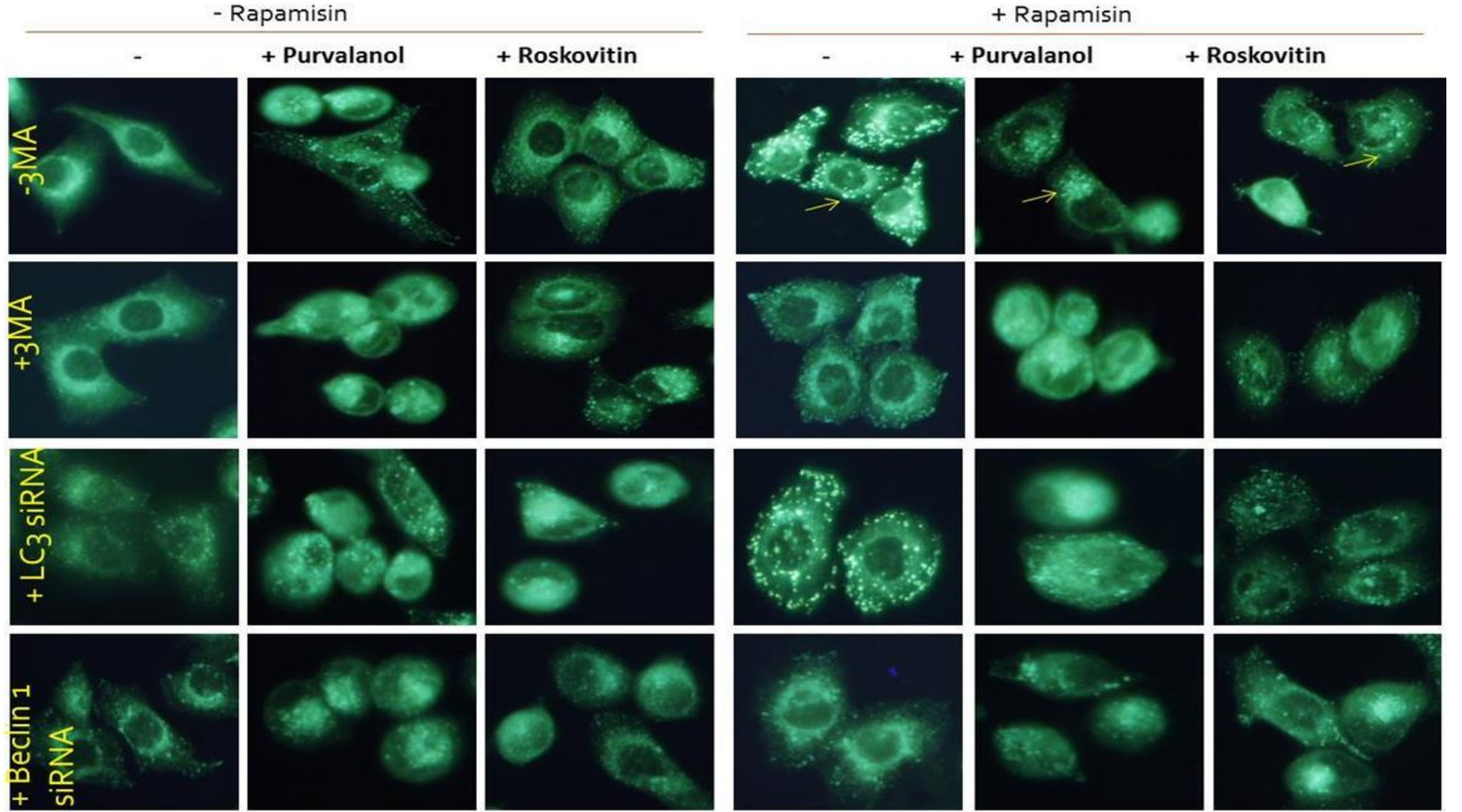
Rapamisin ile eş uygulama sonucunda CDK inhibitörleri Beclin-1 ifade düzeyini azaltmıştır. LC3I kesilimi purvalanol ile azalırken, roskovitin uygulaması ile artmıştır. Her iki CDK inhibitörünün rapamisin ile kombinasyonu LC3I kesilimini arttırmıştır. Otofagozom yapılarının oluşumunda LC3 ile etkileşim içinde olan Atg5 ifade düzeyi rapamisin eş uygulaması ile artmıştır (Şekil 30). Atg5 ifade düzeyi purvalanol ile tetiklenirken roskovitin ile herhangi bir değişikliğe uğramamıştır. Ancak rapamisin kombinasyonu sonucunda CDK inhibitörlerinin Atg5 ifade düzeyini daha da azaltmasına neden olmuştur. Atg12 ifadesi CDK inhibitörleri ile azalmıştır. Rapamisin ile roskovitin kombinasyonu Atg12 ifade düzeyini arttırmıştır. Atg12 ile etkileşim halinde olan Atg7 düzeyi rapamisin kombinasyonu ile artış

göstermiştir. Atg3 ifadesi rapamisin ve purvalanol ile azalmıştır. Roskovitin kontrol ile kıyaslandığında belirgin bir etki yaratmamıştır. Purvalanol ve roskovitin kombinasyonu Atg3 ifadesini kontrol ile kıyaslandığında değiştirmemiştir, fakat roskovitin ile rapamisin eş uygulaması Atg3 ifadesini ortadan kaldırmıştır. p62 ifadesi rapamisin ve purvalanol ile azalmıştır. Roskovitin p62 ifade düzeyini daha belirgin bir şekilde azaltmıştır. Her iki CDK inhibitörü rapamisin ile kombine edildiğinde p62 ifadesini etkili şekilde azaltmıştır. Bu veri ile otofaji indüklendiği zaman p62 seviyesinde azalmaya neden olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 30). Bu nedenle roskovitin'in hem apoptotik hem de otofajik mekanizma üzerinde son derece kuvvetli bir ajan olduğu ortaya çıkmıştır.

Ayrıca rapamisin eş uygulaması sonucunda CDK inhibitörlerinin otofajik markırlar üzerindeki etkisini anlamak üzere monodansil kadaverin (MDC) boyama gerçekleştirilerek otofajik yapılar incelenmiştir. Rapamisin otofajik yapılarda belirgin bir artışa neden olmuştur. Sadece purvalanol veya roskovitin uygulaması DU 145 prostat kanseri hücrelerinde otofajik yapılarda belirgin bir artışa neden olmazken, her iki ilacın rapamisin ile kombinasyonu otofagozom yapılarını arttırmıştır (Şekil 31). Bu veriler daha önce elde edilen ışık mikroskobu morfolojik incelemeleri ile uyumluluk göstermektedir.

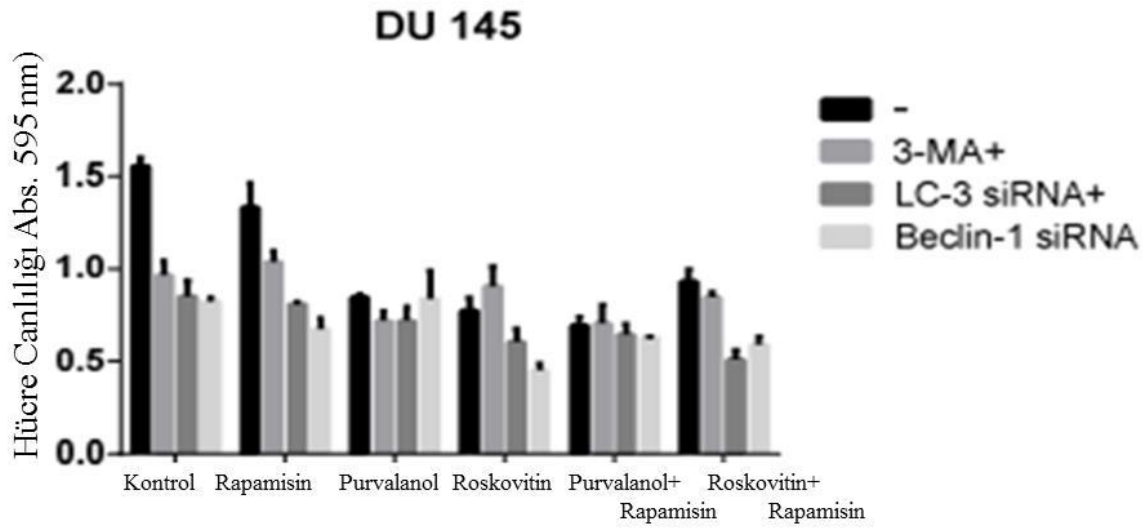


Şekil 30. Rapamisin eş uygulamasının CDK inhibitörlerinin apoptotik ve otofajik markırlar üzerine etkisinin modellenmesi. Total protein izolasyonunun ardından 30 µg protein immunoblotlama yöntemi ile yukarıda gösterilen proteinler için incelenmiştir.



Şekil 31. MDC boyama sonucunda asidik vesiküllerin DU 145 prostat kanseri hücrelerinde gösterimi. Seçilen resimler 400x büyütme ile gösterilmektedir.

DU 145 prostat kanseri hücre hatlarında tüm ajanlar ve tüm otofaji mekanizmasını baskılayan uygulamalar kontrole kıyasla hücre canlılığını azaltmaktadır (***) $p < 0,001$ vs kontrol, her ajan için). DU 145 prostat kanseri hücrelerinde rapamisin CDK inhibitörlerinin apoptotik etkinliği üzerinde herhangi bir arttırıcı etki göstermezken, otofaji yolağının rapamisin tarafından tetiklendiği anlaşılmaktadır (Şekil 31). DU 145 androjen hormonuna duyarsız prostat kanseri hücrelerinde, rapamisin kendi başına uygulandığında otofajik vesikül sayısını arttırmıştır (Şekil 31). Ancak rapamisin CDK inhibitörlerinin her birisi ile birlikte uygulandığında ise, hücre morfolojisinde belirgin bozunmaya neden olmaktadır (yuvarlak ve morfolojik değişim). 3-MA uygulaması kendi başına rapamisin (10 nM) uygulamasının tetiklemiş olduğu vesikül oluşumunu engellemekte olup, benzer etki Beclin-1 siRNA ön uygulaması gerçekleştirilmiş hücrelerde rapamisin uygulaması sonrasında da görülmüştür (Şekil 32).



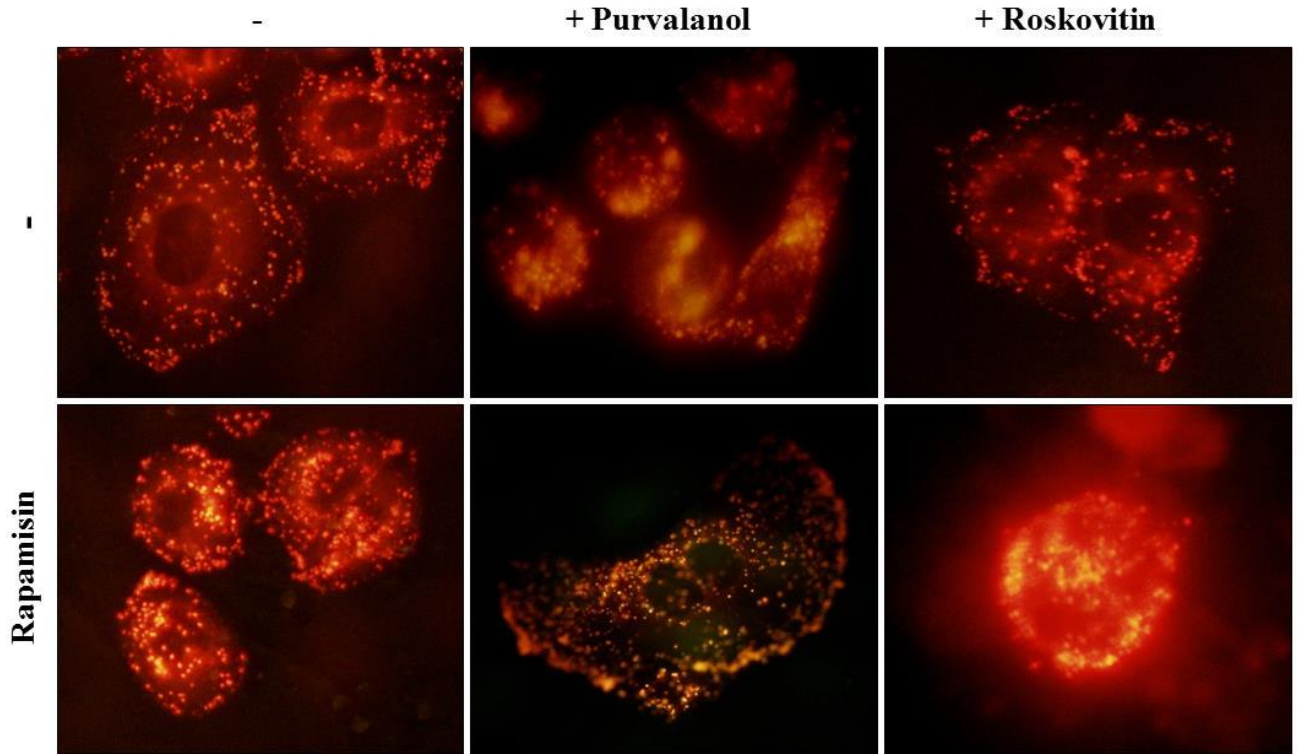
Şekil 32. Androjene duyarsız DU 145 prostat kanseri hücrelerinde 3-MA, LC3 siRNA veya Beclin-1 siRNA uygulaması ile otofaji yolağının baskılandığı durumlarda CDK inhibitörleri ve rapamisinin etkisinin hücre canlılığı verileri ile irdelenmesi. Kolon grafik dört tekrarlı deney sonuçlarının ortalama±standard hata sunumu şeklinde yer almaktadır.

Literatürde rapamisinin LC3-I den LC-3II e dönüşümü tetikleme potansiyeli yüksek bir ajan olduğuna dikkati çekmektedir. Ancak LC3 siRNA ile rapamisin uygulanan hücrelerde vesikül sayısında rapamisine oranla bir değişim saptanmamıştır (Şekil 32). Bu durumda DU 145 hücrelerinde ya LC3 siRNA kayda değer bir etki göstermemiş (siRNA optimizasyonu gerekmekte) ya da rapamisin tarafından tetiklenen otofajik regülasyon açısından LC3den

bağımsız bir otofajik düzenlenme olabileceği düşünülmüştür. LC3 kesiliminin rapamisin ile baskılanan mTOR yolağına bağlı olarak otofajik yolaktaki rolü ileride yeniden zamana bağlı rapamisin uygulaması ile irdelenmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Rapamisine benzer şekilde CDK inhibitörleri, purvalanol veya roskovitine uygulanan DU 145 prostat kanseri hücrelerinde de vesiküller gözlenmiş ve 3-MA veya Beclin-1 siRNA uygulaması ile hücrelerde vesikül sayısında azalma, hücre morfolojisinde bozunma saptanmıştır. Bu nedenle her iki CDK inhibitörün hem apoptotik hem de otofajik yönde etki gösterebileceği sonucuna varılmıştır. Bu noktada LC3 siRNA kendi başına uygulandığında herhangi bir hücre morfolojisinde değişikliğe neden olmamakla birlikte, MDC boyama ile CDK inhibitörleri tarafından tetiklenen vesikül oluşumu LC3 siRNA ile indirgenmemiştir, ancak bu durumun tersine hücre morfoloji bozunmuştur.

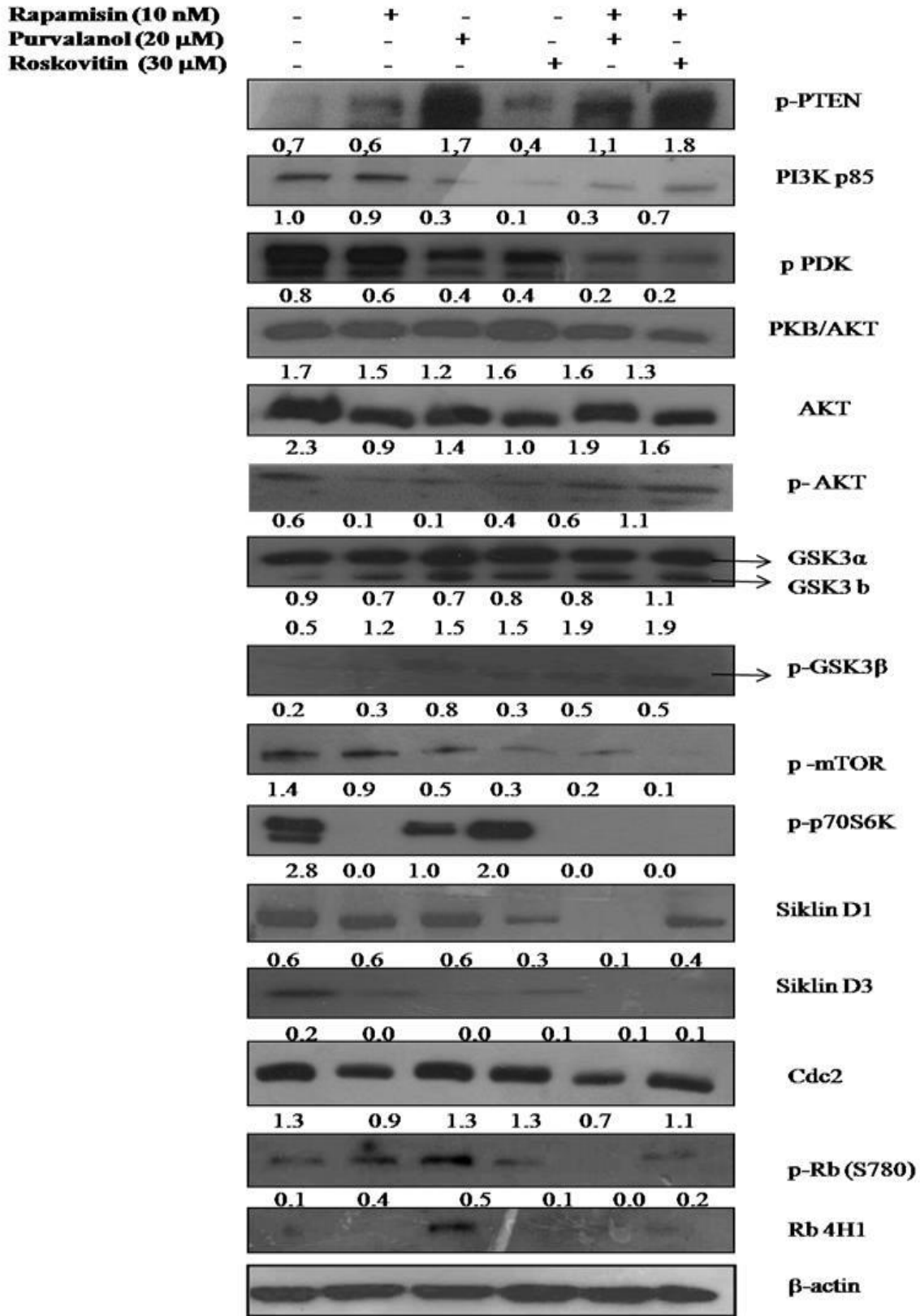
Otofajik düzenlenmenin son evresi olan otofajik vesiküllerin lizozomlar ile birleşerek otolizozomları oluşturma evresi olduğu için hücre içi toplam lizozom etkinliğinin artmasına yönelik olarak lysotracker kırmızısı ile boyama gerçekleştirilmiştir. Şekil 7’de görüldüğü üzere aktif lizozomlar kırmızı renkte görülmektedir. DU 145 hücrelerine rapamisin, purvalanol veya roskovitin uygulanması sonucunda aktif lizozomlar gösterilmiştir. Rapamisin ile purvalanol eş uygulaması sonucunda yeşil renkli vesiküllerde artış görülmüştür. Rapamisin ile roskovitin kombinasyonu kırmızı lizozomal vesiküllerde artışa neden olmuştur (Şekil 33).



Şekil 33. CDK inhibitörleri ile kombine edilen rapamisinin DU 145 AR (-) prostat kanseri hücrelerinde asidik vakuol oluşumuna etkisi. 1×10^4 hücre/kuyu lamel üzerine ekildi. CDK inhibitörleri, purvalanol (20 μ M), roskovitin (30 μ M) rapamisin (10 nM) varlığında veya yokluğunda 24 saat boyunca uygulandı. Lysotracker kırmızısı (1 mM) ile 30 dk inkübe edildi. Floresan mikroskopunda 100x ile görüntülendi.

3.8. Rapamisin İle Kombine Edilen CDK İnhibitörlerinin Apoptotik/Otofajik Mekanizma Üzerine Etkisinin İrdelenmesi Amacı İle PI3K/Akt Sinyal Yolağının İncelenmesi

Rapamisin ile CDK inhibitörlerinin PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağına etkisini belirlemek üzere immunoblot yöntemi ile PTEN, PI3K p85, Akt, p-Akt, Gsk3, p-Gsk3 β , p-mTOR, p-p70S6K, Siklin D1, Cdc2, p-Rb (S780), Rb4H1 ifade düzeyleri incelendi. PTEN(+/+) olan DU145 hücrelerinde PTEN fosforilasyonu purvalanol tarafından kayda değer şekilde artmıştır, fakat aynı etki roskovitin ile oluşmamıştır. PTEN fosforilasyon düzeyi her iki CDK inhibitörü ve rapamisin kombinasyonu ile etkili şekilde artış göstermiştir. Her iki CDK inhibitörü DU 145 prostat kanseri hücrelerinde PI3K p85 ifadesini azaltmıştır. Rapamisin tek başına PI3K p85 ifadesini değiştirmezken, CDK inhibitörleri ile kombine edildiğinde PI3K p85 ifadesinde CDK inhibitörlerinin etkisine ket vurmuştur. Benzer şekilde Akt ifade düzeyi rapamisin, purvalanol veya roskovitin uygulaması sonucunda azalmıştır. Rapamisin eş uygulaması CDK inhibitörlerinin etkisini değiştirmemiştir. CDK inhibitörleri p-Akt düzeyini baskılamış; fakat rapamisin kombinasyonu ile p-Akt düzeyi artış göstermiştir.



Şekil 34. Rapamisin ile CDK inhibitörleri kombinasyonu PI3K/AKT/mTOR sinyal iletiminde yer alan protein ekspresyon düzeylerini etkilemektedir. Total protein izolasyonunun ardından 30 µg protein % 12 lik SDS-PAGE jel ile ayrıldı ve immunoblotlama yöntemi ile PTEN, PI3K p85, Akt, p-Akt, GSK3, p-GSK3β, p-mTOR (S2448), p-p70S6K (T389), Siklin D1, Cdc2, p-Rb (780), Rb4H1 protein ekspresyon seviyeleri incelendi. β-aktin yükleme kontrolü amacıyla kullanıldı.

Akt alt sinyal yolağında yer alan ve PTEN'nin fosforilasyonu düzenleyerek hücre sağkalım yolaklarında önemli görevi olan GSK3 β düzeyi purvalanol ve roskovitin ile artış gösterirken, rapamisin kombinasyonu bu etkiyi arttırmıştır. Hücrede enerji metabolizması, protein sentezi gibi önemli rolleri olan mTOR ifade düzeyi rapamisin ile baskılanmıştır. CDK inhibitörlerinin de p-mTOR ifadesini baskılaması, hücre çoğalmasının engellenmesinde enerji metabolizmasını baskılanması gerektiğini düşündürmüştür.

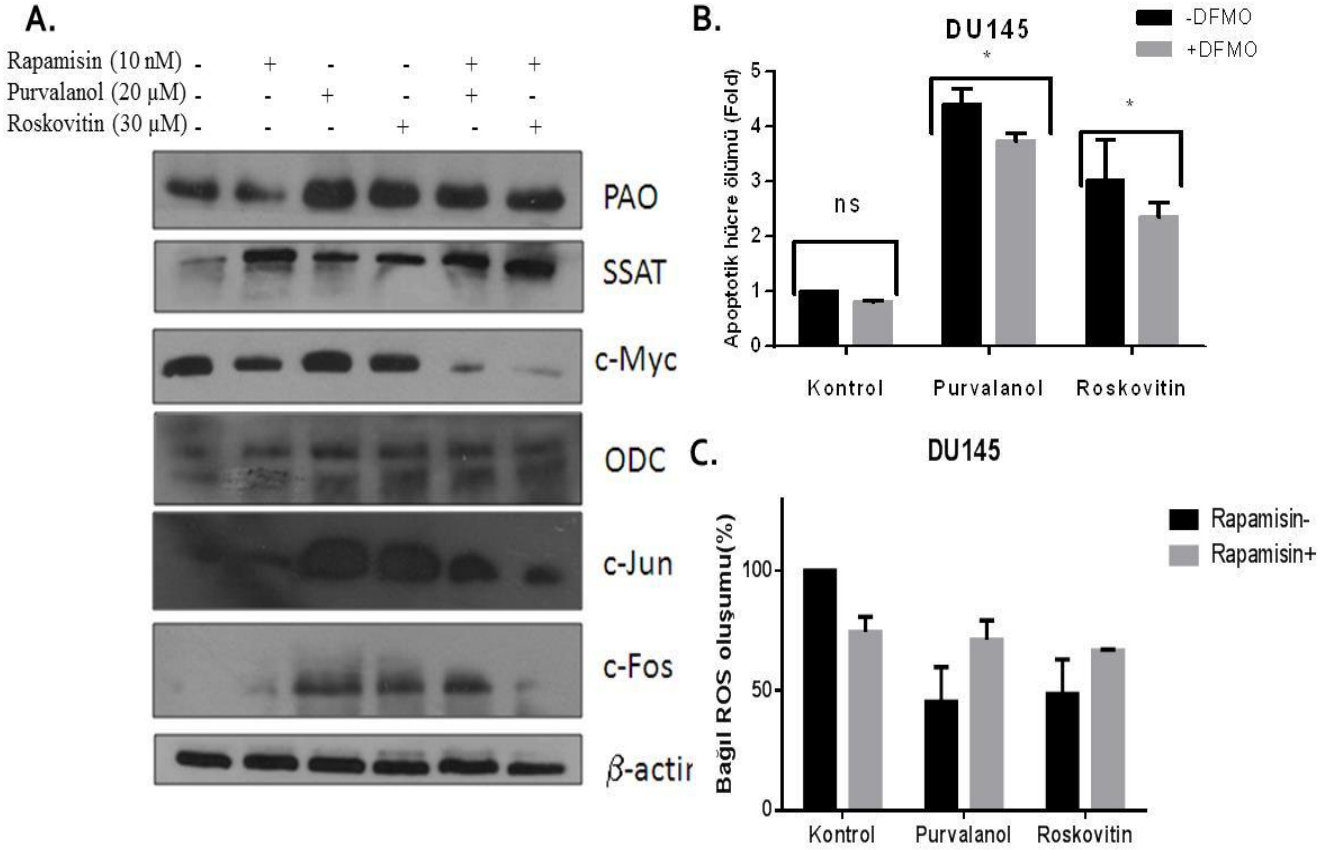
Rapamisin ile eş uygulama her iki CDK inhibitörünün mTOR fosforilasyonunda artışa neden olmuştur. mTOR proteinin alt sinyal yolağında hücre çoğalması ile ilgili proteinlerin sentezinde görev alan p70S6K ifadesi rapamisin varlığında tamamen baskılanmıştır. Bu durumda mTOR'un alt yolaklarının rapamisin varlığında baskılandığı ve uygulanan 10 nM rapamisin dozunun hücrelerde istenilen etkinin modellenmesi için yeterli olduğu görüşüne varılmıştır. Hücre siklusunun devamı için önemli bir rolü olan Siklin D1 ifadesi rapamisin varlığında tamamen azalmıştır. Her iki CDK inhibitörü Cdc2 ifadesini etkilememiştir, rapamisin varlığında ise Cdc2 ifadesi azalmıştır. Rapamisin varlığında, p-Rb S780 ifadesi Siklin D1 ile uyumlu olarak azalmıştır. Purvalanol kontrole oranla p-Rb S780 ifadesini arttırmıştır. Benzer etkiler Rb4H1 ifadesinde de gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre rapamisin ile birlikte uygulanan CDK inhibitörlerinin PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağına etki ederek hücre siklusunu baskıladığı düşünülmektedir (Şekil 34).

3.9. Rapamisin CDK İnhibitörlerinin Poliamin Katabolizmasına Olan Etkisini Geri Çekmektedir

Poliaminler hücre proliferasyonunda önemli rolleri olan küçük alifatik polikasyonlardır. Poliaminlerin hücrelerde çok miktarda bulunması, bozulan biyosentez yolağı, iyi çalışmayan katabolik mekanizma, hücre membranında alma/atma pompalarında düzensizlikle birlikte kanser progresyonu ve gelişiminde etkili olmaktadır. Özellikle prostat hücreleri diğer hücrelere oranla en fazla poliamin içeriğine sahiptirler. Bu nedenlerle poliaminler kanser terapisinde önemli hedef haline gelmişlerdir. CDK inhibitörleri poliamin katabolizmasında görev alan PAO protein ifadesini arttırmaktadır. Rapamisin kombinasyonu CDK inhibitörlerinin PAO üzerindeki etkisini değiştirmemiştir. Ancak SSAT protein ifadesi rapamisin varlığında CDK inhibitörleri tarafından arttırılmıştır. Poliamin birincil biyosentez enzimi ODC ifadesi ilaç uygulamaları ile artmıştır (Şekil 35).

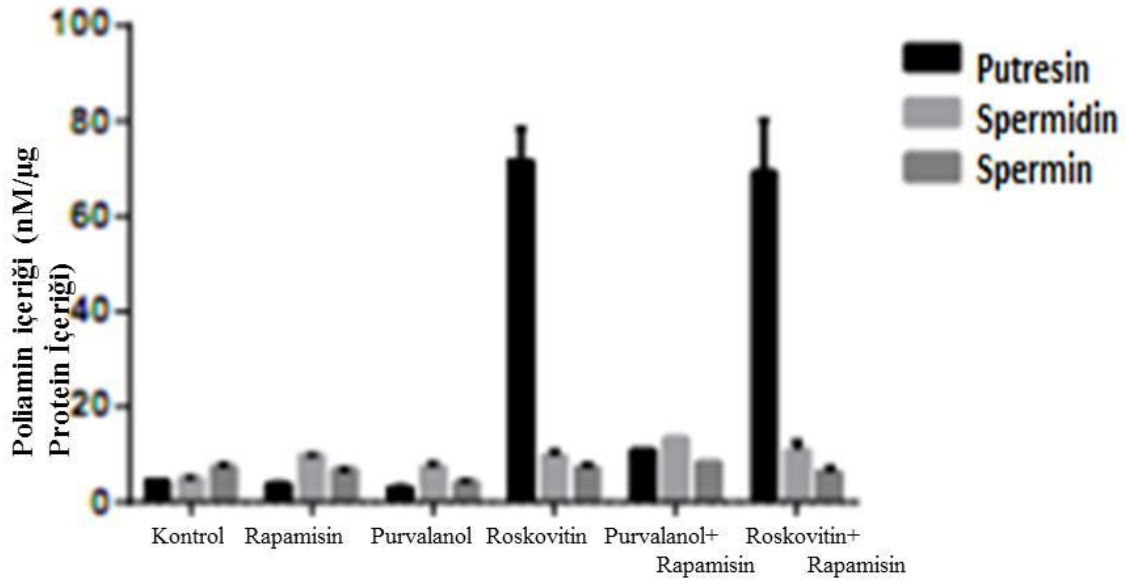
Ancak rapamisin eş uygulaması sonucunda CDK inhibitörleri tarafından c-myc ifade düzeyi azaltılmıştır. ODC nin önemli bir transkripsiyon faktörü olan c-myc yoksunluğunda

ODC düzeyinin değişmemesi yine yıkımı ile ilgili bir koruma mekanizmasını düşündürmektedir. Bu nedenle AZ ve AZI sonuçları önem arz etmektedir. c-myc sinyal yolağındaki azalma ayrıca c-jun ve c-fos ifade düzeyleri ile uyumlu olarak görülmüştür. CDK inhibitörleri hernekadar c-myc, c-jun ve c-fos üzerinde arttırıcı etki gösterebilirler de, rapamisin bu yolağın baskılanmasına neden olmaktadır. Ayrıca DFMO, ODC'nin özgül inhibitörü olup hücrelerde 96 saat uygulandıktan sonra etki göstermektedir. DFMO varlığında CDK inhibitörleri tarafından tetiklenen apoptoz oranı azalmıştır. Bu noktada hücre içi poliamin içeriklerinin hücre ölümü ile ilişkili olarak PAO enzim aktivitesi için belirleyici olduğu sonucuna varılmıştır. PAO artışı hücrelerde H₂O₂'nin artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle hücrelerde ROS belirlenmesine yönelik olarak DCFDH-DA ile boyama yapılmıştır. Rapamisin, ROS oluşumunu azaltmasına rağmen, her iki CDK inhibitörünün meydana getirdiği ROS miktarında artışa neden olmaktadır (Şekil 35). Bu nedenle oluşan ROS'ların güçlü bir otofajik ajan varlığında (rapamisin) CDK inhibitörleri tarafından tetiklenen otofaji ve apoptoz geçiş/denge sürecini etkilediği düşünülmektedir.



Şekil 35. Rapamisin ile CDK inhibitörleri kombinasyonu hücre içi poliamin miktarlarının düzenlenme mekanizması üzerinde etkili olmaktadır. Total protein izolasyonunun ardından 30 µg protein SDS-PAGE jel ile ayrıldı ve immunoblotlama yöntemi ile PAO, SSAT, c-Myc, ODC, c-Jun, c-Fos proteinlerinin ifade düzeyleri incelendi. B, 96 saat DFMO uygulamasının ardından 24 saatlik purvalanol ve roskovitin uygulamasının DNA fragmentasyonu üzerine olan etkisi Cell Death ELIZA yöntemi ile belirlendi. C, Kombine ilaç uygulamalarından sonra hücre metabolizmasındaki reaktif oksijen türlerindeki (ROS) değişimi, DCFDH-DA (1 mM) floresan boyama ardından florometre (485-538 nm) ile ölçüldü.

DU 145 prostat kanseri hücrelerinde elde edilen poliamin düzeyleri ele alındığında, sadece roskovitin uygulaması putresin seviyesinde artışa neden olmaktadır (Şekil 36. *** $p < 0,001$ vs kontrol, Bonferroni's ANOVA2-way test). Bu etki rapamisin varlığında da devam etmektedir (*** $p < 0,001$, rapamisin+roskovitin vs rapamisin, ns: rapamisin+roskovitin vs roskovitin). Spermidin ve spermin düzeylerinde benzer veriler elde edilmemiştir. Purvalanol veya rapamisin veya iki ajanın kombinasyonu poliamin içeriğinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamaktadır (Şekil 36).



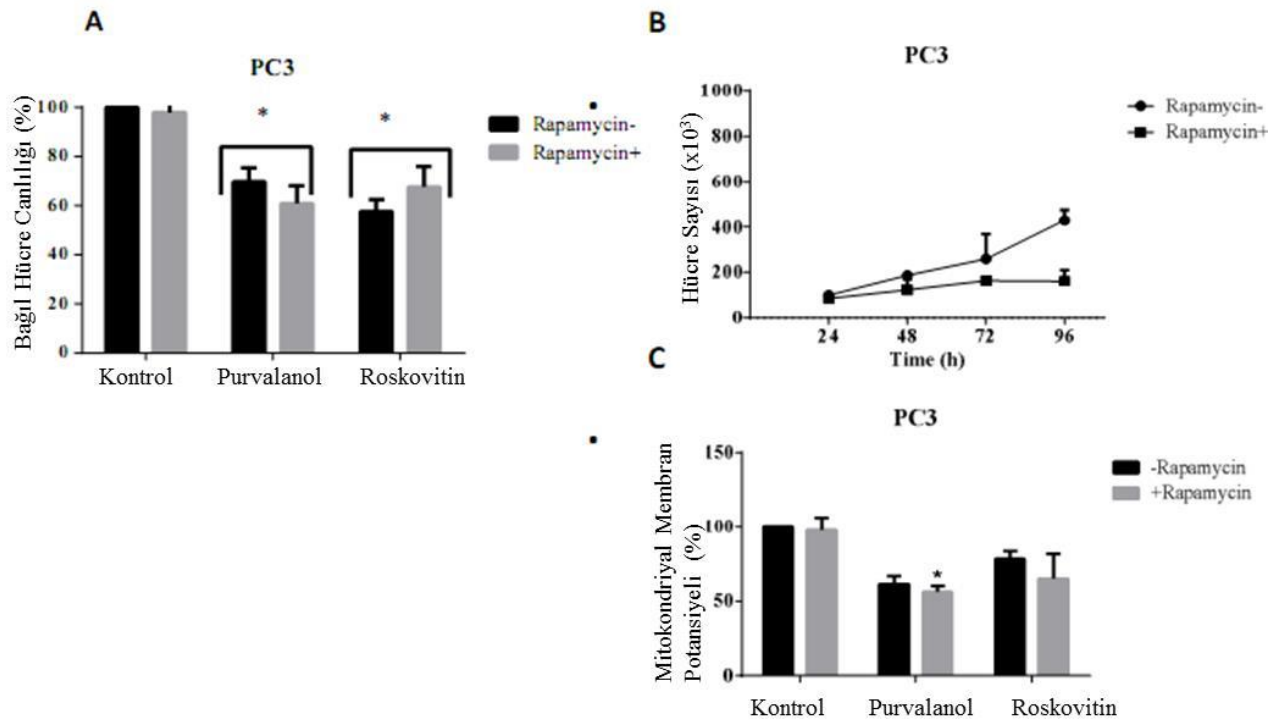
Şekil 36. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörlerinin, purvalanol ve roskovitin uygulamasının DU 145 prostat kanseri hücrelerinde hücre poliamin düzeylerine etkisinin gösterimi. Kolon grafik 2 farklı kültür ortamından elde edilen 2 tekrarlı örneklerin ortalama±standard hata olarak sunulmaktadır.

3.10. Androjene duyarsız PC3 Prostat Kanseri Hücrelerinde CDK İnhibitörlerinin Terapötik Etkisinin Araştırılması

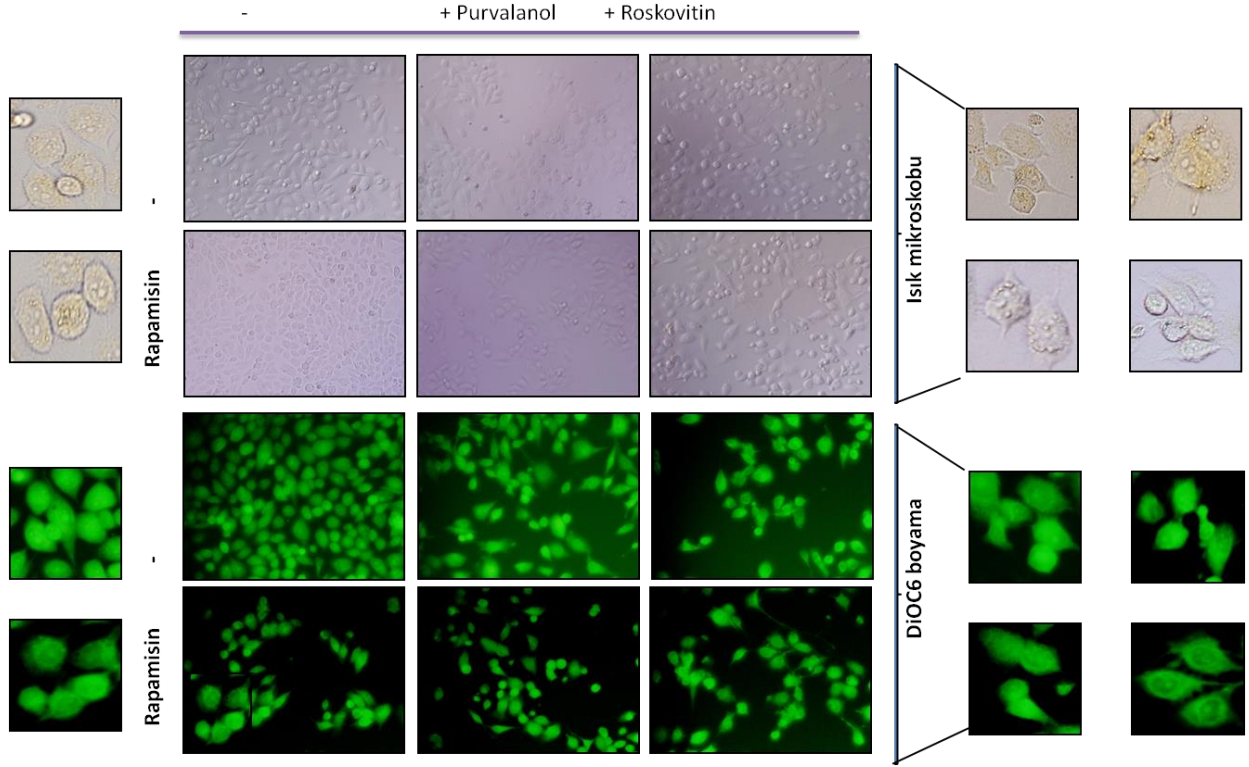
Rapamisin PC3 AR (-) prostat kanseri hücre canlılığında kontrol hücelere oranla belirgin bir etki göstermemiştir. Purvalanol ile kombine edildiğinde, purvalanolün tek başına yarattığı etkiyi artırarak hücre canlılığını yaklaşık % 40 oranında azaltmıştır. Roskovitin ile kombine edildiğinde ise hücre canlılığını yaklaşık % 35 oranında azaltarak, roskovitin tek başına hücre canlılığına olan etkisini bir miktar geri çekmiştir (Şekil 37A). Rapamisin hücreler üzerindeki etkisini anlamak üzere sağkalım analizi gerçekleştirilmiştir. Rapamisin hücrelerin bölünme indekslerine ket vurmakta ancak sitotoksik bir etkiye neden olmamaktadır (Şekil 37B). Rapamisin kombinasyonunun hücre canlılığında yarattığı etkinin MMP kaybı ile ilişkisi, DiOC6 boyama ile floresan mikroskopu ve florometre ölçümü ile belirlendi. Purvalanol ve roskovitin MMP kaybını sırasıyla % 40 ve % 20 oranında arttırmıştır. Rapamisin tek başına MMP kaybına neden olmazken her iki CDK inhibitörü ile kombinasyonu MMP kaybında artışı ortaya koymuştur (Şekil 37C).

Işık mikroskopu görüntüleri incelendiğinde, purvalanol uygulaması ile hücre yapısı küçülmüştür, roskovitin uygulaması ile bu etkiye ek olarak hücrede vakuol yapılarının arttığı gözlenmiştir. Rapamisin ile CDK inhibitörlerinin kombinasyonu ile vakuolizasyon artmıştır (Şekil 38). Hücre ölümünün daha iyi anlaşılabilmesi amacı ile PC3 prostat kanseri hücreleri

DAPI ve PI boyaarı ile boyanarak floresan mikroskobu ile görüntüledi. PI membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücelere nüfuz ederek ölü hücelerin görünür hale gelmesini sağlamaktadır. Sadece purvalanol ve roskovitin uygulaması ölü hücre sayısında artışa neden olmuştur. Rapamisin ile CDK inhibitörlerinin kombinasyonu daha önce yapılan MTT hücre canlılığı analizi sonucunu destekleyecek şekilde çıkmıştır. Bir nükleik asit boyası olan DAPI hücre nükleusunu belirgin hale getirerek DNA kırıklarının görünür hale gelmesini sağlamaktadır. Rapamisin DNA kırıklarında belirgin bir artışa neden olmazken, purvalanol ve roskovitin uygulamaları sonucu, bir geç zamanlı apoptoz belirteci olan DNA kırıklarını görünür hale getirmiştir. Rapamisin kombinasyonu ile DNA kırıkları gözlenmiştir (Şekil 39).



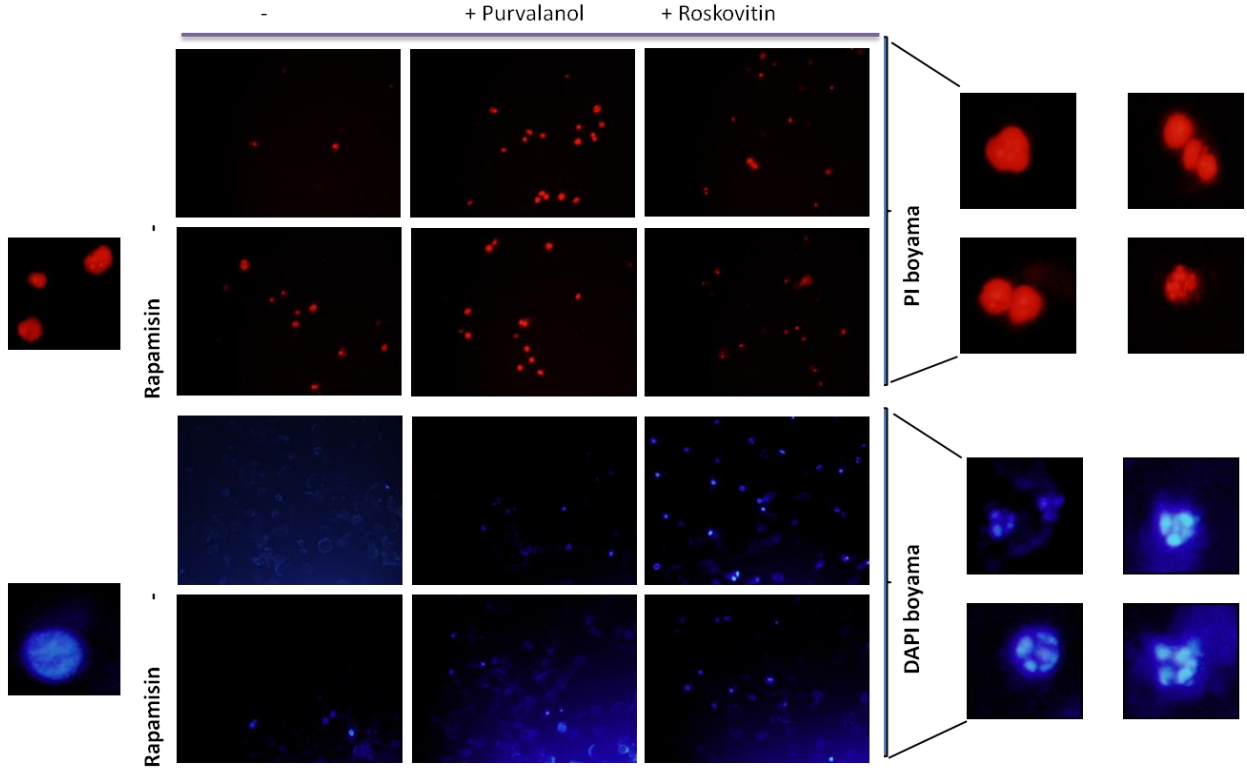
Şekil 37. Rapamisin, CDK inhibitörlerinin, purvalanol ve roskovitin, apoptotik hücre ölümü mekanizması üzerinde etkisinin modellenmesi. A MTT hücre canlılığı testi ile hücrelerde ilaçların etkisi gözlenmiştir. Anlamlılık testi iki yönlü ANOVA testi ile Bonferroni çoklu karşılaştırma testi uygulanarak elde edilmiştir (purvalanol vs purvalanol+rapamisin *p=0,0252; roskovitin vs roskovitin+rapamisin *p=0,0116). Kolon grafikte yer alan sonuçlar en az 5 farklı deney setinde yer alan 4 tekrarın ortalaması ve standart sapma olarak sunulmaktadır. B. Tripan mavisi ile ölü hücelere toplam hücre sayısından çıkartılarak sağ kalım grafiği her 24 saatte bir alınan sonuçlar ile birlikte 96 saat süresi için çizilmiştir. Her bir deney sonucu en az iki deney setinde yer alan 2 tekrarın ortalaması ve standart sapması olarak ifade edilmektedir. C. DiOC6 boyama ile en az 3 deney setinde yer alan 4 tekrarın ortalaması ve standart sapması olarak sunulmaktadır. Sonuçlar florometre 485 – 538 nm’de ölçülmüştür.



Şekil 38. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörlerinin PC3 prostat kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyeline olan etkisinin gösterilmesi. CDK inhibitörleri, purvalanol (20 µM), roskovitin (30 µM) rapamisin (10 nM) varlığında veya yokluğunda 24 saat boyunca uygulandı. DiOC6 (4 mM) ile boyanan hücreler floresan mikroskopunda incelendi (x20-x40)

3.11. Rapamisinin CDK inhibitörleri ile kombinasyonu PC3 hücrelerinde kaspaza bağımlı hücre ölümüne etkisinin gösterimi

Rapamisinin kaspaz yolağı ile ilişkili olarak CDK inhibitörleri ile kombine edildiği zaman PC3 hücreleri üzerindeki etkileri belirlemek üzere immunoblotlama yöntemi ile kesilmiş PARP, kesilmiş kaspaz 7, kaspaz 3, kaspaz 2 ve kesilmiş kaspaz 8 ifade düzeyleri incelendi (Şekil 40). Rapamisin kesilmiş PARP ve kesilmiş kaspaz 7 ifadesini artırırken, kaspaz 3 ifadesinde belirgin bir değişikliğe neden olmamıştır. Purvalanol ve roskovitin kesilmiş PARP, kesilmiş kaspaz 7 ifadesini arttırmakla birlikte, pro-kaspaz 3 ifadesini azaltması apoptotik hücre ölümünü arttırmıştır. Purvalanol ve roskovitin pro-kaspaz 2 ve kesilmiş kaspaz 8 ifadesinde belirgin bir değişiklik yaratmamıştır. Bu sonuç purvalanol ve roskovitin PC3 prostat kanseri hücrelerinde ölüm domeni yolağında etkili olmadığı sonucunu ortaya koymaktadır. Rapamisin ile purvalanol kombinasyonu, kontrol ile kıyaslandığında kesilmiş PARP ve kesilmiş kaspaz 7 ifadesini arttırmıştır; fakat purvalanolün tek başına yarattığı etki rapamisin kombinasyonu ile geri çekilmiştir.



Şekil 39. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörleri ile tetiklenen hücre ölümünün PC3 prostat kanseri hücrelerinde gösterimi. CDK inhibitörleri, purvalanol (20 μ M), roskovitin (30 μ M) rapamisin (10 nM) varlığında veya yokluğunda 24 saat boyunca uygulandı. Propidium iyodür (PI) (1 mM) ve DAPI (0,5 mM) ile boyanan hücreler floresan mikroskobunda incelendi (x20-x40).

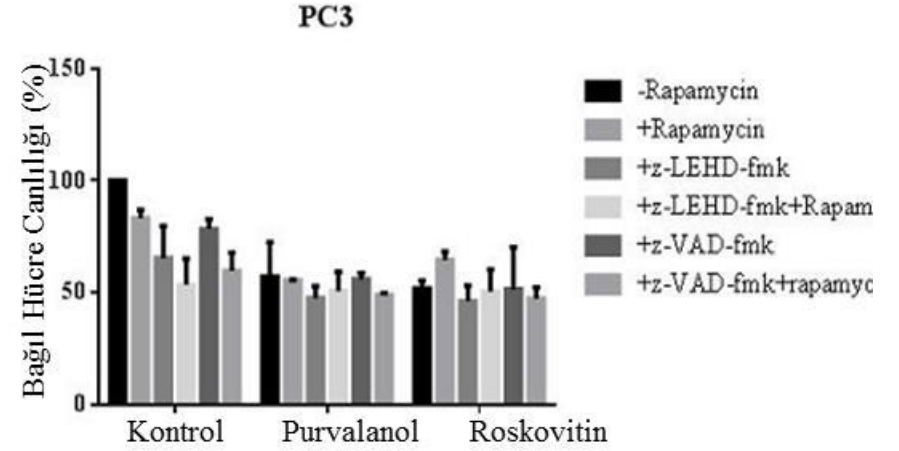
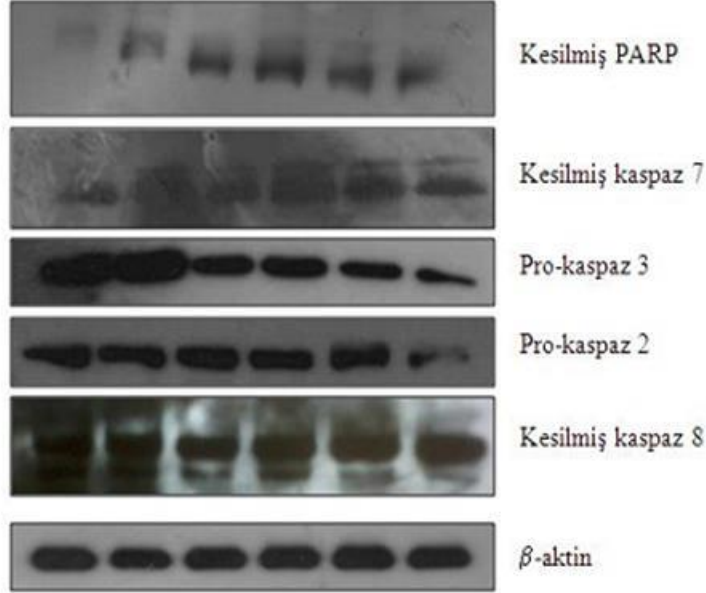
Rapamisin ile purvalanol eş uygulaması pro-kaspaz 3 ifadesini azaltmıştır, pro-kaspaz 2 ifadesini değiştirmemiştir. Kesilmiş kaspaz 8 ifadesi ise artmıştır. Rapamisin kombinasyonunun hücrede farklı ölüm yollarına etki ettiği düşünülmektedir. Roskovitin ile rapamisin kombinasyonu kesilmiş PARP ve kesilmiş kaspaz 7 ifadesini azaltmıştır. Pro-kaspaz 3 ve pro-kaspaz 2 ifadeleri azalırken, kesilmiş kaspaz 8 ifadesinin artması roskovitin ile rapamisin eş uygulamasının hücrede tüm kaspaz yollarına etki ettiğini düşündürmektedir (Şekil 40A). Rapamisinin her bir CDK inhibitörü ile kaspaza bağlı apoptotik hücre ölümünde farklı cevaplar yaratması her iki ilacın hücre ölümünü farklı yollar üzerinden tetiklediğini göstermektedir. Bu veriyi doğrulamak üzere, hücrelere ön uygulama ile (1 saat) z-VAD-FMK veya z-LEHD-FMK uygulandı. Ardından ilaçlar tek tek veya kombine olarak uygulandılar. Bu süreçte kaspaz inhibitörlerinin etkisi MTT hücre canlılığı testi ile incelendi. Elde edilen sonuçlara göre, kaspaz inhibitörleri uygulandığında ilaçların sitotoksik etkilerinin devam ettiği gösterilmiştir (Şekil 40 B).

MTT hücre canlılığı analizi sonucunda, z-LEHD-FMK ön uygulaması purvalanol ve roskovitin ile rapamisin kombinasyonları, yalnız purvalanol ve roskovitin uygulamaları ile kıyaslandığında hücre canlılığında artışa neden olmuştur. Diğer dikkat çeken sonuç ise; pan-kaspaz inhibitörü uygulandığında hücre canlılığında azalmanın gerçekleşmesidir (Şekil 40B). Bu sonuca göre, rapamisin kombinasyonunun CDK inhibitörleri ile mitokondri türevli hücre yolağının tetiklenmesinin yanısıra aynı zamanda başka apoptotik hücre ölümü mekanizmalarının tetiklenmesine de neden olduğu düşünülmektedir.

Rapamisin varlığında ve yokluğunda purvalanol veya roskovitin PC3 hücreleri üzerindeki apoptotik etki mekanizmasının açıklığa kavuşturulmasına yönelik olarak, pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 protein ailesi üyelerinin ifade düzeyleri incelenmiştir (Şekil 41). Apoptotik sürecin başlatılmasında önemli bir rolü olan Bad ve p-Bad rapamisin ve purvalanol uygulamaları ile aktive olurken, roskovitin ve rapamisin kombinasyonları benzer sonuçlar göstermemiştir. MMP için lider moleküller olan Bax/Bak protein ifadeleri rapamisin ve purvalanol ile artmıştır.

Roskovitin Bax proteininin ifade düzeyini tetiklerken, Bak ifadesinde üzerinde bir değişikliğe neden olmamaktadır. Rapamisin ile purvalanol kombinasyonu Bak ifadesini baskılamış, Bax ifadesinde ise artışa neden olmuştur. Rapamisin ile roskovitin ise tam zıt etki göstermiştir. Rapamisin her bir CDK inhibitörünün apoptotik süreçte etki ettiği mekanizmalarda farklılığa neden olmaktadır. Kaspaz 8 in alt sinyal yolağında bulunan Bid proteini, mitokondriyal membran geçirgenliğinin arttırarak sitokrom c nin salınımı arttıran önemli bir faktördür. Buna göre Bid ifadesi kaspaz 8 ifadesi ile uyumlu sonuçlar vermiştir. Bid fragmentasyonu rapamisin, purvalanol ver roskovitin uygulamaları ile artmıştır.

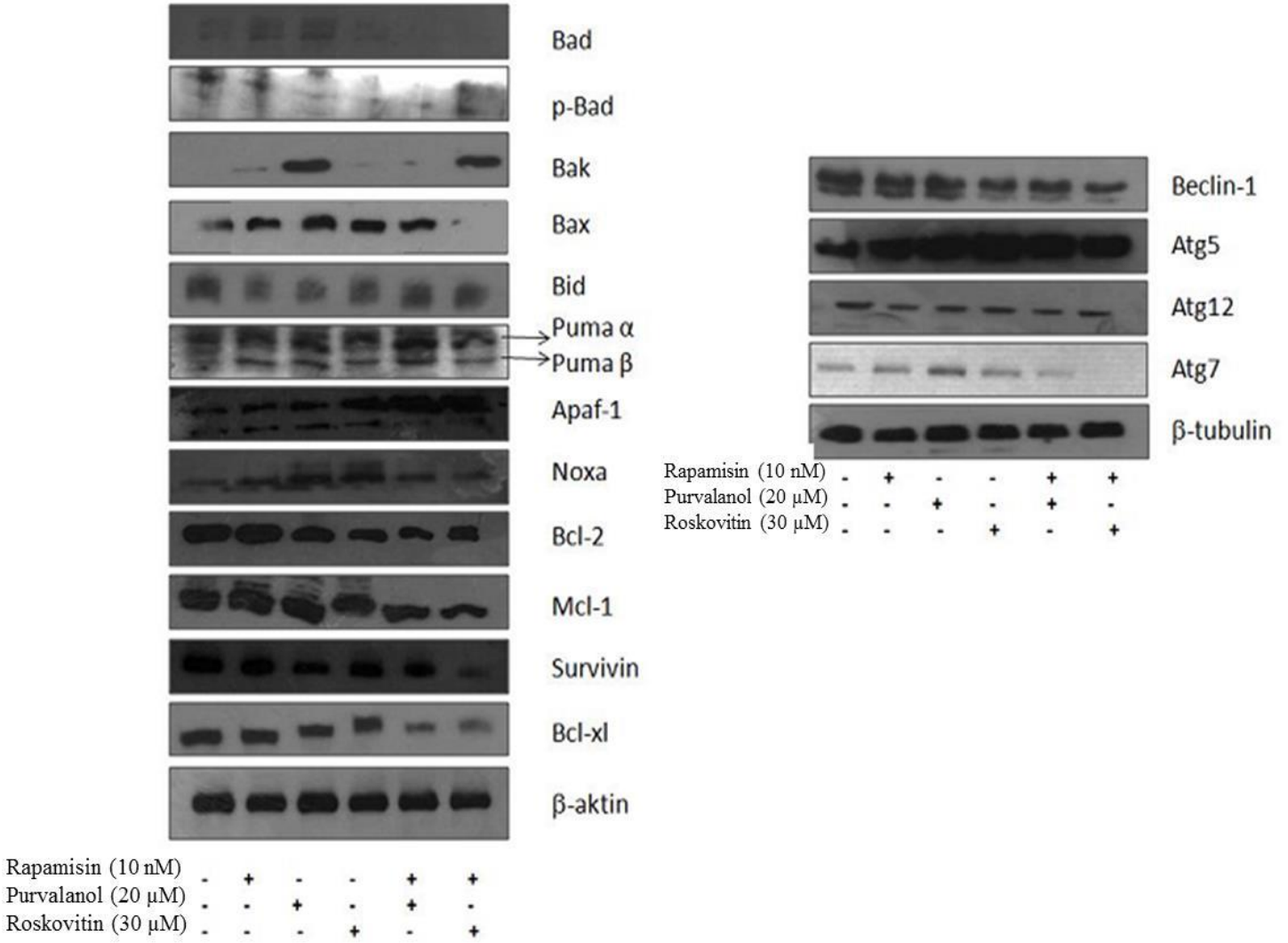
Rapamisin (10 nM)	-	+	-	-	+	+
Purvalanol (20 μ M)	-	-	+	-	+	-
Roskovitin (30 μ M)	-	-	-	+	-	+



Şekil 40. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörlerinin kaspaza bağımlı apoptoza etkisinin modellenmesi. A. Rapamisin (10 nM) ile purvalanol (20 μ M), roskovitin (30 μ M) yalnız veya kombine edilerek 24 saat boyunca uygulandı. Total protein izolasyonunun ardından 30 μ g protein %12' lik SDS-PAGE jel ile ayrıldı ve immunoblotlama yöntemi ile kesilmiş PARP, kaspaz-2,3,7, 8 protein ifadeleri incelendi. B. Kombine ilaç uygulamasının kaspaza bağımlı yolağ üzerindeki etkisini belirlemek üzere, genel kaspaz inhibitörü (Z-VAD) ve kaspaz 9 inhibitörü (Z-LEHD) ilaç uygulamalarından 1 saat önce 10 μ M olacak şekilde uygulandı. Kaspaz inhibitörlerinin hücreler üzerindeki etkisi MTT hücre canlılığı analizi ile incelendi.

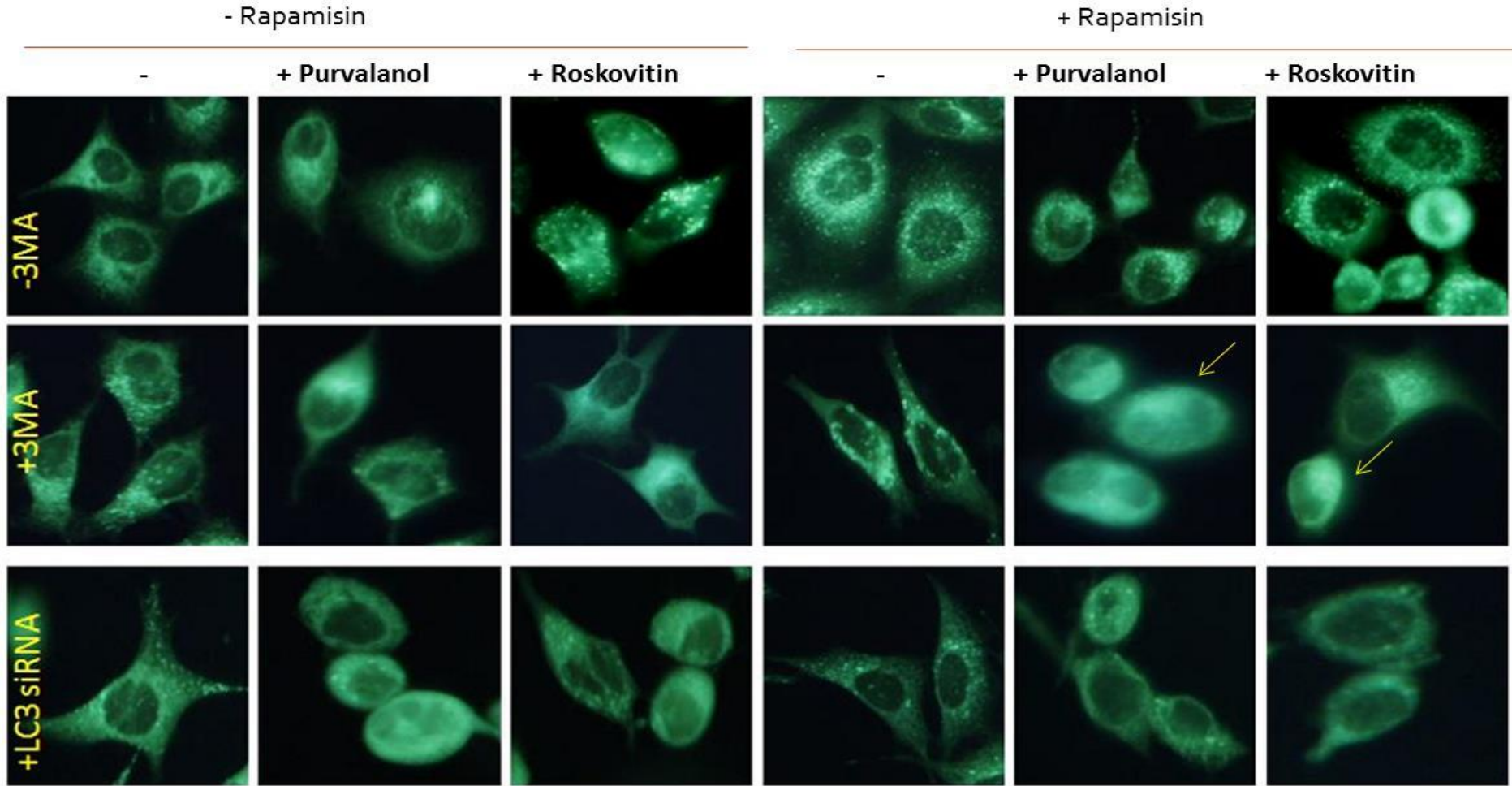
Apoptotik tetikleme mekanizmasının aktif olduğunun bir diğer göstergesi Puma α ve β fragmentleri arasındaki değişimdir. Buna göre rapamisin varlığında Puma α ifadesi artarken Puma β ifadesi azalmıştır. Özellikle purvalanol uygulandığında Puma ifadesinde artışa neden olmuştur. Roskovitin de benzer bir etkiye neden olmuş ama etkisi purvalanole kıyasla daha az olmuştur. Noxa ifadesinin Puma ile benzer özellik göstermesi beklenirken, rapamisin varlığında Noxa üzerindeki etki azalmıştır. Sadece purvalanol veya roskovitin uygulaması PC3 hücrelerinde Noxa ifadesini etkili şekilde arttırmıştır. Apoptozom kompleksinin oluşumunda görev alan Apaf-1 proteini ifade düzeyi rapamisin ve purvalanol eş uygulamasında sadece purvalanol uygulamasına oranla artışa neden olmuştur. Benzer şekilde roskovitin ve/veya rapamisin Apaf-1 ifade düzeyini kontrole oranla arttırmıştır (Şekil 41A).

Anti-apoptotik Bcl-2, Mcl-1, Bcl-x_L ve survivin proteinlerinin ifade düzeyleri CDK inhibitörleri tarafından baskılanmış ve bu etki rapamisin varlığında artmıştır. Elde edilen sonuçlar 24 saat boyunca CDK inhibitörlerinin uygulandığı süreçte apoptotik karar mekanizmasının hücrelerde aktif olduğunu göstermektedir. Ayrıca, rapamisin eş uygulaması her bir CDK inhibitörünün kaspazlar ve pro-apoptotik protein ifadelerinde farklı cevaplar oluşturmasına neden olmaktadır. Ancak rapamisinin diğer hücrelerde olduğu gibi PC3 hücrelerinde de anti-apoptotik proteinlerin daha da baskılanmasına neden olarak apoptotik süreçte destekleyici rol aldığı düşünülmektedir. Ancak bu süreç içerisinde farklı sinyal yollarını aktive etmekte ve primer olarak otofajik düzenlenmenin ne kadar rol aldığı sorusu otofajik markırların incelenmesi yolu ile cevaplanmaya çalışılmıştır. Beclin-1 ifadesi özellikle roskovitin rapamisin varlığında veya yokluğunda uygulandığı durumda azalmakla birlikte, rapamisin purvalanol'ün Beclin-1 üzerindeki baskılayıcı etkisini arttırmıştır. Bu nedenle roskovitin Beclin-1 ifadesinin baskılanmasında purvalanole göre daha etkilidir. Atg5 ifadesi ise her iki CDK inhibitörü ile artarken rapamisin varlığında, bu etki çok anlamlı olmamakla birlikte geriye çekilmiştir. Ancak kontrol ile kıyaslandığında tüm ilaç uygulamaları sonucunda Atg5 ifadesinin arttığı gözlenmiştir. Atg12 ifadesi Beclin-1 ifadesi ile benzer sonuçlar vererek, rapamisin varlığında daha etkili şekilde baskılanmıştır. Atg7 ifadesinde purvalanol ile artış gözlenmekle birlikte rapamisin varlığında Beclin-1 ve Atg12 ile benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 41B).



Şekil 41. Rapamisin Eş Uygulaması İle CDK inhibitörlerinin pro- ve anti apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri, otofaji markırları üzerindeki etkisinin immunoblotlama yöntemi ile gösterimi.

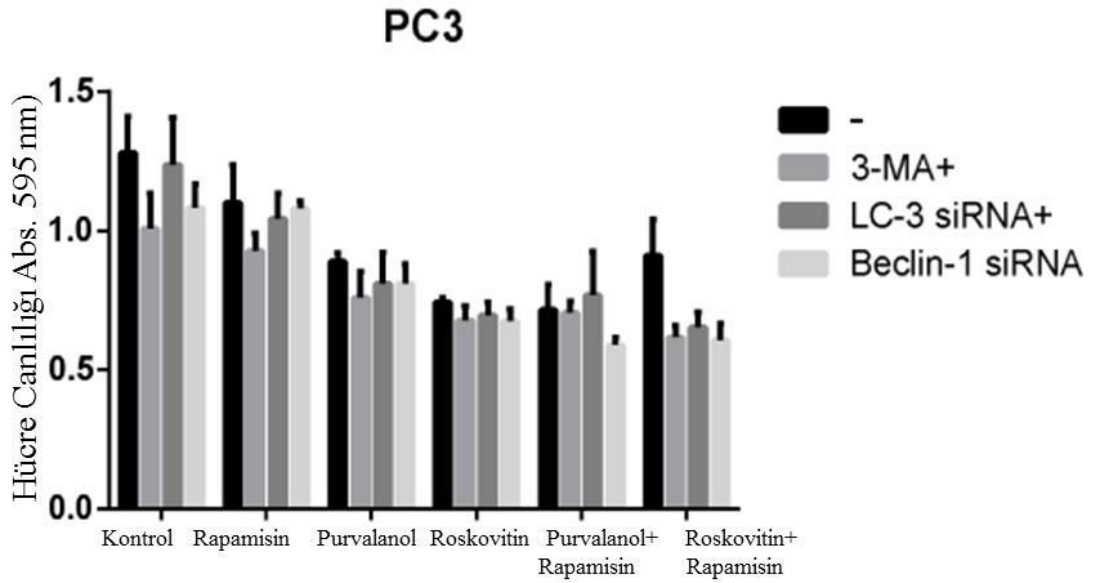
Rapamisin ile CDK inhibitörlerinin eş uygulanmasının otofajik markırlar üzerindeki etkisini daha iyi anlamak üzere MDC boyama ile otofajik yapılar incelenmiştir. Rapamisin otofajik yapılarda belirgin bir artışa neden olmuştur. Yalnızca purvalanol veya roskovitin uygulaması otofajik yapılarda belirgin bir artışa neden olmazken, her iki ilacın rapamisin ile kombinasyonu otofagozom yapılarını anlamlı düzeyde arttırmıştır (Şekil 42).



Şekil 42 MDC boyama sonucunda asidik vesiküllerin PC3 prostat kanseri hücrelerinde gösterimi. Seçilen resimler 400x büyütme ile gösterilmektedir.

PC3 androjen hormonundan bağımsız proliferasyon gösteren prostat kanseri hücrelerinde ise rapamisin CDK inhibitörlerinin apoptotik etkisini anlamlı düzeyde arttırmamakta, ancak otofajik düzenlenme konusunda aktivite göstermektedir. Hücre canlılığı testi ve MDC boyaması otofajinin sorgulanabilmesi açısından gerçekleştirilmiştir (Şekil 42). Bu amaçla, LC3 siRNA ve 3-MA ile CDK inhibitörlerinin her birisi rapamisin varlığında ve yoksunluğunda uygulanmıştır. Dolayısı ile MDC boyamasının LC3 siRNA'nın etkinliğinin gösterilebilmesi açısından farklı bir yöntem ile doğrulanmasına karar verilmiştir (Şekil 43).

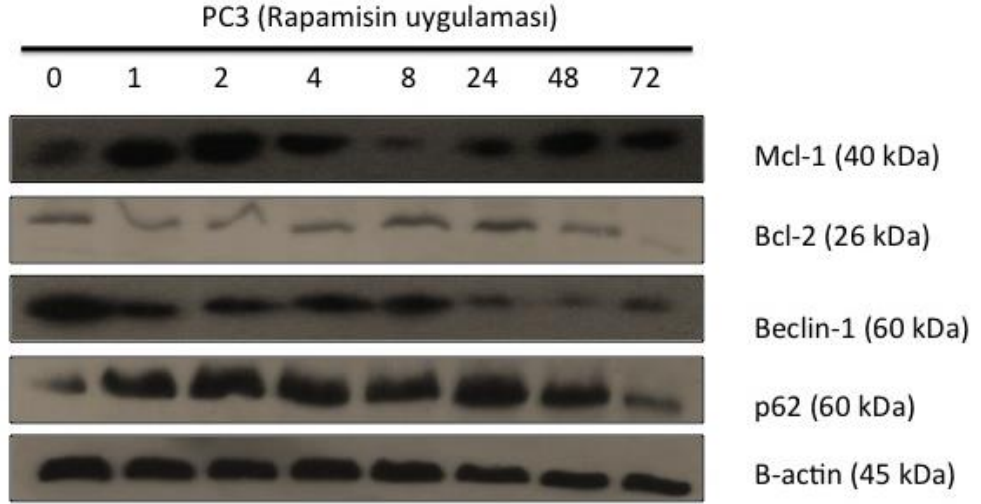
Şekil 43. Androjene duyarsız PC3 prostat kanseri hücrelerinde 3-MA, LC3



siRNA veya Beclin-1 siRNA uygulaması ile otofaji yolağının baskılandığı durumlarda CDK inhibitörleri ve rapamisinin etkisinin hücre canlılığı verileri ile irdelenmesi. Kolon grafik dört tekrarlı deney sonuçlarının ortalama±standard hata sunumu şeklinde yer almaktadır.

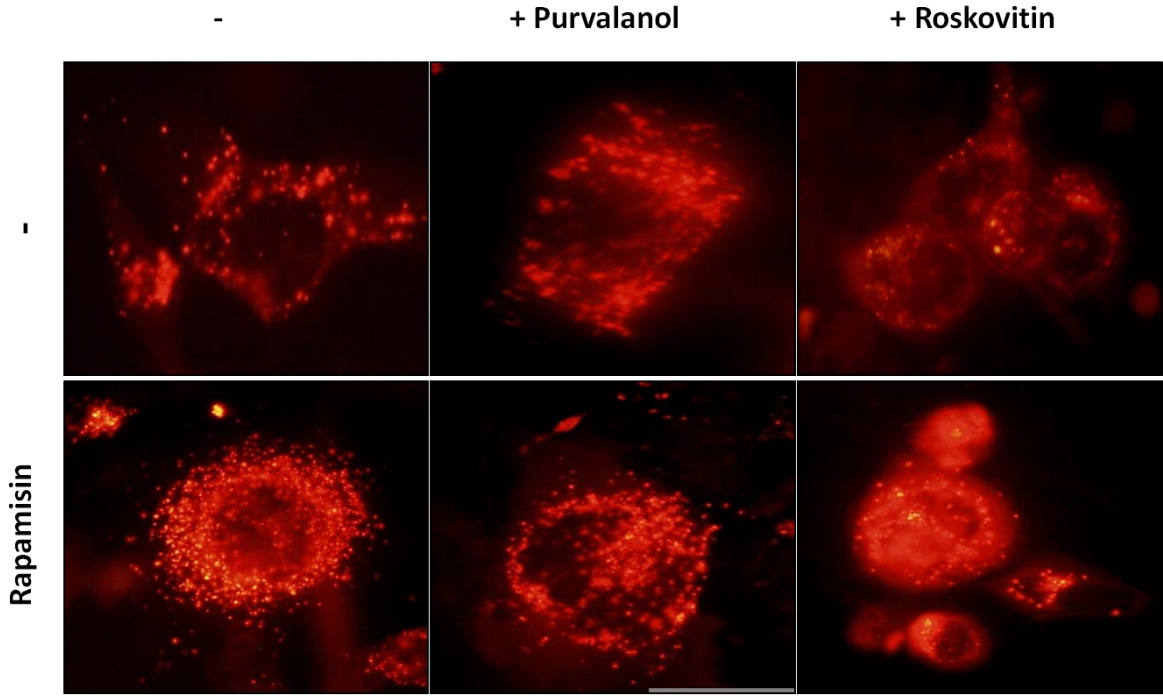
Bu verilere ek olarak PC3 hücrelerinde rapamisin uygulamasının otofaji anahtar hedefleri ve özellikle Beclin-1 ile interaksiyonu bulunan anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin zamana bağlı ifade düzeylerindeki değişiklikler belirlenmiştir (Şekil 44). Beclin-1 24 saat rapamisin uygulaması sonucunda ifade düzeyinde azalma gösterirken, p62 ifadesindeki 24. saat uygulama sonrasındaki artış dikkati çekmiştir. Bu durum rapamisin (10 nM) uygulamasının 24 saat uygulama sürecinde otofaji yolağını başarılı bir şekilde aktive ettiğini göstermektedir. Ancak anti-apoptotik moleküllerden Bcl-2 ifadesinde azalma 72 saat rapamisin uygulaması sonrasında

gözlenirken Mcl-1 ifadesi kayda değer şekilde artış göstermiştir. Bu nedenle rapamisinin apoptotik mekanizmayı aktive etmekten çok hücre enerji yolağı üzerinde etkili olarak hücrelerde açlığa neden olduğu düşünülmektedir.



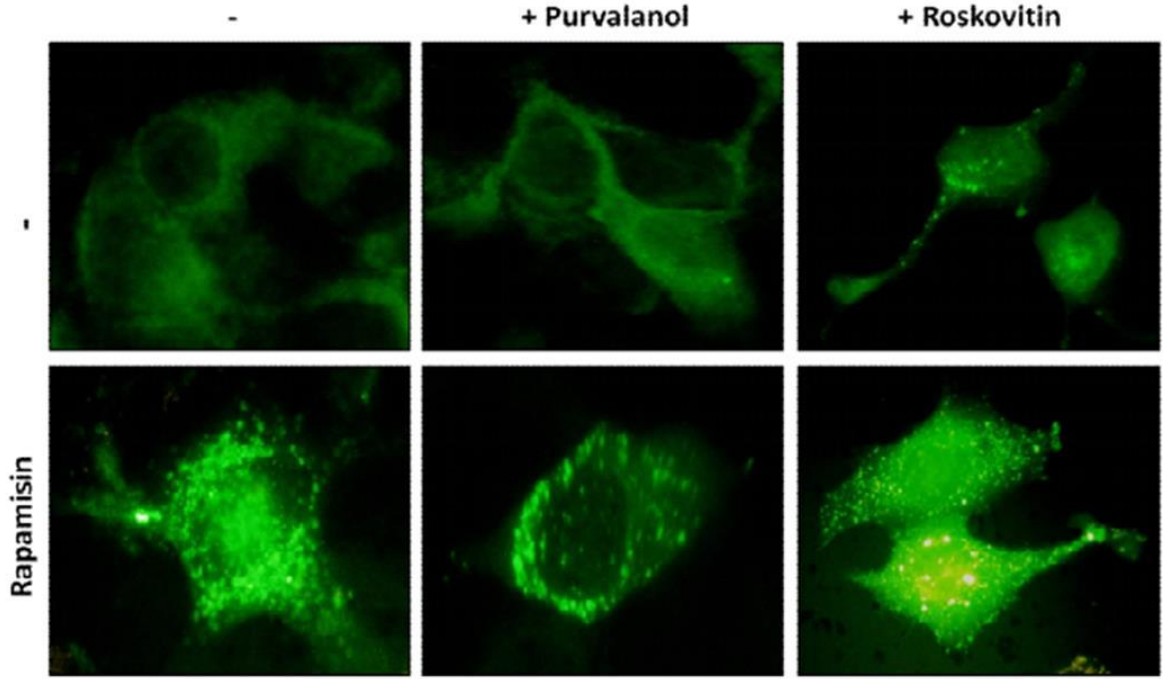
Şekil 44. PC3 prostat kanseri hücre hatlarında zamana bağlı rapamisin uygulanmasının ardından Bcl-2, Mcl-1, Beclin-1 ve p62 ifade düzeylerinin immunoblotlama yöntemi ile belirlenmesi. β -aktin yükleme kontrolü olarak yer almaktadır.

Bu bulguları desteklemek amacı ile, aynı deney düzeneginde lizozomal bir belirteç olarak lysotracker kırmızısı kullanılarak otolizozom yapıları floresan mikroskobu ile görüntülendi. Aktif lizozomlar kırmızı renkte görülmektedir. Rapamisin, purvalanol ve roskovitin ayrı ayrı uygulamalarında aktif lizozomlar belirlenmiştir. Rapamisinin her iki CDKi ile kombinasyonu kırmızı lizozomal vesiküllerde artışa neden olmuştur (Şekil 45).



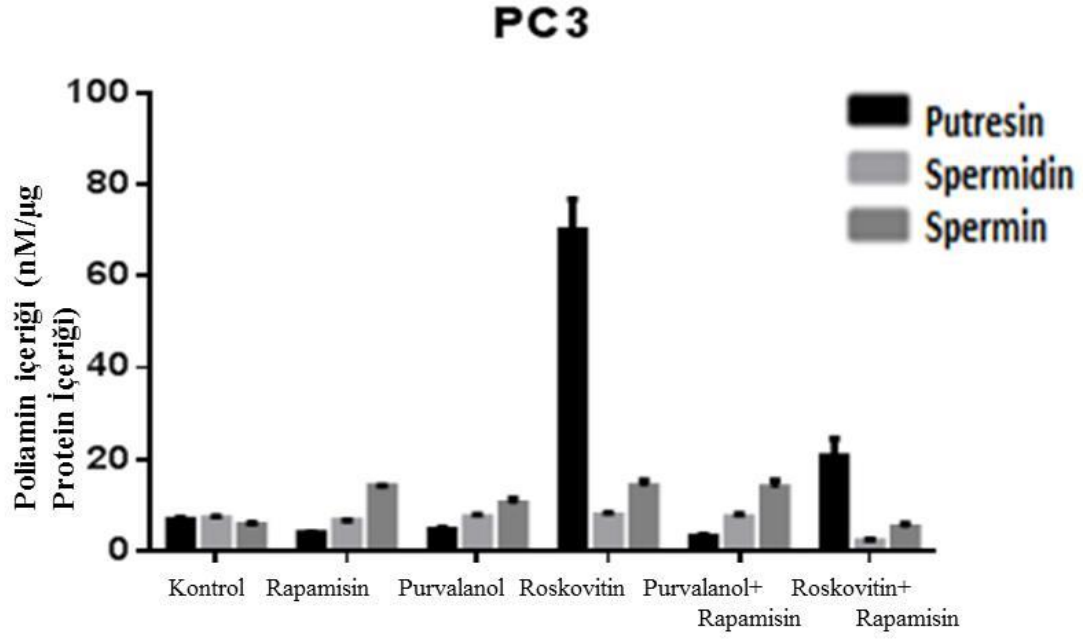
Şekil 45. CDK inhibitörleri ile kombine edilen rapamisinin androjen bağımsız PC3 prostat kanseri hücrelerinde asidik vakuol oluşumuna etkisi. 1×10^4 hücre/kuyu lamel üzerine ekildi. CDK inhibitörleri, purvalanol (20 μ M), roskovitin (30 μ M) ve/veya rapamisin (10 nM) ile 24 saat boyunca uygulandı. Lysotracker kırmızısı (1 mM) ile 30 dk inkübe edildi. Örnekler floresan mikroskobunda x1000 ile görüntüledi.

Otofajik vezikül zar uzamasında rol oynayan LC3 proteininin yeşil floresan proteini ile işaretlenerek hücrelere (GFP-LC3), PC3 hücrelerine transfekte edilmiş ve daha sonra PC3 hücreleri ilaçlar ile muamele ettikten sonra sonuçlar floresan mikroskobu altında görüntülenmiştir. GFP-LC3, otofaji uyarımı sonrası hücre içi yaygın yayılımdan noktasal yerleşime geçerek, mikroskop altında Şekil 46'daki gibi bir görüntü oluşturmuştur. Rapamisin yokluğunda noktasal (puncta) yapılar gözlenmezken, rapamisin varlığında artan noktasal yapılar gözlenmiştir. Özellikle rapamisin ile roskovitin eş uygulamasında otofajik yapılar dikkat çekmektedir. Diğer verilerimiz ile uyumlu olarak roskovitin PC3 hücre hatlarında apoptotik mekanizma üzerinde etkili olduğu kadar otofajik süreçte de aktif rol oynamaktadır. GFP-LC3 plasmid aktarılan hücrelerde roskovitin yeşil noktasal kısımlara kendisi de neden olmaktadır.



Şekil 46. PC3 prostat kanseri hücrelerinde, purvalanol ve roskovitinin apoptotik etkisinin yanı sıra rapamisin kombinasyonu, otofaji belirteci olan otofagozom yapılarının da oluşmasına neden olmaktadır. 1×10^5 hücre/kuyu ekildikten 24 saat sonra $1 \mu\text{g}$ yeşil floresan protein GFP-LC3 (GFP-LC3), $6 \mu\text{l}$ lipozom türevli transfeksiyon ajanı ile hücelere transfekte edildi. 24 saat boyunca hücreler bekletildikten sonra rapamisin (10 nM) ve/veya, purvalanol ($20 \mu\text{M}$) veya roskovitin ($30 \mu\text{M}$) içeren yeni besiyeri ile plazmid içeren besiyeri değiştirildi. Örnekler ilaçlarla 24 saat muamele sonucunda floresan mikroskobunda $\times 40$ büyütme ile incelendi.

PC3 hücrelerinde roskovitin uygulanması sonucunda putresin ve spermin düzeylerinde anlamlı düzeyde artış saptanmıştır (Şekil 47. sırası ile $***p < 0,001$ ve $**p = 0,0080$ vs kontrol, Bonferroni's Anova 2-way test). Purvalanol kendi başına spermin düzeylerinde etki göstermemesine karşın, rapamisin ile kombine edildiği zaman anlamlı düzeyde azalmıştır ($*p = 0,0106$ purvalanol+rapamisin vs purvalanol). Rapamisin uygulaması aynı zamanda spermin miktarlarında azalmaya neden olmuş ve roskovitinin etkisini arttırmıştır ($**p = 0,041$ rapamisin+roskovitin vs roskovitin).



Şekil 47. Rapamisin ile kombine edilen CDK inhibitörlerinin, purvalanol ve roskovitin uygulamasının PC3 prostat kanseri hücrelerinde hücre poliamin düzeylerine etkisinin gösterimi. Kolon grafik 2 farklı kültür ortamından elde edilen 2 tekrarlı örneklerin ortalama±standart hata olarak sunulmaktadır.

4. TARTIŞMA

Kanser vakaları son yüzyıl içerisinde ölüm nedenleri arasında yükselen bir sıralama ile sağlık alanında yer alan tüm birimler için aşılması gereken bir problem olarak ortaya çıkmaktadır. Yapılan istatistiksel araştırmalara göre 2050 yılında 17 milyon kişi için kanser teşhis edileceği öngörülmekte olup, kanser bağlı ölümlerde mortalite oranları teşhis ve tedavide görülen yeniliklere rağmen anlamlı düzeyde artmaktadır. Bu nedenle kanserin tanımlanması, tedavisi ve izlenmesi aşamalarında malin hücrelerin genomik ve moleküler düzeyde tanımlanmaları önem taşımaktadır.

Prostat kanseri, prostat bezindeki hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozularak, organ hacminin büyümesi olarak tanımlanabilir. Dünyada 55 yaş ve üzeri erkeklerde akciğer kanserinden sonra en sık rastlanan kanser türüdür ve yüksek oranda mortaliteye sebep olmaktadır. Prostat kanseri hastalığına neden olan epidemiyolojik faktörler, hormonal faktörler, diyet, çevresel faktörler ve genetik faktörler olarak sıralanabilir.

Prostat kanserinde hücrelerin canlılıklarını sürdürebilmeleri ve büyümeleri androjelerden gelen sinyallerin varlığına bağlıdır. Bununla ilişkili olarak androjen baskılanması ile yapılan tedaviler olumlu yanıt vermişlerdir. Fakat uzun süreli androjen baskılanması tedavilerinde prostat kanseri hücreleri farklılaşmaya uğrayarak androjenden bağımsız bir başka ifade ile androjene duyarsız hale gelmektedirler. Prostat kanseri tedavilerinde en büyük sorun haline gelen bu durum yeni terapi modellerinin gelişmesine gerekliliğe sebep olmuştur.

CDK inhibitörleri olan purvalanol ve roskovitin güçlü apoptotik ajanlar olup, hücre içinde CDK'lar ile yarışa girerek siklinler ile etkileşime girerler ve hücre siklusunu baskılayıp hücre ölümünü indüklemektedirler (106). Kanser hücrelerindeki metabolik farklılıklardan dolayı purvalanol ve roskovitin her kanser hücresindeki etkileri aynı değildir. Bu çalışmada purvalanol ve roskovitin, AR (+) ve AR (-) prostat kanseri hücrelerinde apoptozun indükleyip hücre canlılığında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Purvalanol (20 µM) ve roskovitin (30 µM) AR(+) LNCaP hücre canlılığını sırasıyla % 45 ve % 50 oranında azaltmıştır. AR(-) DU 145 hücre hattında ise sırasıyla % 30 ve % 40 oranında ve AR (-) PC3 hücrelerinde sırasıyla % 30 ve % 45 oranında hücre canlılığında azalma saptanmıştır. Bu sonuçlara bakılarak AR (+) LNCaP hücrelerinin AR (-) DU 145 ve PC3 hücrelerine göre CDKi'lere karşı daha duyarlı olduğu ortaya konulmuştur. Her iki CDKi 'nin de hücreler üzerindeki etkisinin farklı olduğu sonucuna varılmıştır. CDKi'lerin yanısıra son zamanlarda kanser tedavilerinde de kullanılan mTOR inhibitörü rapamisin kombinasyonu ile kanser hücre türlerine bağımlı olarak hücre ölümü üzerinde sinerjistik bir etki sağlanmıştır. Rapamisin kanser hücrelerindeki terapötik etkisi hücre siklusunu ile ilişkilidir. Rapamisin ve onun bir türevi olan RAD001 meme kanseri hücrelerinde Siklin D1 ifadesini azaltmış hatta tamamen inhibe etmiştir. Diğer siklinler üzerinde etkisi olmakla birlikte meme kanseri hücrelerinde Siklin D3 ifadesini de inhibe etmiştir (107). Yalnız rapamisin (10 nM) uygulaması AR (+) LNCaP hücre canlılığını yaklaşık % 20 oranında azaltırken, AR (-) DU 145 ve PC3 prostat kanseri hücre canlılığında belirgin bir azalmaya neden olmamıştır. Rapamisin ile CDKi kombinasyonu AR(+) LNCaP prostat kanseri hücrelerinde sinerjistik etki göstermiştir. AR(-) PC3 ve DU 145 prostat kanseri hücrelerinde antagonist, fakat PC3 hücrelerinde purvalanol için sinerjistik etki saptanmıştır. Kombinasyonun etkinliği kanser tipine ve aynı zamanda her bir CDKi 'ye göre değişmektedir. Meme kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada sisplatin, doksorubisin, etoposid, paklitaksel, gemsitabin gibi paklitaksel türevli sitotoksik ilaçların anti-karsinojenik kemoterapötik etkisini arttırmak üzere rapamisin ile kombine edilmesi her bir ajan ile farklı bir yanıt oluşturmuştur. Elde edilen sonuçlara göre etoposid ile rapamisin kombinasyonu 5 farklı hücre hattı için, doksorubisin ile 4 hücre hattı için sinerjistik bir yanıt oluşturmakla birlikte, paklitaksel ile rapamisin kombinasyonu 4 hücre hattı için, sisplatin ile rapamisin kombinasyonu ise 5 hücre hattı için antagonist bir yanıt oluşturmuştur (108). Kanser terapi modellerinde kombinasyonel terapinin avantajları

olmakla birlikte, farklı kanser hücre tiplerinde uyumluluk sorunu yaşanmaktadır. Bu nedenle kombine çalışmalar birçok kanser hücre tipleri üzerinde yapılmalıdır. AR (-) DU 145 hücrelerinde CDKi'ler tarafından oluşturulan hücre canlılığındaki azalmanın, rapamisin varlığında hücre içinde farklı sağkalım mekanizmalarının indüklenmesi ile baskılandığı düşünülmektedir.

Zamana bağlı olarak tek başına uygulanan rapamisinin DU 145 hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gözlenirken PC3 hücre hattında daha çok sitostatik bir etki yaratarak hücre çoğalmasını engellemiştir. U937 lösemi hücre hattında zamana bağlı olarak uygulanan rapamisinin toksik bir etkisine rastlanmamıştır (109). Protein kinaz C inhibitörü olan UCN-01 (100 nM) ile kombinasyonu apoptozu etkili bir şekilde arttırarak hücre ölümünü tetiklemiştir (109).

Rapamisinin purvalanol ve roskovitin ile kombinasyonu tarafından tetiklenen hücre canlılığındaki azalmanın apoptotik hücre ölümünden kaynaklanıp kaynaklanmadığını anlayabilmek için apoptotik belirteçler araştırılmıştır. Öncelikle hücreler ışık mikroskopunda incelenmiş her üç hücre hattında da membran yapısındaki bozulmalar tespit edilmiştir. Bunu takiben tüm hücre hatlarına rapamisin varlığında ve yokluğunda purvalanol ve roskovitin uygulanarak mitokondriyal membran potansiyelindeki ($\Delta\psi_m$) değişim floresan ve florometrik ölçümler ile incelenmiştir. LNCaP hücre hattında $\Delta\psi_m$ 'de oluşan kaybın rapamisin ile roskovitin kombinasyonunun mitokondriyal yolak üzerinden apoptozu tetiklediği; fakat purvalanolün florometrik ölçümleri sonucu aynı yanıtı oluşturmadığını ortaya koymuştur. $\Delta\psi_m$ kaybı, genellikle mitokondri zarları arasında bulunan ve elektron transport zinciri üyesi olan sitokrom c'nin sitoplazmaya çıkışını tetiklemektedir. Sitokrom c' nin sitoplazmaya çıkışı mitokondriyal yolağın aktive olduğunun işareti olarak gösterilmektedir. LNCaP hücrelerinde purvalanol ve roskovitin uygulaması sonucu sitokrom c sitoplazmada artmaktadır (110). DU 145 hücre hattında hücre canlılığı analizini destekleyecek veriler çıkmakla birlikte, dikkati çeken bir diğer sonuç; DU 145 hücrelerinin ışık mikroskobu görüntülerinde hücre içerisinde vakuol yapılarının ilaç uygulamaları ile artmış olduğudur. Rapamisin kombinasyonu ile DU 145 hücre hatlarında hücre ölüm oranındaki geri çekilmenin nedeninin oluşan vakuol yapıları ile ilgisi olduğu sonucuna varılmıştır. PC3 hücre hatlarında $\Delta\psi_m$ 'deki bozulmaların sonucu apoptozun mitokondriyal yolak aracılığı ile tetiklendiği

düşünülmüştür. Bir diğer apoptoz belirteci olan DNA kırıklarının oluşumu, ELIZA yöntemi ile her üç hücre hattında incelenmiştir. Rapamisin varlığında LNCaP hücrelerinde, DU 145 ve PC3 hücre hatlarına göre daha fazla DNA kırıklarının oluştuğu gözlenmiştir. DU 145 hücre hattında rapamisin, purvalanol ve roskovitinin neden olduğu DNA kırıkları oluşumuna arttırıcı bir etki yaratmamıştır. Vakuol yapılarının bu sonucuna neden olduğu düşünülmüştür. Serviks kanseri hücresi olan HeLa hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmada rapamisin uygulaması ile apoptotik etkinin geri çekildiği gözlenmiştir (111).

$\Delta\psi$ m kaybı ile mitokondri içerisinde bulunan sitokrom c nin sitoplazmaya çıkışı kaspazların aktivasyonu anlamına gelmektedir (112). Bu nedenle mitokondriyal yolak aracılı apoptozda başlatıcı kaspaz görevini gören Kaspaz 9 ve kaspazların hedefi olan PARP'ın kesilmiş hali LNCaP hücrelerinde rapamisinin, purvalanol ile kombinasyonu ile etkili şekilde artarken, DU 145 hücrelerinde ise rapamisin ile roskovitin kombinasyonu PARP kesimini daha çok arttırmıştır. Her üç hücre hattında rapamisinin tek başına uygulanması PARP kesilimine neden olmuştur. Rapamisin varlığında ve yokluğunda purvalanol ve roskovitinin prostat kanseri hücrelerinde kaspaz bağımlı apoptozu indüklemesi aynı zamanda kaspaz inhibitörleri kullanılarak da gösterilmiştir. Genel kaspaz inhibitörü ile Kaspaz 9 inhibitörlerinin kullanıldığı deney sonuçlarına göre LNCaP ve PC3 hücreleri sağkalımda artış gösterirken, DU 145 hücre canlılığı azalma göstermiştir. PC3 hücrelerinde X-bağılı apoptoz inhibitörü (XIAP)'nün mutant olması nedeniyle CDKi'ler ile tetiklenen apoptotik etki diğer hücrelere göre daha fazladır (113). DU 145 hücrelerinin oluşturduğu direnç ayrı bir araştırma konusudur.

Bcl-2 ailesi üyeleri, LNCaP, DU 145 ve PC3 hücre hatları için apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesinde kritik bir öneme sahiplerdir (114). Purvalanol ve roskovitin LNCaP ve DU 145 hücrelerinde Bad, Bak, Bax, Apaf-1 gibi önemli pro-apoptotik protein ifadelerini arttırırken, her iki CDKi ile rapamisin kombinasyonu Bad, Bax protein ifadelerindeki artışı geri çekmiştir. PC3 hücreleri hücre siklusunun gardiyanı olarak bilinen bir tümör baskılayıcı protein olan p53'ten yoksun olmaları sebebi ile CDKi'lerin Bcl-2 ailesi üyelerinde oluşturduğu cevap diğer iki hücre hattından farklıdır. Purvalanol Bad, Bak, Bax düzeyini kayda değer bir şekilde arttırmıştır, fakat kritik önemi olan sonuç her üç hücre hattında, anti-apoptotik Bcl-2,

Mcl-1, Bcl-xL gibi protein ifadelerinin rapamisin kombinasyonu ile etkin şekilde azalmasıyla apoptozun tetiklendiğidir.

Kanser hücrelerine uygulanan terapötik ajanlara oluşturulan cevap, kanser hücrelerinin farklı genomik özelliklerinden dolayı değişkenlik gösterir. Özellikle hücrelerin sağkalım mekanizması stresin türüne ve uygulandığı sürece göre değişmektedir. Hücrelerde amino asitler gibi besin kıtlığı, büyüme faktörlerinin yokluğu veya stres faktörleri ökaryotik hücrelerin strese girmesine ve hızla açlık durumunun düzeltilmesine yönelik birçok sinyalin oluşturulmasına neden olmaktadır (115,116). Bu süreçte büyüme durmakta ve makrotofaji tetiklenmektedir. Bu nedenle strese maruz kalan hücrelerde otofajik tetiklenme büyüme mekanizması ile ilişkili olup, hücre sağkalımı ile ilgili birçok molekülün rol aldığı süreçtir (117). Bu durumda, CDKi'lerin hücrede yarattığı etki, rapamisin kombinasyonu ile hücre sağkalım mekanizması olarak görülen otofajik süreci nasıl etkilediği otofajik belirteçler ile incelenmiştir. LNCaP hücrelerinde kesecik oluşumunda görev alan LC3 proteini rapamisin varlığında/yokluğunda artmıştır. LNCaP ve DU 145 hücrelerinde Atg5 seviyesi özellikle roskovitin ve rapamisin kombinasyonu ile anlamlı şekilde artmıştır. DU 145 hücrelerinde özellikle rapamisin varlığında her iki CDKi ile LC3 kesilmesi artmıştır. Beclin düzeyi LNCaP ve DU 145 hücrelerinde değişmezken, PC3 hücrelerinde azalması ise üzerinde durulması gereken diğer bir araştırma konusudur.

DU 145 hücre hatlarında rapamisin kombinasyonu ile hücre ölümü oranının azalması hücrede sağ kalım mekanizmalarının aktif olduğunu düşündürmekle birlikte buna neden olan olayın otofagozom yapılarından kaynakladığı sonucuna varılmıştır. Bu nedenle hücrede otofajik sürecin baskılanması ile hücre sağkalım oranlarında ne gibi değişikliklerin olabileceği hücre canlılığı testleri ile incelenmiştir. Öncelikle otofajinin baskılanması ile hücre içi vakuol yapılarındaki artış ve azalma bu vakuoller pH derecesine bağlı olarak boyayan MDC ve lysotracker red floresan boyaları ile floresan mikroskopunda gösterilmiştir. 3-MA spesifik bir otofaji inhibitörüdür. Otofaji inhibisyonunu, sınıf III PI3K proteinini protein sentezi ya da ATP seviyesine etki etmeden inhibe ederek gerçekleştirmektedir (118,119). Bazı araştırmalar birkaç kanser hücre hattında, 3MA'nin kemoterapötik ajanların etkilerini apoptozu indükleyerek arttırdığını göstermiştir (120). Prostat kanseri hücrelerinde 3-

MA, mitokondriden sitokrom c salınımını etkili bir şekilde arttırmış ve PC3 hücrelerinde sülforafan tarafından indüklenen apoptozu arttırmıştır (120). Bu çalışmada LNCaP hücrelerinde belirgin vakuol yapıları gözlenmemiştir, buna rağmen otofajik yapılar rapamisin uygulanması ile hücre içinde bir miktar artmıştır. DU 145 hücrelerine rapamisin varlığında CDK inhibitörleri uygulandığında artan otofajik yapılar gözle görülür hale gelmişlerdir. 3-MA varlığında ise otofajik yapıların azalmasından çok, hücrelerin morfolojik yapılarının özellikle hücre membranlarının apoptotik bir ifade oluşturması dikkat çekmiştir. Otofagozom yapılarının oluşmasında önemli görevleri olan LC3 ve Beclin proteinleri susturulduğunda, özellikle rapamisin varlığında otofajik vakuollerin azaldığı, aynı zamanda hücre bütünlüğünün bozulduğu ve hücrenin ölüme gittiği gözlenmiştir. LC3 siRNA uygulanan hücrelere yalnız rapamisin uygulamasında vakuol yapılarının hala görülmesi bir soru işareti oluşturmuştur. PC3 hücre hatlarında rapamisin varlığında artmış vakuol yapıları gözlenmiştir, bunun yanında yalnızca roskovitin uygulanan hücrelerde de vakuol yapılarını gözlenmesi roskovitinin apoptoz indükatörü olmasının yanı sıra otofajiyi de tetiklediğinin göstergesidir. 3-MA uygulandığında DU 145 hücre hattı ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. LC3 siRNA uygulanan hücrelere rapamisin uygulandığında, DU 145 hücrelerine kıyasla otofajik yapıların azaldığı gözlenmiştir. PC3 hücrelerine GFP-LC3 plazmidi transfekte edilmesinin ardından uygulanan ilaçların, hücre içinde oluşturduğu GFP-LC3 molekülleri floresan mikroskopu ile analiz edilmiştir. Rapamisin varlığında CDK inhibitörlerinin neden olduğu GFP-LC3 yapıları artmıştır. Yalnız roskovitin uygulanan PC3 hücrelerinde artan GFP-LC3 yapıları, MDC görüntülerini desteklemektedir.

Enerji metabolizmasının indirgendiği koşullarda önemli moleküllerden biri rapamisin hedef molekülü olan mTOR'dur ve çevresel stres faktörleri varlığında otofaji ve büyüme arasındaki dengeyi sağlamaktadır (121,122). mTOR proteini, PI3K ve Akt proteinlerinin yer aldığı bir dizi kinaz kaskadı tarafından düzenlenmektedir. PI3K/Akt sağkalım sinyalleri, otofajinin baskılanmasını mTOR aracılığı ile gerçekleştirmektedir. Memeli hücrelerinde Akt sinyal yolağındaki işlevsizliğin otofajinin indüklenmesine neden olduğu daha önce gösterilmiştir (101). Bu çalışmada LNCaP hücre hatlarında, PI3K p85 ifadesi rapamisin kombinasyonu ile azalmakla birlikte, alt sinyal yolağında yer alan p-Akt protein ifadesinin de azalmasına neden olmuştur. Purvalanol ve roskovitin AR(-) DU 145 hücrelerinde

de PI3K p85, pPDK ve pAkt ifadelerini azalttığı belirlenmiştir. Yalnız rapamisin uygulaması belirgin bir etkiye neden olmazken, purvalanol ve roskovitin ile kombinasyonunun böyle bir etki yaratması, CDK'i'lerin PI3K/Akt sinyal yolağında etkili olduğunu düşündürmektedir. Özellikle roskovitin ile rapamisin kombinasyonu purvalanole göre bu sinyal proteinleri üzerinde daha etkili olmuştur. Akt ifadesinin azalması ile GSK3 β baskılanmaktan kurtulmuş ve düzeyi artmıştır. Bunu takiben PTEN (+/+) DU 145 hücre hattında GSK3 β 'nın artışı pozitif geri kazanım ile PTEN fosforilasyonunu arttırmıştır. Yapılan bir araştırmada, PTEN aktivasyonunun c terminalinden fosforile olmasına bağlı olduğu, bunun da GSK3 β 'nın aracılığı ile olduğu gösterilmiştir (123).

mTOR'un alt sinyal yolağını ise translasyonel mekanizmada rol oynayan p70S6K ve 4E-BP1 oluşturmaktadır. mTOR tarafından fosforile edilen p70S6K ve 4EBP1 proteinlerinin fosforile durumları translasyon başlangıcında yüksektir. Böylece, hücre döngüsünde G1 den S fazına geçişte önemli görevi olan proteinlerin translasyonunu düzenlemektedir (124,125). Birçok çalışmada kanser hücrelerinde rapamisinin mTOR' u inhibe etmesiyle hücre siklusunun baskılandığı gösterilmiştir (126). Bu çalışmada purvalanol ve roskovitin LNCaP ve DU 145 hücre hatlarında mTOR fosforilasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Rapamisin kombinasyonu ile bu etki daha da artmıştır. Bunu takiben DU 145 hücre hattında p-p70S6K'nın rapamisin varlığında tamamen baskılandığı dikkati çekmektedir. Bu sonuca göre, hücre döngüsünde G1 den S fazına geçişte görev yapan Siklin D1 ve Siklin D3 seviyeleri incelendiğinde (127), rapamisin varlığında her iki siklin seviyesinin de azaldığı hatta purvalanol ile rapamisin kombinasyonunda LNCaP ve DU 145 hücre hatlarının ikisinde de Siklin D1'in tamamen baskılandığı gözlenmiştir. Böylece purvalanol ve roskovitin hücre döngüsünde, farklı fazlarda etkinlik gösterdiğini kanıtlayan önemli bir sonuca varılmıştır.

Besin yetersizliğinde, özellikle bazı amino asitlerin yetersizliğinde otofajik vakuol oluşumları hücre ömrünü uzatıp, otofaji ve apoptoz arasındaki dengeyi etkilemektedir. Poliaminler de bir amin türevi olup, sağlıklı dokulara kıyasla kanserli dokularda yüksek konsantrasyonlarda bulunması poliamin yolağının terapötik hedef haline gelmesine neden olmuştur (124). PA'lar putresin, spremin ve spermidin üyelerini içeren alifatik katyonlardır ve hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşması

gibi önemli hücrel olaylarda görev almaktadırlar (128). Putresin, spremin, spermidin hücrel düzeylerinin azaltılmasının G1/S fazında durmaya ve hücre döngüsünde CDK inhibitörü olan p27Kip'in fosforillenmesine neden olduğu gösterilmiştir (129) PA'ların metabolizmasında ODC enzimi görev almaktadır. Bu nedenle kanserli dokularda PA seviyesi ile orantılı olarak ODC seviyesi de yüksektir. Hücrel PA seviyesini azaltmak için ODC hedef durumundadır. ODC'nin α -DFMO tarafından seçici inhibisyonu Merrell Dow laboratuvarı tarafından geliştirilmiştir (130). Fakat hücrel PA düzeylerinin inhibisyonu, PA'ların hücreye dışardan alınımını engelleyememektedir. Bu nedenle, son dönemde yapılan çalışmalar, PA katabolizmasının indüklenmesi ve hücre içi PA seviyelerinin azaltılması amaçlanmaktadır.

Kanser tedavisi için hücre içi PA seviyelerinin ve PA sentezinde görev alan enzimlerin hedef olarak alınması gerektiği ve bu nedenle rapamisin varlığında ve yokluğunda purvalanol ve roskovitin PA seviyelerine olan etkisi incelenmiştir. LNCaP hücre hattında roskovitin, ODC protein ifade düzeyinde belirgin bir azalma sağlarken, rapamisin kombinasyonu ODC ifade düzeyini bir miktar arttırmıştır. HCT116 kolon kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada roskovitin ODC ifadesini azaltarak apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (131). PA metabolizmasında ODC yi baskılayan enzim olan antizim (Az) ifadesinde rapamisin varlığında belirgin bir azalma gözlenmiştir, bununla birlikte Az inhibitörü olan AzI ifade düzeyinde de bu veriyi destekleyecek şekilde rapamisin varlığında artış gözlenmiştir. Daha önce *S. pombe* maya türünde yapılan çalışmalarda da ODC protein ifadesindeki azalmanın Az düzeyi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (132).

PA katabolizma enzimlerinin (PAO, SMO, SSAT) tetiklenmesi ile hücrede PA seviyelerinde azalma sağlanmaktadır (133) LNCaP ve DU 145 hücre hatlarında PAO seviyelerinde bir artış gözlenmekle birlikte, rapamisin varlığında CDK inhibitörlerinin yarattığı etki geri çekilmiştir. Rapamisin varlığında SSAT seviyesindeki artış DU 145 hücre hattında LNCaP hücrelerine göre daha belirgindir.

PA katabolik enzimlerin aktivasyonu ile hücrel PA seviyelerinde azalış gözlenmekle birlikte, SSAT tarafından asetillen PA'ların PAO ile oksidasyonları ile toksik maddeler de açığa çıkmaktadır. Özellikle açığa çıkan H₂O₂'nin DNA

kırılmalarına neden olarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir (134). Purvalanol ve roskovitin ile tetiklenen PA katabolik enzimlerinin artışının neden olarak görüldüğü ROS'taki artış, DU 145 hücre hattında daha belirgindir. LNCaP hücrelerinde rapamisin varlığında ROS oluşumu bir miktar geri çekilmiştir. CaCo-2 ve HCT1116 kolon kanseri hücre hatlarında CDK inhibitörlerinin SSAT ve PAO'yu indükleyerek ROS oluşumunu uyardıkları bilinmektedir (131,135).

Sonuç olarak, bu araştırma kapsamında elde edilen bulgulara göre, purvalanol ve roskovitin güçlü apoptotik ajanlar olup, hücrelerin moleküler yetkinliklerine göre hücre sağkalım ve ölüm kararında farklı moleküler hedefleri etkilemektedirler. Rapamisin herne kadar LNCaP hücrelerinde CDK inhibitörlerinin apoptotik etkinliğini stimule edici bir etki gösterse de androjene duyarsız diğer hücre hatları DU145 ve PC3 de kombine ajanların uygulandığı ilk 24 saat içerisinde otofaji yolağını aktive ederek, apoptozdan farklı bir hücre ölüm kararına neden olmakta ve etkiyi değiştirmektedir. Bu nedenle özellikle rapamisin varlığında CDKi'ler tarafından tetiklenen hücre ölümünün, apoptotik mekanizmanın LNCaP hücrelerinde kaspaza bağımlı, DU 145 ve PC3 hücre hattında hem kaspaza bağımlı hem de otofajinin tetiklenmesi ile gerçekleştiği sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde CDK inhibitörleri tarafından tetiklenen apoptotik ve otofajik süreçlerin mTOR yolağının baskılandığı durumlarda PA katabolizması ile ilişkili bir şekilde olduğu tespit edilmiştir.

Purvalanol ve roskovitin hücre döngüsünü baskılayan farklı moleküler mekanizmaları mTOR alt sinyal yollarını da hedef alarak aktive etme özelliğine sahiptirler. Özellikle her iki CDK inhibitörü p70S6K fosforilasyonuna etkileri ve bunun sonucunda Siklin D ifadesi yolu ile farklı terapotik etki göstermekte oldukları bu tez çalışması ile ortaya konmaktadır. Hücrelerde enerji metabolizmasının baskılanması yolu ile CDKi'lerin prostat kanserinde mTOR yolağı ile ilişkili olarak bir terapotik hedef olabileceği açıkça ortaya konmuştur.

5. KAYNAKLAR

1. Gronberg, H. (2003) Prostate cancer epidemiology. *Lancet*, **361**, 859-864.
2. Nahleh, Z.A. (2006) Hormonal therapy for male breast cancer: A different approach for a different disease. *Cancer treatment reviews*, **32**, 101-105.
3. Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians*, **63**, 11-30.
4. Kaygusuz, G., Tulunay, O., Baltaci, S. and Gogus, O. (2007) Microvessel density and regulators of angiogenesis in malignant and nonmalignant prostate tissue. *International urology and nephrology*, **39**, 841-850.
5. DeSantis, C., Siegel, R., Bandi, P. and Jemal, A. Breast cancer statistics, 2011. *CA: a cancer journal for clinicians*, **61**, 409-418.
6. Schwarz, C., Lubbert, H., Rahn, W., Schonfeld, N., Serke, M. and Loddenkemper, R. (2004) Medical thoracoscopy: hormone receptor content in pleural metastases due to breast cancer. *The European respiratory journal*, **24**, 728-730.
7. Brawley, O.W., Knopf, K. and Thompson, I. (1998) The epidemiology of prostate cancer part II: the risk factors. *Seminars in urologic oncology*, **16**, 193-201.
8. Jonsson, J.G., Sissung, T.M. and Figg, W.D. (2009) A genomic strategy for predicting androgen receptor activity in prostate tumors. *Cancer biology & therapy*, **8**, 2002-2003.
9. Miyamoto, K.K., McSherry, S.A., Dent, G.A., Sar, M., Wilson, E.M., French, F.S., Sharief, Y. and Mohler, J.L. (1993) Immunohistochemistry of the androgen receptor in human benign and malignant prostate tissue. *The Journal of urology*, **149**, 1015-1019.
10. Ross, R., Bernstein, L., Judd, H., Hanisch, R., Pike, M. and Henderson, B. (1986) Serum testosterone levels in healthy young black and white men. *Journal of the National Cancer Institute*, **76**, 45-48.
11. Guess, H.A., Arrighi, H.M., Metter, E.J. and Fozard, J.L. (1990) Cumulative prevalence of prostatism matches the autopsy prevalence of benign prostatic hyperplasia. *The Prostate*, **17**, 241-246.
12. Gann, P.H., Hennekens, C.H., Ma, J., Longcope, C. and Stampfer, M.J. (1996) Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **88**, 1118-1126.
13. Prehn, R.T. (1999) On the prevention and therapy of prostate cancer by androgen administration. *Cancer research*, **59**, 4161-4164.
14. Hoffmann, J. and Sommer, A. (2005) Steroid hormone receptors as targets for the therapy of breast and prostate cancer--recent advances, mechanisms of

- resistance, and new approaches. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, **93**, 191-200.
15. Lin, H.P., Lin, C.Y., Hsiao, P.H., Wang, H.D., Sheng Jiang, S., Hsu, J.M., Jim, W.T., Chen, M., Kung, H.J. and Chuu, C.P. Difference in Protein Expression Profile and Chemotherapy Drugs Response of Different Progression Stages of LNCaP Sublines and Other Human Prostate Cancer Cells. *PLoS one*, **8**, e82625.
 16. deKernion, J.B. (2005) Reexamination of current staging for renal cell carcinoma. *The Journal of urology*, **173**, 680.
 17. Lessick, M. and Katz, A. (2006) A genetics perspective on prostate cancer. *Urologic nursing*, **26**, 454-460.
 18. Lee, S.O., Ma, Z., Yeh, C.R., Luo, J., Lin, T.H., Lai, K.P., Yamashita, S., Liang, L., Tian, J., Li, L. *et al.* New therapy targeting differential androgen receptor signaling in prostate cancer stem/progenitor vs. non-stem/progenitor cells. *Journal of molecular cell biology*, **5**, 14-26.
 19. Fornari, F.A., Randolph, J.K., Yalowich, J.C., Ritke, M.K. and Gewirtz, D.A. (1994) Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Molecular pharmacology*, **45**, 649-656.
 20. Small, E.J., Srinivas, S., Egan, B., McMillan, A. and Rearden, T.P. (1996) Doxorubicin and dose-escalated cyclophosphamide with granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of hormone-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*, **14**, 1617-1625.
 21. Hudes, G.R., Kosierowski, R., Greenberg, R., Ramsey, H.E., Fox, S.C., Ozols, R.F., McAleer, C.A. and Giantonio, B.J. (1995) Phase II study of topotecan in metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Investigational new drugs*, **13**, 235-240.
 22. O'Connor, P.M. (1997) Mammalian G1 and G2 phase checkpoints. *Cancer surveys*, **29**, 151-182.
 23. Liu, M., Wikonkal, N.M. and Brash, D.E. (1999) Induction of cyclin-dependent kinase inhibitors and G(1) prolongation by the chemopreventive agent N-acetylcysteine. *Carcinogenesis*, **20**, 1869-1872.
 24. Simanis, V., Carr, A.M., Goss, M., Lee, M.G., MacNeill, S.A. and Nurse, P. (1987) Cell cycle regulation in yeasts and man: towards a unifying mechanism. *Antonie van Leeuwenhoek*, **53**, 319-323.
 25. Aggarwal, B.B. and Ichikawa, H. (2005) Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*, **4**, 1201-1215.
 26. Matsuda, Y. (2008) Molecular mechanism underlying the functional loss of cyclindependent kinase inhibitors p16 and p27 in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, **14**, 1734-1740.
 27. Kim, Y.T. and Zhao, M. (2005) Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. *Yonsei medical journal*, **46**, 597-613.
 28. Giannakakou, P., Nakano, M., Nicolaou, K.C., O'Brate, A., Yu, J., Blagosklonny, M.V., Greber, U.F. and Fojo, T. (2002) Enhanced microtubule-dependent trafficking and p53 nuclear accumulation by suppression of microtubule dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 10855-10860.
 29. Tsihlias, J., Kapusta, L. and Slingerland, J. (1999) The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annual review of medicine*, **50**, 401-423.

30. Zieske, J.D. (2000) Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors during corneal wound repair. *Progress in retinal and eye research*, **19**, 257-270.
31. Nho, R.S. and Sheaff, R.J. (2003) p27kip1 contributions to cancer. *Progress in cell cycle research*, **5**, 249-259.
32. Sera, T. (2007) [Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors]. *Tanpakushitsu kakusan koso*, **52**, 1812-1813.
33. Gray, N., Detivaud, L., Doerig, C. and Meijer, L. (1999) ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Current medicinal chemistry*, **6**, 859-875.
34. Villerbu, N., Gaben, A.M., Redeuilh, G. and Mester, J. (2002) Cellular effects of purvalanol A: a specific inhibitor of cyclin-dependent kinase activities. *International journal of cancer*, **97**, 761-769.
35. Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J.P., Blow, J.J., Inagaki, N., Inagaki, M., Delcros, J.G. and Moulinoux, J.P. (1997) Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *European journal of biochemistry / FEBS*, **243**, 527-536.
36. Havlicek, L., Hanus, J., Vesely, J., Leclerc, S., Meijer, L., Shaw, G. and Strnad, M. (1997) Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *Journal of medicinal chemistry*, **40**, 408-412.
37. Whittaker, S.R., Walton, M.I., Garrett, M.D. and Workman, P. (2004) The Cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, causes loss of Cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer research*, **64**, 262-272.
38. Gray, N.S., Wodicka, L., Thunnissen, A.M., Norman, T.C., Kwon, S., Espinoza, F.H., Morgan, D.O., Barnes, G., LeClerc, S., Meijer, L. *et al.* (1998) Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science (New York, N.Y.)*, **281**, 533-538.
39. Eres, N. and Bellmunt, J. (1998) [Regulatory proteins of the cell cycle: alterations in the cycline D1 pathway as a paradigm. Findings in breast cancer]. *Medicina clinica*, **111**, 592-596.
40. Konigsberg, R., Rogelsperger, O., Jager, W., Thalhammer, T., Klimpfinger, M., De Santis, M., Hudec, M. and Dittrich, C. (2008) Cell cycle dysregulation influences survival in high risk breast cancer patients. *Cancer investigation*, **26**, 734-740.
41. Yim, D., Singh, R.P., Agarwal, C., Lee, S., Chi, H. and Agarwal, R. (2005) A novel anticancer agent, decursin, induces G1 arrest and apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Cancer research*, **65**, 1035-1044.
42. Zhong, Z., Yeow, W.S., Zou, C., Wassell, R., Wang, C., Pestell, R.G., Quong, J.N. and Quong, A.A. Cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4 interacts with filamin A and affects the migration and invasion potential of breast cancer cells. *Cancer research*, **70**, 2105-2114.
43. Koh, M.S., Ittmann, M., Kadmon, D., Thompson, T.C. and Leach, F.S. (2006) CDC4 gene expression as potential biomarker for targeted therapy in prostate cancer. *Cancer biology & therapy*, **5**, 78-83.
44. Ringer, L., Sirajuddin, P., Yenugonda, V.M., Ghosh, A., Divito, K., Trabosh, V., Patel, Y., Brophy, A., Grindrod, S., Lisanti, M.P. *et al.* VMY-1-103, a

- dansylated analog of purvalanol B, induces caspase-3-dependent apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer biology & therapy*, **10**, 320-325.
45. Agarwal, R. (2000) Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochemical pharmacology*, **60**, 1051-1059.
 46. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, **26**, 239-257.
 47. Samali, A., Gorman, A.M. and Cotter, T.G. (1996) Apoptosis -- the story so far. *Experientia*, **52**, 933-941.
 48. Barr, P.J. and Tomei, L.D. (1994) Apoptosis and its role in human disease. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, **12**, 487-493.
 49. Clouston, W.M. and Kerr, J.F. (1985) Apoptosis, lymphocytotoxicity and the containment of viral infections. *Medical hypotheses*, **18**, 399-404.
 50. Kerr, J.F., Gobe, G.C., Winterford, C.M. and Harmon, B.V. (1995) Anatomical methods in cell death. *Methods in cell biology*, **46**, 1-27.
 51. Searle, J., Collins, D.J., Harmon, B. and Kerr, J.F. (1973) The spontaneous occurrence of apoptosis in squamous carcinomas of the uterine cervix. *Pathology*, **5**, 163-169.
 52. Walker, N.I., Harmon, B.V., Gobe, G.C. and Kerr, J.F. (1988) Patterns of cell death. *Methods and achievements in experimental pathology*, **13**, 18-54.
 53. Odaka, C. and Ucker, D.S. (1996) Apoptotic morphology reflects mitotic-like aspects of physiological cell death and is independent of genome digestion. *Microscopy research and technique*, **34**, 267-271.
 54. Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V. and Zychlinsky, A. (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology*, **176**, 231-241.
 55. Bok, R.A. and Small, E.J. (2002) Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression. *Nature reviews*, **2**, 918-926.
 56. Khosravi-Far, R. and Esposti, M.D. (2004) Death receptor signals to mitochondria. *Cancer biology & therapy*, **3**, 1051-1057.
 57. Schultz, D.R. and Harrington, W.J., Jr. (2003) Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Seminars in arthritis and rheumatism*, **32**, 345-369.
 58. Lorenzo, P.I., Arnoldussen, Y.J. and Saatcioglu, F. (2007) Molecular mechanisms of apoptosis in prostate cancer. *Critical reviews in oncogenesis*, **13**, 1-38.
 59. Jiang, J., Slivova, V., Valachovicova, T., Harvey, K. and Sliva, D. (2004) Ganoderma lucidum inhibits proliferation and induces apoptosis in human prostate cancer cells PC-3. *International journal of oncology*, **24**, 1093-1099.
 60. Maritsi, D., Stagikas, D., Charalabopoulos, K. and Batistatou, A. (2006) What's new in p53? *Hippokratia*, **10**, 116-119.
 61. Yu, J., Wang, Z., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Zhang, L. (2003) PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 1931-1936.
 62. Zuckerman, V., Wolyniec, K., Sionov, R.V., Haupt, S. and Haupt, Y. (2009) Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *The Journal of pathology*, **219**, 3-15.

63. Ohsumi, Y. (2001) Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature reviews*, **2**, 211-216.
64. Shintani, T. and Klionsky, D.J. (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science (New York, N.Y.)*, **306**, 990-995.
65. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M. and Klionsky, D.J. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, **451**, 1069-1075.
66. Yang, Z. and Klionsky, D.J. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature cell biology*, **12**, 814-822.
67. Klionsky, D.J. and Lane, J.D. Alternative macroautophagy. *Autophagy*, **6**, 201.
68. Kirkin, V., Lamark, T., Sou, Y.S., Bjorkoy, G., Nunn, J.L., Bruun, J.A., Shvets, E., McEwan, D.G., Clausen, T.H., Wild, P. *et al.* (2009) A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Molecular cell*, **33**, 505-516.
69. Lamark, T., Kirkin, V., Dikic, I. and Johansen, T. (2009) NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, **8**, 1986-1990.
70. Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T. and Tang, D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell death and differentiation*, **18**, 571-580.
71. Wallace, H.M., Fraser, A.V. and Hughes, A. (2003) A perspective of polyamine metabolism. *The Biochemical journal*, **376**, 1-14.
72. Wallace, H.M., Duthie, J., Evans, D.M., Lamond, S., Nicoll, K.M. and Heys, S.D. (2000) Alterations in polyamine catabolic enzymes in human breast cancer tissue. *Clin Cancer Res*, **6**, 3657-3661.
73. Johansson, V.M., Miniatis, M.F., Hegardt, C., Jonsson, G., Staaf, J., Berntsson, P.S., Oredsson, S.M. and Alm, K. (2008) Effect of polyamine deficiency on proteins involved in Okazaki fragment maturation. *Cell biology international*, **32**, 1467-1477.
74. Schipper, R.G., Penning, L.C. and Verhofstad, A.A. (2000) Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors? *Seminars in cancer biology*, **10**, 55-68.
75. Fong, L.Y., Pegg, A.E. and Magee, P.N. (1998) Alpha-difluoromethylornithine inhibits N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal carcinogenesis in zinc-deficient rats: effects on esophageal cell proliferation and apoptosis. *Cancer research*, **58**, 5380-5388.
76. Pajak, B., Gajkowska, B. and Orzechowski, A. (2005) Cycloheximide-mediated sensitization to TNF-alpha-induced apoptosis in human colorectal cancer cell line COLO 205; role of FLIP and metabolic inhibitors. *J Physiol Pharmacol*, **56 Suppl 3**, 101-118.
77. Bhattacharya, S., Ray, R.M. and Johnson, L.R. (2005) STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells. *The Biochemical journal*, **392**, 335-344.
78. Li, L., Rao, J.N., Bass, B.L. and Wang, J.Y. (2001) NF-kappaB activation and susceptibility to apoptosis after polyamine depletion in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **280**, G992-G1004.
79. Manchester, K.M., Heston, W.D. and Donner, D.B. (1993) Tumour necrosis factor-induced cytotoxicity is accompanied by intracellular mitogenic signals

- in ME-180 human cervical carcinoma cells. *The Biochemical journal*, **290** (Pt 1), 185-190.
80. Thomas, T., Balabhadrapathruni, S., Gallo, M.A. and Thomas, T.J. (2002) Development of polyamine analogs as cancer therapeutic agents. *Oncology research*, **13**, 123-135.
 81. Grandvaux, N., Gaboriau, F., Harris, J., tenOever, B.R., Lin, R. and Hiscott, J. (2005) Regulation of arginase II by interferon regulatory factor 3 and the involvement of polyamines in the antiviral response. *The FEBS journal*, **272**, 3120-3131.
 82. Johnson, V.L., Ko, S.C., Holmstrom, T.H., Eriksson, J.E. and Chow, S.C. (2000) Effector caspases are dispensable for the early nuclear morphological changes during chemical-induced apoptosis. *Journal of cell science*, **113** (Pt 17), 2941-2953.
 83. Srivastava, R.K., Sollott, S.J., Khan, L., Hansford, R., Lakatta, E.G. and Longo, D.L. (1999) Bcl-2 and Bcl-X(L) block thapsigargin-induced nitric oxide generation, c-Jun NH(2)-terminal kinase activity, and apoptosis. *Molecular and cellular biology*, **19**, 5659-5674.
 84. Pegg, A.E., Shantz, L.M. and Coleman, C.S. (1995) Ornithine decarboxylase as a target for chemoprevention. *J Cell Biochem Suppl*, **22**, 132-138.
 85. Wang, X., Feith, D.J., Welsh, P., Coleman, C.S., Lopez, C., Woster, P.M., O'Brien, T.G. and Pegg, A.E. (2007) Studies of the mechanism by which increased spermidine/spermine N1-acetyltransferase activity increases susceptibility to skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **28**, 2404-2411.
 86. Pegg, A.E., Feith, D.J., Fong, L.Y., Coleman, C.S., O'Brien, T.G. and Shantz, L.M. (2003) Transgenic mouse models for studies of the role of polyamines in normal, hypertrophic and neoplastic growth. *Biochemical Society transactions*, **31**, 356-360.
 87. Casero, R.A. and Pegg, A.E. (2009) Polyamine catabolism and disease. *The Biochemical journal*, **421**, 323-338.
 88. Wang, Z., Zahedi, K., Barone, S., Tehrani, K., Rabb, H., Matlin, K., Casero, R.A. and Soleimani, M. (2004) Overexpression of SSAT in kidney cells recapitulates various phenotypic aspects of kidney ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*, **15**, 1844-1852.
 89. Pegg, A.E. (2008) Spermidine/spermine-N(1)-acetyltransferase: a key metabolic regulator. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **294**, E995-1010.
 90. Wallace, H.M. (2009) The polyamines: past, present and future. *Essays in biochemistry*, **46**, 1-9.
 91. Amendola, R., Cervelli, M., Fratini, E., Polticelli, F., Sallustio, D.E. and Mariottini, P. (2009) Spermine metabolism and anticancer therapy. *Current cancer drug targets*, **9**, 118-130.
 92. Gong, L., Zhang, B., Zhang, Y., Hu, H., Zhao, Z. and Liu, X. (2007) Cloning, expression and purification of human S-adenosylmethionine decarboxylase gene alpha subunit. *The Chinese journal of physiology*, **50**, 29-33.
 93. Arsham, A.M. and Neufeld, T.P. (2006) Thinking globally and acting locally with TOR. *Current opinion in cell biology*, **18**, 589-597.
 94. Hay, N. and Sonenberg, N. (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development*, **18**, 1926-1945.
 95. Shang, L. and Wang, X. AMPK and mTOR coordinate the regulation of Ulk1 and mammalian autophagy initiation. *Autophagy*, **7**, 924-926.

96. Scott, R.C., Schuldiner, O. and Neufeld, T.P. (2004) Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body. *Developmental cell*, **7**, 167-178.
97. .
98. Balk, S.P. and Knudsen, K.E. (2008) AR, the cell cycle, and prostate cancer. *Nuclear receptor signaling*, **6**, e001.
99. Franke, T.F., Hornik, C.P., Segev, L., Shostak, G.A. and Sugimoto, C. (2003) PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene*, **22**, 8983-8998.
100. Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. and Sabatini, D.M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)*, **307**, 1098-1101.
101. Arico, S., Petiot, A., Bauvy, C., Dubbelhuis, P.F., Meijer, A.J., Codogno, P. and Ogier-Denis, E. (2001) The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 35243-35246.
102. Roviezzo, F., Cuzzocrea, S., Di Lorenzo, A., Brancialeone, V., Mazzon, E., Di Paola, R., Bucci, M. and Cirino, G. (2007) Protective role of PI3-kinase-Akt-eNOS signalling pathway in intestinal injury associated with splanchnic artery occlusion shock. *British journal of pharmacology*, **151**, 377-383.
103. Levine, B., Sinha, S. and Kroemer, G. (2008) Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, **4**, 600-606.
104. Denizot, F. and Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*, **89**, 271-277.
105. Ichite, N., Chougule, M.B., Jackson, T., Fulzele, S.V., Safe, S. and Singh, M. (2009) Enhancement of docetaxel anticancer activity by a novel diindolylmethane compound in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, **15**, 543-552.
106. Monaco, E.A., 3rd, Beaman-Hall, C.M., Mathur, A. and Vallano, M.L. (2004) Roscovitine, olomoucine, purvalanol: inducers of apoptosis in maturing cerebellar granule neurons. *Biochemical pharmacology*, **67**, 1947-1964.
107. Wang, Y., Mikhailova, M., Bose, S., Pan, C.X., deVere White, R.W. and Ghosh, P.M. (2008) Regulation of androgen receptor transcriptional activity by rapamycin in prostate cancer cell proliferation and survival. *Oncogene*, **27**, 7106-7117.
108. Itamochi, H., Oishi, T., Shimada, M., Sato, S., Uegaki, K., Naniwa, J., Sato, S., Nonaka, M., Terakawa, N., Kigawa, J. *et al.* Inhibiting the mTOR pathway synergistically enhances cytotoxicity in ovarian cancer cells induced by etoposide through upregulation of c-Jun. *Clin Cancer Res*, **17**, 4742-4750.
109. Hahn, M., Li, W., Yu, C., Rahmani, M., Dent, P. and Grant, S. (2005) Rapamycin and UCN-01 synergistically induce apoptosis in human leukemia cells through a process that is regulated by the Raf-1/MEK/ERK, Akt, and JNK signal transduction pathways. *Molecular cancer therapeutics*, **4**, 457-470.
110. Arisan, E.D., Obakan, P., Coker-Gurkan, A., Calcabrini, A., Agostinelli, E. and Unsal, N.P. CDK Inhibitors Induce Mitochondria-Mediated Apoptosis Through The Activation Of Polyamine Catabolic Pathway in LNCaP, DU145 and PC3 Prostate Cancer Cells. *Current pharmaceutical design*.

111. Ravikumar, B., Berger, Z., Vacher, C., O'Kane, C.J. and Rubinsztein, D.C. (2006) Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis. *Human molecular genetics*, **15**, 1209-1216.
112. Kulikov, A.V., Shilov, E.S., Mufazalov, I.A., Gogvadze, V., Nedospasov, S.A. and Zhivotovsky, B. Cytochrome c: the Achilles' heel in apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, **69**, 1787-1797.
113. Mohapatra, S., Chu, B., Zhao, X. and Pledger, W.J. (2005) Accumulation of p53 and reductions in XIAP abundance promote the apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer research*, **65**, 7717-7723.
114. Iizuka, D., Ogura, A., Kuwabara, M. and Inanami, O. (2008) Purvalanol A induces apoptosis and downregulation of antiapoptotic proteins through abrogation of phosphorylation of JAK2/STAT3 and RNA polymerase II. *Anti-cancer drugs*, **19**, 565-572.
115. Ikenoue, T., Hong, S. and Inoki, K. (2009) Monitoring mammalian target of rapamycin (mTOR) activity. *Methods in enzymology*, **452**, 165-180.
116. Simone, C. (2007) Signal-dependent control of autophagy and cell death in colorectal cancer cell: the role of the p38 pathway. *Autophagy*, **3**, 468-471.
117. Tan, M.L., Ooi, J.P., Ismail, N., Moad, A.I. and Muhammad, T.S. (2009) Programmed cell death pathways and current antitumor targets. *Pharmaceutical research*, **26**, 1547-1560.
118. Seglen, P.O. and Gordon, P.B. (1982) 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**, 1889-1892.
119. Lum, J.J., Bauer, D.E., Kong, M., Harris, M.H., Li, C., Lindsten, T. and Thompson, C.B. (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, **120**, 237-248.
120. Herman-Antosiewicz, A., Johnson, D.E. and Singh, S.V. (2006) Sulforaphane causes autophagy to inhibit release of cytochrome C and apoptosis in human prostate cancer cells. *Cancer research*, **66**, 5828-5835.
121. Liu, Q., Thoreen, C., Wang, J., Sabatini, D. and Gray, N.S. (2009) mTOR Mediated Anti-Cancer Drug Discovery. *Drug discovery today*, **6**, 47-55.
122. Levine, B. and Kroemer, G. (2009) Autophagy in aging, disease and death: the true identity of a cell death impostor. *Cell death and differentiation*, **16**, 1-2.
123. Zhou, J. and Parada, L.F. (2009) A motor driving PTEN. *Nature cell biology*, **11**, 1177-1179.
124. Feng, Z., Zhang, H., Levine, A.J. and Jin, S. (2005) The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 8204-8209.
125. Fingar, D.C., Richardson, C.J., Tee, A.R., Cheatham, L., Tsou, C. and Blenis, J. (2004) mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Molecular and cellular biology*, **24**, 200-216.
126. Smolewski, P. (2006) Recent developments in targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase pathway. *Anti-cancer drugs*, **17**, 487-494.
127. Swerdlow, S.H., Westermann, C.D., Pelstring, R.J., Saboorian, M.H. and Williams, M.E. (1993) Growth fraction in centrocytic and follicular center cell lymphomas: assessment in paraffin sections with a proliferating cell

- nuclear antigen antibody and morphometric correlates. *Human pathology*, **24**, 540-546.
128. Igarashi, K. (1993) [Role of polyamines in cell proliferation and differentiation]. *Seikagaku*, **65**, 86-104.
 129. Wallick, C.J., Gamper, I., Thorne, M., Feith, D.J., Takasaki, K.Y., Wilson, S.M., Seki, J.A., Pegg, A.E., Byus, C.V. and Bachmann, A.S. (2005) Key role for p27Kip1, retinoblastoma protein Rb, and MYCN in polyamine inhibitor-induced G1 cell cycle arrest in MYCN-amplified human neuroblastoma cells. *Oncogene*, **24**, 5606-5618.
 130. Pegg, A. E., and McCann, P. P. Polyamine metabolism and function; a brief review. *Am. J. Physiol.*, 243: C212-C221, 1982
 131. Arisan, E.D., Coker, A. and Palavan-Unsal, N. Polyamine depletion enhances the roscovitine-induced apoptosis through the activation of mitochondria in HCT116 colon carcinoma cells. *Amino acids*, **42**, 655-665.
 132. Chattopadhyay, M.K., Murakami, Y. and Matsufuji, S. (2001) Antizyme regulates the degradation of ornithine decarboxylase in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Study in the *spe2* knockout strains. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 21235-21241.
 133. Nowotarski, S.L., Woster, P.M. and Casero, R.A., Jr. Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. *Expert reviews in molecular medicine*, **15**, e3.
 134. Alarcon, R.A. Anticancer system created by acrolein and hydroxyl radical generated in enzymatic oxidation of spermine and other biochemical reactions. *Medical hypotheses*, **79**, 522-530.
 135. Coker, A., Arisan, E.D. and Palavan-Unsal, N. Silencing of the polyamine catabolic key enzyme SSAT prevents CDK inhibitor-induced apoptosis in Caco-2 colon cancer cells. *Molecular medicine reports*, **5**, 1037-1042.

6. EKLER

6.1.1. Ek A: Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar

Tablo 2. Kullanılan cihazların listesi

ADI	ÜRÜN	FİRMA ADI
Buzdolabı (No frost)	4263TMB	Arçelik
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Dikey akışlı güvenlik kabini	Model:	HeraSafe
Distile Su Cihazı	D56412	TKA-Pacific
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low	New Brunswick
Elektroforez sistemi	165-8000	Bio-Rad
Elektroforez transfer sistemi	170-4155	Bio-Rad
Floresan ataçmanlı invert	Model:	Olympus
Fluorometre	Fluoroskan	Thermo
Güç Kaynağı	PowerPac/B	BioRad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Hemositometre	Z359629	Sigma Aldrich
HPLC	1200 series	Agilent
Invert Mikroskop	XDS-1B	SOIF
İnkübatör	EN 025	Nüve
Kantitatif eş zamanlı PCR	PTC-1148C	Bio-Rad
Kar-buz makinası	AF80	Scotsman
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab
Masaüstü soğutmalı	5417R	Eppendorf
Mikropipet (0,5µl-10µl)	EH52836	Thermo
Mikropipet (2µl-20µl)	CJ17240	Thermo
Mikropipet (20µl-200µl)	EH46925	Thermo
Mikropipet (200µl-1000µl)	T27274	Thermo
Mikroplaka okuyucu,	680	Bio-Rad
Otoklav	OTO32	Nüve
pH Metre	N315	SEM/Mettler
PVDF Membran	88518	Thermo
Sıvı azot tankı ve ikmal tankı	Arpege 40	Air Liquid
Spektrofotometre	Ultraspec	Biosciences

Tartı	LE6202S	Sartorius
Tüp rotasyon aleti	SRT9D	Stuart
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab
X-ray Film	34090	Thermo

6.1.2. Ek B: Hücre Kültüründe Kullanılan Sarf Malzeme

Tablo 3. Hücre kültürü donanımları.

ADI	ÜRÜN	FİRMA ADI
100 mm petri	93100	TPP
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
25cm² hücre büyütme kapları	90026	TPP
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
60 mm petri	93060	TPP
75cm² hücre büyütme kapları	90076	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
PC3 hücre hattı		ATCC
DU 145 hücre hattı	CRL-2698	ATCC
Fetal Bovine Serum	P291509	Pan Biotech
Kriyovial tüp	V7634	NUNC
LNCaP hücre hattı	CRL-1740	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

6.1.3. Ek C: Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 4. Kullanılan kimyasalların listesi.

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
10X PBS	P04-53500	Pan Biotech
2-merkaptotanol	S4805940517	Merck
3 MA	M9281	Sigma Aldrich
Akrilamid / Bis-Akrilamid 30%	A3699	Sigma Aldrich
Amonyum persülfat	A3678	Sigma Aldrich
Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi antikorları	99412	Cell Signaling Technology
Apoptoz antikorları	9915	Cell Signaling
Benzoil klorid	A4746	AppliChem
Coomassie Blue Belirteci	500-0006	Bio-Rad
DAPI	D1306	Invitrogen
DCFH-DA	C6827	Invitrogen
Dietileter	296082	Sigma Aldrich
DiOC6 Boya	2129966	Fluka
DMSO	D5879	Sigma Aldrich
DTT	D0632	Sigma Aldrich
EDTA	A3452	Sigma Aldrich
Etanol	A3452	Sigma Aldrich
Fetal Bovine Serum (FBS)	P290310	Pan Biotech
Film Geliştirici	P7042	Kodak
Film Sabitleştirici	P7167	Kodak
Glisin	A1067	AppliChem
Hidrojen peroksit	K39218400838	MERCK
Hücre döngüsü antikorları	9932	Cell Signaling
İzopropanol	24137	Rieel-de Haen
Kazpaz antikorları	9929	Cell Signaling
Laemli Tamponu	S3401	Sigma Aldrich
Luminol	A8511	Sigma Aldrich
Metanol	24229	Sigma Aldrich
MTT	M2003	SIGMA
Monodansylcadaverine	30432	Sigma

ODC antikoru	sc-390366	Santa Cruz
p53 antikoru	2527	Cell Signaling
Page Ruller Prestained Protein	SM0671	Fermentas
PAO antikoru	sc-166185	Santa Cruz
p-Coumaric Asit	C9008	Sigma Aldrich
Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi antikorları	9942	Cell Signaling Technology
Propidium Iodide	A2261	Applichem
Protein İzolasyonu Tamponu	K0301	Fermentas
Purvalanol	1580	Tocris biosciences
Rapamisin	1292	Tocris biosciences
Roskovitin	R7772	Sigma Aldrich
Saf Etanol	32221	Rieel-de Haen
SDS (Sodyum dedosil sülfat)	A3452	Applichem
Sığır Serum Albumin (BSA)	500-0007	BioRad
Sodyum Klorür	A2942	AppliChem
SSAT antikoru	sc-67159	Santa Cruz
SSAT siRNA	sc-61616	Santa Cruz
TEMED	A1148	Applichem
Trikloroasetik asit	T0699	Sigma Aldrich
TriPure RNA izolasyon ajanı	11667157001	Roche Applied Sciences
Tris Baz	A2264	Applichem
Tris-HCl	A3452	Applichem
Tween 20	S4927784 802	MERCK
Yağsız Süt Tozu	9999	Cell Signaling
Yükleme standart antikorları	5142	Cell Signaling
z-LEHD-FMK	550381	BD Biosciences
z-VAD-FMK	550377	BD Biosciences

6.1.4. Ek D: Çözeltiler

% 70 Etanol : 100 ml

70 ml saf etanole 30 ml distile su eklenerek hazırlanır.

Yağsız süt tozu (% 5):

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 gr Tris bazı 60 ml distile su içerisinde çözündükten 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 gr Tris bazı 80 ml distile su içerisinde çözündükten 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 gr bromofenol mavisi 10 ml su içerisinde çözdürülür. Çözünmeyen parçacıkların kalması durumunda filtreden geçirilerek oda sıcaklığında saklanır.

Hücre lizis tamponu : 10 ml

150 mM NaCl

% 1 NP-40

50 mM Tris-HCl

Yukarıda verilen kompozisyon distile su içerisinde çözündükten sonra pH 8.0'a ayarlanır. Lizis tamponu -20°C'de saklanır ve kullanmadan önce içerisine 1 mM PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride) ve proteaz inhibitör kokteyli eklenir. 1 mM PMSF metanol içerisinde çözerek taze olarak hazırlanır ve kullanılır.

Proteaz inhibitör kokteylinin hazırlanması için her bir tablet 1 ml steril PBS veya distile su içerisinde çözüldükten sonra -20°C’de saklanır. Kullanılacak olan her 1 ml lizis tamponu için 50µl kokteyl eklenmesi gerekmektedir.

% 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 gr NaCl, 12,11 gr Tris-Baz konulur pH: 8 e ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml’ e tamamlanır. Hazırlanan 10X TBS kullanılmak için 1X TBS’ e dönüştürülür.

TBS-Tween Hazırlanışı

1X TBS içine 500 µl Tween 20 konularak hazırlanır.

Yürütme Tamponunun Hazırlanışı

30,3 gr Tris-Baz, 114 gr 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.

LB Hazırlanması

Pepton	2,5 g
Bacto Yeast Ekstrakt	1,25 g
NaCl ₂	1,25 g
NaOH (1M)	0,25 ml
Distile su	250 ml

SOB besiyeri Hazırlanması

Pepton	4 g
Bacto Yeast Ekstrakt	1g
NaCl	1,25 g
KCl	0,1 g
Distile su	200 ml

SOC besiyeri Hazırlanması

SOB Besiyeri	10 ml
MgSO ₄ (1M)	100 µl
MgCl ₂ (1M)	100 µl
Glikoz (0,5 M)	400 µl

2.2.1 Ek E: Çalışma Kapsamında Kullanılan Antikor, siRNA ve Plazmidler

p-PTEN, PI3K p85, p-FoxO3a (T32), GSK3, p-GSK3 β , mTOR, p-mTOR, p-p70S6K, CyclinD1, CyclinD3, p-Rb (S780), Rb4H1, p21, Bcl-2 ailesi üyeleri, PARP, Caspase 9, Caspase 3, Caspase 7, Caspase 8, Caspase 2, Cytochrome c, Survivin, Apaf-1, Beclin1, LC3I/II, Atg5, Atg12, Atg7, Atg3 (CST, poliklonal anti tavşan), p70S6K and p62(sqstm) (BD Biosciences, poliklonal anti-tavşan). Her bir antikor super block T-20 çözeltisi ile (Pierce) 1:500-1:1000 aralığında çalışılmıştır. HRP-konjuge sekonder antikorlar 1:5000 aralığında çalışılmıştır (CST). LC3-GFP plazmidi (Addgene 11546) kullanılmıştır. siRNA için Beclin-1 (CST 6246S), LC-3 siRNA (CST 6214S) kullanılmıştır.

7. ÖZGEÇMİŞ



1. Adı Soyadı: Özge Berrak

İletişim Bilgileri:

Adres: İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik

Bölümü, MOBİGEN 34156 Bakırköy-İstanbul

Telefon: 0 506 332 58 29

E-posta: o.berrak@iku.edu.tr

2. Doğum Tarihi: 27.01.1990

3. Ünvanı: Biyolog

4. Öğrenim Durumu:

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi, Türkiye	2007-2011
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi, Türkiye	2011-2014

5. Akademik Ünvanlar

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Biyolog	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi, Türkiye	2013-

6. Yönetilen Yüksek Lisans ve Doktora Tezleri

6.1. Yüksek Lisans Tezleri

“mTOR İnhibitörü Rapamisin’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” İstanbul Kültür Üniversitesi, Tez Danışmanı: Doç. Dr. E.Damla Arisan

6.2. Doktora Tezleri

7. Yayınlar

7.1. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)

7.2. Uluslararası diğer hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

7.3. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında(Proceedings) basılan bildiriler

1. **O. Berrak**, Y. Akkoc, P. Obakan, E.D. Arisan, A. Coker-Gurkan, N. Palavan-Unsal. Effects of CDK Inhibitors and Rapamycin Combination on Autophagy With The Status of AR expression on Androgen Dependent LNCaP and Androgen Independent DU145 Prostate Cancer Cells, First International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 23-24 November 2012, Istanbul-TURKEY. (Poster sunum: O.Berrak)
2. E. D. Arisan, **O. Berrak**, P. Obakan, N. Palavan-Unsal. Cyclin Dependent Kinases Exert Their Apoptotic Potential By Acting on mTOR Mediated Energy Signaling Cascade In The Presence Of Activated Polyamine Catabolism in LNCap, DU145 and PC3 Prostate Cancer Cells. International Congress on Polyamines: Biological and Clinical Perspectives, 2-7 September 2012, Istanbul-TURKEY. (Sözlü sunum: E.D. Arisan)

3. **O. Berrak**, E.D. Arisan, P. Obakan, N. Palavan-Unsal. Investigation Of Possible Role of mTOR in CDK Inhibitors- Induced Apoptotic Cell Death in LNCaP, DU145 and PC3 Prostate Cancer Cell Lines. Graduate Student Immunology Congress, April 27-28, 2012, Harvard University, Boston, USA . (Poster sunum: O. Berrak)

7.4. Yazılan uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler

7.5. Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

7.6. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

7.7. Diğer yayımlar

1. **O. Berrak**, E.D. Arisan, P. Obakan, A. Coker-Gurkan, N. Palavan-Unsal. Co-treatment of rapamycin prevented activation of polyamine oxidase and apoptosis via triggering autophagy after CDK inhibitor treatment in LNCaP cells, Gordon Research Conferences: Polyamines, Regulation and Role of Polyamines in Biology and Disease, June 16-21, 2013, Waterville Valley, NH, USA. (Poster sunum: O. Berrak)
2. **O. Berrak**, E.D. Arisan, P. Obakan, N. Palavan-Unsal. Investigation Of Possible Role of mTOR in CDK Inhibitors- Induced Apoptotic Cell Death in LNCaP, DU145 and PC3 Prostate Cancer Cell Lines. Graduate Student Immunology Congress, April 27-28, 2012, Harvard University, Boston, USA . (Poster sunum: O. Berrak)

8. Ulusal & Uluslararası Projeler

- mTOR İnhibitörü Rapamisin'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 (TUBİTAK Kariyer projesi, Proje No: 112T433)

9. İdari Görevler

10. Bilimsel ve Mesleki Kuruluşlara Üyelikler

Moleküler Kanser Araştırma Derneği (MOKAD) Üyeliği

Moleküle Biyoloji Derneği Üyeliği

11. Ödüller ve Burslar

- İstanbul Kültür Üniversitesi %100 lisans bursu, 2007-2011
- İngiltere “University of Greenwich” Erasmus Öğrenim hareketliliği programı (2011)
- TÜBİTAK, 3501 kariyer projesi, Bursiyer (2012-2013)

12. Etkinlikler:

1. Yurt dışında gerçekleştirilen akademik faaliyetler:

- ERASMUS değişim programı, “University of Greenwich”, İngiltere, 2011

3. Düzenlenen bilimsel etkinlikler:

- İstanbul Kültür University, HARVARD-MIT Joint meeting on Nanotechnology and Tissue Engineering: Current Challenges and Future Prospects, Aralık 2013, Organizasyon komitesi üyesi

4. Organizasyonunda Görev Aldığı Bilimsel Etkinlikler:

- DNA Hasarı, Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi, 16-18 Nisan 2013
- Polyamines: Biological and Clinical Perspectives, 2-7 Eylül 2012
- MOBİGEN DNA OKULU Genomik Uygulamalar Sertifika Programı, 24-26 Eylül 2008

3. Katıldığı Uluslararası Bilimsel Etkinlikler:

- Gordon Research Seminars: Polyamines in Biology and Disease, June 15-16, 2013, Waterville Valley, NH, USA.
- First International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 23-24 November 2012, Istanbul-TURKEY.
- International Congress on Polyamines: Clinical and Biological Perspectives, September 2-7, 2012, Istanbul- TURKEY..
- Graduate Student Immunology Congress, April 27-28, 2012, Harvard University, Boston, USA

- Yeditepe Üniversitesi Uluslararası Katılımlı Biyoteknoloji Kongresi Mayıs 2010, İstanbul, Türkiye
- International VI. IUGEN Molecular Biology and Genetics Student Winter School, 06-08 March 2009, İstanbul, TURKEY
- ODTÜ 1. Ulusal Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar Sempozyumu Aralık 2008, Ankara, Türkiye