

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

OBEZİTE TEDAVİSİNDE KULLANILAN ORLİSTAT'IN PROSTAT KANSERİ
PC3 VE PNT1A HÜCRE HATLARINDA AMPK α HEDEFİ İLE İLİŞKİLİ
GLOBAL PROTEİN İFADE DÜZEYLERİNİN 2D-DIGE YÖNTEMİ İLE
TANIMLANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra NEBİLER

1600007091

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. E. Damla ARISAN

MAYIS 2019

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

OBEZİTE TEDAVİSİNDE KULLANILAN ORLİSTAT'IN PROSTAT KANSERİ
PC3 VE PNT1A HÜCRE HATLARINDA AMPK α HEDEFİ İLE İLİŞKİLİ
GLOBAL PROTEİN İFADE DÜZEYLERİNİN 2D-DIGE YÖNTEMİ İLE
TANIMLANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra NEBİLER

1600007091

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 14 Haziran 2019

Tezin Savunulduğu Tarih: 14 Mayıs 2019

Tez Danışmanı: Prof. Dr. E. Damla ARISAN
Jüri Üyeler : Prof. Dr. Narçin PALAVAN ÜNSAL
Dr. Öğrt. Üyesi Ayşe KARATUĞ (İstanbul Üniv.)

MAYIS 2019

ÖNSÖZ

Eğitim hayatım süresince tanıdığım eğitimciler arasında benim için farklı ve özel bir yere sahip olan, olumsuz olaylar karşısında anlayışlı ve karşısındakini her zaman dinleyen önemseyen yapıcı kişiliğinin yanı sıra engin bilgi, tecrübesi ve rehberliği ile örnek aldığım yardımlarını benden hiç esirgemeyen bana çalışma imkânı sunmuş olan saygıdeğer tez danışmanım sayın Prof. Dr. E. Damla ARISAN'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim ve laboratuvarında çalıştığım süre boyunca bilgi ve deneyimleriyle eğitim hayatıma olan yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen çok değerli öğretmenlerim sayın Prof. Dr. Narçın PALAVAN-ÜNSAL, sayın Prof. Dr. Ajda ÇOKER-GÜRKAN, sayın Doç. Dr. Pınar OBAKAN-YERLİKAYA'ya,

Fikirlerini, önerilerini yol gösterici yardımları ve desteklerini benden esirgemeyen Araş. Gör. Özge Berrak'a, Araş. Gör. Pelin Özfiliz'e ve Araş. Gör. Burcu Ayhan Şahin'e her şey için teşekkür ederim.

Labaratuvarında bulunduğum tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim süre boyunca ihtiyaç duyduğum, sıkıştığım anlarda bana yardımcı olan ve desteklerini benden esirgemeyen Okan Akar, Resul İsmail Kaya, Mert Meşeli, Özlem Sönmez'e teşekkür ederim.

Umutsuzluğa düştüğüm her konuda yol gösterici yardımlarıyla hep yanımda olan, beni cesaretlendiren, desteklerini her an hissettiğim Ülker Harman'a ve Ülkü Özgümüş'e sonsuz teşekkürlerim ederim. Akademik hayata adım atmama vesile olan ve bu alanda bana yol gösteren her ihtiyacımdaya karşılıksız yanımda olan ve aynı ortamı paylaşmaktan mutluluk duyduğum, çalışmalarım sırasında deneyimlerini benimle paylaşan desteğini her zaman hissettiren çok kıymetli Kaan Adacan'a teşekkür ederim.

Daima yanımda olan, benim için her türlü fedakarlıkta bulunup sonsuz destek veren, sabır gösterip her derdimi dinleyip çözümler üretmeye çalışan, karşılaştığım tüm olumsuzluklara karşı dik durmamı öğreten ve bugünlere gelmem için çok emek veren sevgili annem Vefkiye Nebilere minnetle teşekkür ederim.

Bu tez TÜBİTAK 1002 Projesi (Proje no: 116Z804, 2017-2018) tarafından desteklenmiştir. TÜBİTAK'a bu proje kapsamında fon sağlamış olduğu için teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	iii
KISALTMALAR	vii
SEMBOL LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
TABLO LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xiv
SUMMARY	xvi
BÖLÜM 1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Amaç	3
BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Prostat Kanseri.....	6
2.1.1. Prostat kanserinin epidemiyolojisi.....	8
2.2. Prostat Kanseri Risk Faktörleri	9
2.2.1. Ailesel yatkınlık ve yaş faktörü	9
2.2.2. Prostat-spesifik antijen (PSA)	10
2.2.3. Androjenler.....	11
2.2.4. Diyabet	12
2.3. Prostat Kanserinde Terapötik Stratejiler	12

2.3.1. Kemoterapi	13
2.3.2. Radyoterapi.....	14
2.4. Prostat Kanseri Oluşumu ve Tedavisinde Temel Moleküler Mekanizmalar ...	15
2.4.1. Programlı hücre ölümü, apoptoz.....	15
2.4.1.1. Dışsal (ekstrinsik) ve içsel (intrinsik) apoptoz sinyal yolları.....	16
2.4.2. İlaçlar ve inhibitörler.....	17
2.4.3. AMPK	19
BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. Materyaller	23
3.2. Yöntemler.....	23
3.2.1. Kullanılan Hücreler ve Özellikleri.....	23
3.2.2. Hücre kültürü.....	23
3.2.3. AMPK α susturulması:	24
3.2.4. Doza ve zamana bağlı hücre canlılık testi (MTT testi)	24
3.2.4. Yara iyileşmesi deneyi	25
3.2.6. Hücre devrinde tutulu kalan hücre popülasyonunun belirlenmesi	25
3.2.7. DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol) boyama.....	25
3.2.8. DiOC6 (3',3-Diheksiloksakarbosiyanin İyodür) boyama	26
3.2.9. Koloni oluşumunun kristal viyole ile gösterilmesi	26
3.2.10. Total protein izolasyonu	26
3.2.11. Fosfatlanmış proteinlerin izolasyonu	27

3.2.12. Protein miktar tayini.....	27
3.2.13. İmmunoblotlama tekniği ve protein düzeylerinin belirlenmesi.....	27
3.2.14. Protein saflaştırma (clean-up).....	28
3.2.15. Cy boyası ile floreans işaretleme	28
3.2.16. 2D- DIGE Protokolü	29
3.2.17. Rehidrasyon ve İzoelektrik Odaklama (IEF).....	29
3.2.18. Denge sağlanması (equilibration) ve 2D Jel.....	30
3.2.19. Boyama.....	30
3.2.20. Görüntü eldesi.....	31
3.2.21. Biyoinformatik Analiz.....	31
3.2.22. İstatistiksel analiz.....	32
BÖLÜM 4. SONUÇLAR	33
BÖLÜM 4. TARTIŞMA	60
KAYNAKLAR	68
Ek 1. Kullanılan zltiler	76
EK 2. Cihazlar	83
Ek 3. Hücre Kültürü Donanımları	84
Ek 4. Kimyasallar	85
Ek 5. Antikorlar.....	87
zgemiŐ	88

KISALTMALAR

2D-DIGE: İki boyutlu jel elektroforezi

ACC: Asetil koenzim A karboksilaz

ACLY: ATP sitrat liyaz

ADT: Androjen deprivasyon tedavisi

AICAR: 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonukleotide

AMPK: AMP-aktive protein kinaz

Apaf-1: Apoptotik proteaz aktive eden faktör

APS: Amonyum persülfat

AR: Androjen reseptörü

BSA: Sığır serum albümin

BT: Brakiterapi

CAD: Kaspaz aktive edici DNaz

CaMKKB: Kalsiyum/kaloduline bağımlı protein kinaz kinaz beta

CPT-1: Karnitin palmitoiltransferaz-1

CRISPR: Kümelenmiş düzenli aralıklarla kesişen kısa palindromik tekrar

DHT: Dihidrotestosteron

DNA: Deoksiribonükleik asit

DSB: Çift iplik kopması

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

EGF: Epidermal büyüme faktörü

EPT: Eksternal parçacık radyoterapisi

ErbB2: HER-2/neu

ERT: Eksternal radyoterapi

FAS: Yağ asidi sentez enzimi

FBS: Fetal sığır serumu

HDEJ: Hataya eğilimli DNA homoloji yönelimli onarım

HDPK: Hormona dirençli prostat kanser

HDR: Hata içermeyen DNA homoloji yönelimli onarım

ICAD: İnaktif kaspaz aktive edici DNaz

LKB1: Tümör baskılayıcı karaciğer kinaz beta

MAPK: Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz

MMP: Mitokondri membran potansiyeli
mTORC1: mTOR kompleks 1
MTT: 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
MW: Moleküler ağırlık
PARP: ADP-riboz polimeraz
PBS: Fosfat tamponlu tuz
PC3: Prostat kanseri
PI: İzoelektrik noktası
PI3K: Fosfatidilinositol 3 kinaz
PSA: Prostat spesifik antijen
PVDF: Polvinilden florid
Raptor: mTOR-ilişkili düzenleyici protein
SPSA: Serbest prostat spesifik antijen
SREBP: Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein
SSP: Spot kodu
TNF: Tümör nekroz faktörü
TNFR1: TNF reseptörü-1
TPSA: Total prostat spesifik antijen
TRAIL: TNF ilişkili apoptoz indükleyici ligand
VKİ: Vücut kitle indesi

SEMBOL LİSTESİ

μ l: Mikrolitre

μ M: Mikromolar

gr: Gram

kDa: Kilodalton

L: Litre

M: Molar

mA: Miliamper

nm: Nanometre

ml: Mililitre

pH: Hidrojen kuvveti

rpm: Dakikadaki dönüş sayısı

sa: Saat

V: Volt

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2018 yılı ülkemizde en sık görülen ve ölüme neden olan kanserlerin sıralaması gösterilmiştir. 6

Şekil 2. 2. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2018 yılı ülkemizde görülme sıklığı ve 5 yıllık prevalance değerleri sıralamasına göre öncü kanser türleri gösterilmiştir... 7

Şekil 2. 3. Orlistat yapısal çizimi (2018). 18

Şekil 2. 4. FASN protein yapısal thioesteraz domain yapısının çizimi (Madej, Lanczycki et al. 2014). 19

Şekil 4. 1. PC3 (A), PNT1A (B) hücre hatlarında Orlistat uygulaması 24 saat boyunca gerçekleştirildikten sonra MTT hücre canlılığı testi ile göreceli canlılık analizi yapılmıştır. Etanol uygulama vektörüdür ve sonuçların ortalama \pm std. hata olarak sunulmuştur.....

Şekil 4. 2. Orlistat uygulaması sonucunda hücre siklusu değişimlerinin PC3 ve PNT1A hücrelerinde gösterilmesidir. 24 saat sonrasında fikse edilen hücreler PI ile boyandıktan sonra hücre sitometrisinde analiz edilmiştir.

Şekil 4 3. DiOC6 boyaması ile mitokondri membran potansiyelinin Orlistat farklı konsantrasyonlarının 24 saat boyunca uygulandığı PC3 ve PNT1A hücrelerindeki değişimler gösterilmiştir. Büyütme: 200x ve DiOC6:3,3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide.....

Şekil 4 4. Yara iyileşmesi modeli ile PC3 prostat kanseri hücrelerinde iki farklı Orlistat dozunun 24 saat boyunca etkisi tanımlanmıştır. Büyütme: 200x.....

Şekil 4 7. PNT1A prostat epitel hücrelerinde 24 saat orlistat uygulaması sonucunda ifade düzeylerinde değişiklik görülen proteinler immunoblotlama yöntemi ile gösterilmiştir.

Şekil 4 8. PC3 prostat kanseri hücrelerinde koloni oluşturma deneyi orlistat ve etanol uygulaması ile gösterilmiştir. Hücreler fikse edildikten sonra kristal viyole ile boyanmıştır.

- Şekil 4.9. PNT1A prostat kanseri hücrelerinde koloni oluşturma deneyi orlistat ve etanol uygulaması ile gösterilmiştir. Hücreler fikse edildikten sonra kristal viyole ile boyanmıştır.....
- Şekil 4.10. Puromisin ile AMPKa sessizleştirilmesi sonrasında seçilen hücre kolonilerinde AMPKa ifadesinin kontrol edilmiştir ve hücrelerin sağ kalım profilleri ışık mikroskopunda 200x ile gösterilmiştir.
- Şekil 4.11. Temsili 2D-DIGE sonuçları beyaz-siyah çevrimi ile çok kanallı okuma sisteminde gösterilmiştir. CY5 AMPK⁺, CY3 AMPK⁻ ve CY2 hem AMPK⁺ hem de AMPK⁻ olup, her bir koşul için toplam 60 µg toplam protein kullanılmıştır.
- Şekil 4.12. PDQuest yazılımı üstünde yazılımın belirlediği spotlar analiz edilerek filtelenmiştir.....
- Şekil 4.13. Temsili 2D-DIGE sonuçları çok kanallı okuma sisteminde gösterilmiştir. CY5 AMPK⁺, CY3 AMPK⁻ ve CY2 hem AMPK⁺ hem de AMPK⁻ olup, her bir koşul için toplam 60 µg toplam protein kullanılmıştır.
- Şekil 4.14. PC3 AMPK⁻ hücrelerde kontrol vs 15 µM Orlistat uygulaması için elde edilen master jel gösterilmektedir. (Üst) olası moleküler ağırlık ve PI dağılımı, (alt) olası jeller arasında anlamlı değişim gösteren spot seçimleri gösterilmiştir.
- Şekil 4.15. PC3 AMPK⁻ prostat kanseri hücrelerinde kontrol hücrelerin 15 µM Orlistat uygulaması sonucunda ortak değişen spotlarının göreceli ifade düzeyine ilişkin grafik gösterilmiştir.....
- Şekil 4.16. PC3 AMPK⁻ hücrelerde kontrol vs 20 µM Orlistat uygulaması için elde edilen master jel gösterilmiştir.
- Şekil 4.17. PC3 AMPK⁻ prostat kanseri hücrelerinde kontrol hücrelerin 20 µM Orlistat uygulaması sonucunda ortak değişen spotlarının göreceli ifade düzeyine ilişkin grafik gösterilmiştir.....
- Şekil 4.18. PC3 AMPK⁻ prostat kanseri hücrelerinde kontrol hücrelerin 15-20 µM Orlistat uygulaması sonucunda ortak değişen spotlarının göreceli ifade düzeyine ilişkin grafik gösterilmiştir..... 51

Şekil 4. 19. TAGIDENT arama sonucu gösterilmiştir.	
Şekil 4.20. Daraltılmış TAGIDENT sonuçları gösterilmiştir.	
Şekil 4.21. PC3 prostat kanseri hücrelerinde ilaç uygulaması ve AMPK susturmasına spot dağılımı gösterilmiştir.	54
Şekil 4.22. PC3 prostat kanseri hücrelerinde (sol) PC3 kontrol vs AMPK susturması, PC3 kontrol vs Orlistat uygulaması ve PC3 kontrol vs kontrol normalizasyon grafikleri gösterilmiştir. Mavi 4 katdan ifade düzeyinde azalma sınırı, kırmızı çizgi 4 kat ifade düzeyinde artış sınırını göstermektedir.	
Şekil 4.23. PC3 prostat kanseri hücrelerinde sadece AMPK susturması ve sadece Orlistat uygulaması ile değişen protein spotlarının tahmini pI noktalarına göre dağılım grafiği gösterilmiştir.	
Şekil 4.24. PNT1A kontrol, AMPK- ve PNT1A AMPK- +20 µM Orlistat uygulaması sonucunda spotların regresyon analizlerinin gösterilmiştir. Üst resim 2D-DIGE PNT1A AMPK+ vs AMPK- 'dır. Alt resim normalizasyon verilerinden elde edilen spot analizleridir.	
Şekil 4.25. PNT1A AMPK- hücrelerde AMPK+ hücelere göre 20 µM Orlistat uygulamasının ortak değişime uğrattığı spotların analizi gösterilmiştir.	
Şekil 4.26. AMPK susturması yapılan PC3 prostat kanseri hücrelerinde orlistat uygulamasına ile potansiyel değişim göstermesi beklenen hedeflerden biri olan yağ asiti sentez ve lipogenez yolağındaki moleküler hedeflerin immunoblotlama ile doğrulanması gösterilmektedir.	
Şekil 4. 27. AMPK susturması yapılan PNT1A prostat epitel hücrelerinde orlistat uygulamasına takiben potansiyel değişim göstermesi beklenen hedeflerden biri olan yağ asiti sentez ve lipogenez yolağındaki moleküler hedeflerin immunoblotlama ile doğrulanmasının gösterilmektedir.	

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. PC3 AMPK ⁻ hücrelerde kontrol vs 15 μ M Orlistat uygulaması için elde edilen mastır jele göre ortak değişen spotlar gösterilmiştir. (SSP: Spot kodu, MW: Moleküler Ağırlık, PI: izoelektrik noktası)	47
--	----



ÖZET

Günümüzde prostat kanseri, erkekler rastlanma sıklığı bakımında diğer kanser türlerine oranla daha üst sıralarda yer bulmaktadır. Prostat kanserine yakalanma oranlarına bakıldığında risk faktörleri ve kronik hastalık içerisinde obezite, dünyada son birkaç yıldır artış gösteren bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Daha önce yapılmış birçok çalışmada obez hastaların kansere yakalanma oranlarının daha fazla olduğu tespit edilmiştir ve kanser vakalarında agresiviteyi artırarak ilaç direncine sebep olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar göstermektedir ki obezite, vücut yağ oranının artmasına neden olması yanısıra prostat kanseri gelişimi sırasında çeşitli hormonların seviyesinin yükselmesine bağlı agresivite, metastazda da rol oynamaktadır. Bunun yanısıra, obezite tedavisinde kullanılan ilaçların kanser gelişiminde lipogenez ve adipogenez yollarını baskılamasına bağlı olarak anti-tümör etki gösterdiklerini belirten çalışmalar oldukça dikkat çekmektedir. Bu nedenle obezite ve prostat kanseri ilişkisi aydınlatılması, tanı ve tedavisine yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Yapılmış çalışmalar da obezite tedavisinde de sıklıkla kullanılan Orlistat'ın apoptozu indüklediği, kanser hücreleri üzerinde tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca Orlistat, uzun zincirli yağ asitlerinin sentezinden sorumlu olan FASN inhibitörüdür ve FASN aşırı anlatımının olduğu kanser için anti-kanser etkisi gösterdiği bilinmektedir. Prostat kanseri hücre tipleri incelendiğinde prostat tümörigenezi gelişiminde yağ asid sentez yolunun tetiklenmesi, kolesterol metabolizması düzensizliği etkisi görülmektedir. Bozulan bu metabolik süreç üzerindeki hedefler FASN ve hücrel metabolizma üzerinde etkili metabolik sensör olan AMPK'dır. AMPK'ın tümör gelişimi üzerindeki baskılayıcı etkiler gösterebildiği ve prostat kanseri hücrelerinde androjen reseptör (AR) kontrolünde lipogenik yolak üzerindeki etkileri çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir. Bu öncü bilgilerden yola çıkarak yapılan bu çalışmada, AMPK α 'nın lipogenez ile ilişkili prostat kanseri progresyonunda, metastatik prostat kanser hücresi PC3 ve prostat epitel hücresi PNT1A hücrelerindeki rolünü belirlemek amaçlı olarak AMPK α susturulması gerçekleştirildi ve lipaz inhibitörü, AMPK aktivatörü olan Orlistat uygulanarak hücrelerin proteomik haritadaki değişimi 2D-DIGE yöntemi ile belirlenmiştir. Orlistat'ın AMPK'nın fosforillenmesi üzerinden yaptığı etki ise Asetil koenzim A karboksilaz (ACC)'in durdurulması ile alt yolakta yer alan FASN'e etki ederek inhibe

etmesi sonucu hücrenin yağ asit metabolizmasına ket vuracak yönde gerçekleşmiştir. Ayrıca hücre çoğalması ve hücre canlılığı önemli ölçüde azalmıştır. Orlistat'ın FASN inhibisyonuna bağlı sağ kalım ve ölüm yolu apoptoz ile ilişkilendirebilir. Hücrelerin Sub-G1 popülasyonunda artış meydana gelmesi ve Akt protein seviyesindeki azalışın gerçekleşmesi hücrenin hayatta kalma oranının azalmasına yol açtığını orataya koyulmuştur. AMPK – hücrelerde western sonuçlarında AMPK yokluğunda ACC miktarı sabit kalmış Lipin ise azalmıştır. Lipin üzerinde ifade düzeyindeki azalmayı teşvik etkisi AMPK yoksunluğunda daha belirgin bir şekilde gözlenmiştir. mTOR etki eden Orlistat lipin seviyesini azaltmakta ve adipogenez, yağ asit metabolizması baskılamaktadır. Yolaklarda gösterilen majör protein farklılıklarına bağlı 2D-DIGE tekniği kullanılarak Orlistat uygulamasına bağlı olarak AMPK susturulması gerçekleştirilen iki hücre hattı için 4 katı ve üzeri değişiklikler saptanarak PDQuest (Biorad) programı ile analiz edilmiş ve elde edilen verilerin hangi moleküler ağırlık ve izoelektrik noktası dağılımı arasında olduğu belirlenmiştir. Bu bağlı tüm veri setinin filtrelendiği ve ortak artan protein spotlarının gösterimi ile 81 azalan protein spotuna karşın 10 tane ifade düzeyi artan spot gösterilmiştir. Bu nedenle filtre edilen veri setlerinde artan ve azalan gen sayılarından yola çıkılarak seçilen spotların kütle spektroskopisi sonuçlarının tüm yolak analizi açısından önemli veriler sağlayabileceğini düşünülmektedir. Orlistat hücrelerde doza bağımlı bir şekilde FASN ifadesine ket vururken, bu etki AMPK sessizleştirilmesi yapılmış hücrelerde gözlenmemiştir. Bu nedenle AMPK ifadesinin orlistat ve FASN etkileşimi açısından kritik rol oynadığı düşünülmektedir.

Elde edilen bulgular ışığında Orlistat'ın prostat kanser hücreleri üzerindeki yağ metabolizmasını düzenleyen önemli bir ajan olabileceği ve diğer kanser türlerindeki yetkin etkisinin araştırılarak tedavi amaçlı ilaç olarak kullanılabilmesi belirlenmiştir.

SUMMARY

Prostate cancer is higher in men than in other types of cancer. Considering the rates of prostate cancer, risk factors and obesity in chronic diseases are a health problem that has increased in the last few years in the world. Many previous studies have shown that obese patients are more likely to develop cancer and have been shown to cause increased drug resistance by increasing aggressiveness in cancer cases. In addition, studies have shown that obesity causes an increase in body fat as well as aggression and metastasis due to elevated levels of hormones during prostate cancer development. In addition, studies showing that drugs used to treat obesity have an anti-tumor effect due to the suppression of lipogenesis and adipogenesis pathways in cancer development. Therefore, the development of new strategies for the elucidation, diagnosis and treatment of obesity and prostate cancer relationship is of great importance. Studies have also shown that Orlistat, frequently used in the treatment of obesity, induces apoptosis and suppresses tumor growth on cancer cells. In addition, Orlistat is the FASN inhibitor responsible for the synthesis of long-chain fatty acids and is known to exhibit anti-cancer effect for cancer species with FASN overexpression. When prostate cancer cell types are examined, the effect of fatty acid synthesis pathway, cholesterol metabolism disorder is seen in the development of prostate tumorigenesis, and the targets on this metabolic process are FASN and AMPK which is an effective metabolic sensor on cellular metabolism. The effects of AMPK on tumor development and its effects on lipogenic pathway in AR control in prostate cancer cells have been reported in several studies. Based on this pioneer information, AMPK silencing was performed in order to determine the role of AMPK in lipogenesis-related prostate cancer progression, and to determine its role in metastatic prostate cancer cell PC3 and prostate epithelial cell PNT1A cells. The change in the map was determined by 2D-DIGE method. The effect of orlistat on the phosphorylation of AMPK was inhibited by the inhibition of ACC and inhibition of the fatty acid metabolism of the cell as a result of its inhibition by inhibiting FASN in the lower pathway. It also significantly reduced cell proliferation and cell viability. It can associate orlistat's FASN inhibition survival and death pathway with apoptosis. An increase in the Sub-G1 population of the cells and the decrease in the Akt protein level lead to a decrease in the survival rate of the cell. In the absence of AMPK in the western

results of cells, the amount of ACC remained stable and the Lipin decreased. The effect of reducing the expression level on lipin was observed more clearly in AMPK deprivation. mTOR-acting Orlistat decreases lipin levels and adipogenesis suppresses fatty acid metabolism. Using the 2D-DIGE technique based on the major protein differences shown in the pathways, AMPK silencing was carried out by using PDQuest (Biorad) program for the two cell lines with AMPK silencing depending on the Orlistat application, and it was determined that the data obtained was between molecular weight and PI distribution. The entire data set was filtered and the common spot of increasing protein spots showed an increase in the expression level of 10 against the decreased protein spot of 81. Therefore, it is thought that mass spectroscopy results of selected spots can provide important data for all path analysis based on increasing and decreasing gene numbers in filtered data sets. While Orlistat inhibited FASN expression in a dose-dependent manner in cells, this effect was not observed in AMPK silenced cells. Therefore, AMPK expression is thought to play a critical role in the interaction of orlistat and FASN.

In the light of the findings, it was determined that Orlistat could be an important agent on regulating fat metabolism on prostate cancer cells and the competent effect on other cancer types could be used as a medicine for treatment.

BÖLÜM 1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1.Giriş

Prostat kanseri, dünyada 2018'de erkeklerde görülme sıklığı olarak ikinci kanser türüdür ve ölümlerle sonuçlanan kanser vakalarında beşinci sırada yer almaktadır. Dünya çapında 2018'de yaklaşık 1,3 milyon yeni prostat kanseri vakası ve 359.000'e yakın prostat kanserine bağlı ölüm olacağı tahmin edilmektedir (Takayama ve Inoue 2013, Bray ve ark. 2018). Prostat kanseri erkeklerde özellikle Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa, Avustralya / Yeni Zelanda gibi dünya ülkelerinin yarısından fazlasında en sık görülen kanser olarak tanımlanmıştır (Rebbeck ve ark. 2013). Prostat kanseri risk faktörlerinin detaylı olarak belirlenmesi ve bu risk faktörleri göz önüne alınarak uygun tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Prostat kanseri olan birçok hasta belirtiler ile karşılaşmamaktadır ve tarama yapmadan da hastalığın tanısı konulamamaktadır. Çeşitli nedenler sonucunda ölen erkeklerin otopsi sonuçlarına bakıldığında, 50 ila 59 yaşlarında erkeklerin %20'sinden fazlasında ve 70 ila 79 yaşlarında erkeklerin %33'ünden fazlasındaki erkekte prostat kanseri olduğu tespit edilmiştir. Prostat kanseri ölüm riski oranlarına etnik kökenlere dayalı olarak bakılmıştır ve Afrika kökenli Amerikalı erkekler için bu oran %4,2, İspanyol erkekler için %2,9, beyaz erkekler için %2,3 ve Asya ve Pasifik Adalı erkekler için %2,1 olarak belirlenmiştir (Force ve ark. 2018).

CONCORD-3 küresel kanser yükü üzerine 18 sık görülen kanserlerden en az biri için 2000–2014 yılları arasında yaptığı çalışma sonucunda, prostat kanseri vakalarına çoğunluk ile gelişmiş ülkelerde rastlanıldığını az gelişmiş ülkelerde bu oranda düşüş olduğunu tespit etmiştir. (Allemani ve ark. 2018). Ancak prostat kanseri yakalanma değerlerinin artmasında çevre, kültür, yaşam tarzı ve genetik gibi çeşitli faktörler oldukça karmaşık bir etkileşim içinde bulunmaktadır. Çeşitli coğrafi bölge ve etnik gruplar incelendiğinde prostat kanseri oluşum oranında önemli değişimler gerçekleşmektedir. Örnek olarak dünyada prostat kanseri oranına bakıldığında, Kuzey

Amerikalılar en yüksek orana sahipken Asyalılar arasında prostat kanser oranı en düşüktür.

Dünyada son birkaç yıldır belirgin olarak artan obezite, birçok komplikasyona da neden olmuştur. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, meme, prostat, kolon, tiroit, karaciğer, rektum ve mesane kanseri, kadınlarda postmenapozal meme ve endometriyum kanserlerinin, sıklıkla görülmekte olan koroner arter hastalığı, hipertansiyon, diyabet, astım gibi kronik hastalıkların en önemli risk faktörleri arasında obezite yer almaktadır. Daha önceki çalışmalarda vücut kitle indeksi (VKİ) yüksek olan obez hastalarının kanser oluşum riskinin, obez olmayan hastalara oranla daha fazla olduğu belirlenmiştir (Di Sebastiano ve ark. 2018, Malik ve ark. 2018). Ayrıca obezite, prostat kanseri vakalarında radikal prostatektomi sonrası yüksek prostat spesifik antijen (PSA) riski yaratarak, prostat kanserinden kaynaklanan ölüm oranını artırmaktadır. Radikal prostatektomi sonrası ve ilerleyen süreçte esas olarak PSA üreten hücreler çıkarılmış olacağından PSA düzeyinde yükselmeler ve kanserin tekrar ettiği görülmektedir. Hormonal tedavi olmayan birçok hastada ve hormonal tedaviye karşı progresyon gösteren veya yaygın metastazı olup hormonal tedavi görmeyen birçok hastada prostat kanserine bağlı ölümler gözlenmiştir (Koc ve ark. 2017).

Prostat kanseri tanısı konulan hastaların anlamlı olarak daha yaşlı 66,2 yıl- 65,8 yaş aralığında, daha ağır VKİ'i değeri olarak 27,9 ile 27,3 arasında, VKİ'ine göre ayarlanmış PSA seviyelerinin daha yüksek olduğu 4.5 karşılık olarak 3.3 PSA değeri ve prostat kanseri hastalarında daha fazla sayıda aile öyküsü % 27.8'e karşı % 20'lik bir olduğu belirtilmiştir. Bazı yaygın kanser türleri için VKİ'nin 25 kg/m² veya daha fazla olması önemli bir risk faktörü olarak gösterilmektedir. Obezite görülen erkek bireylerde tümör hacmi, obez olmayan bireylere göre oranla daha yüksektir. Örneğin, VKİ 35kg/m² den fazla olan bireylerde tümör hacmi, VKİ'sı 25 kg/m² den küçük olan bireylerin tümör hacminden yaklaşık %40 daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Obezite, vücut yağ oranının artması dışında aynı zamanda prostat kanseri gelişimde rol oynayan östrojen, testosteron, insülin, IGF-1 ve leptin gibi hormonların kan serumu içerisindeki konsantrasyonlarını da değişimler gerçekleştirmektedir. Birçok hastalığın tanısı ve tedavisinde, prostat kanseri ve obezite arasındaki ilişkinin moleküler olarak incelenmesi önem taşımaktadır (Liang ve ark. 2014).

1.2.Amaç

Obezite tedavisinde VKİ ve vücut ağırlığının azaltılmasına ek olarak, fiziksel aktivite ve beslenme düzeni ilk ve en sık başvurulan yöntemlerdendir. Kullanılan bu yöntemlere ek olarak, vücut ağırlığının azalması ve obezitenin birçok hastalığın oluşması gibi yan etkilerini en aza indirmek için çeşitli ilaçlar kullanılmaktadır.

Amerikan gıda ve ilaç onay kurumu (FDA) tarafından onaylı en sık kullanılan anti-obezite ilacı “Orlistat” (Xenical, Roche) tir. Orlistat kilo kaybını artırmasının yanı sıra vücut lipit profilinin ve kan basıncının düzenlenmesinde etkilidir. Özellikle obezite ilaçları arasında, kilo kaybına neden olması dışında vücut ağırlığının korunmasında pozitif yönde etkili olduğu için ayrı bir öneme sahiptir. Orlistat’ın öne çıkan etki mekanizması, gastrik ve pankreatik lipazların inhibisyonuna ve diyet ile alınan yağın emiliminin inhibisyonuna dayanmaktadır (Di Sebastiano ve ark. 2018).

Orlistat’ın kanser gelişiminde anti-proliferatif bir etki göstererek, apoptozu indüklediği, normal hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerinde toksik etki yaratarak tümör büyümesini baskıladığı daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir (Kridel ve ark. 2004). Orlistat, yağ asidi sentez enzimi (Fatty Acid Synthase Enzyme, FASN)’nin inhibisyonuna bağlı olarak gastrointestinal karsinoma hücreleri, meme kanseri hücreleri, T hücresi lenfoma hücrelerinde, hücre büyümesini baskıladığı belirtilmiştir. FAS, normalde Asetil Koenzim A’da uzun yağ zinciri oluşumu katalizlemekte ve kanser hücrelerinde FAS aktivitesinin fazla olduğu belirlenmiştir. Orlistat’ın, FAS aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin konsantrasyon bağımlı olduğu ve FAS dışında da başka hedef molekülleri etkileyerek hücre ölüm mekanizmasının aktifleştirilmesinde rol aldığı belirtilmiştir. Orlistat, meme kanseri hücrelerinde anti-poliferatif etki göstererek poli ADP-riboz polimeraz (PARP) ifade düzeyinde artışa sebep olmaktadır (Schcolnik-Cabrera ve ark. 2018).

Adiponektin, adipoz dokudan salgılanan kahverengi ve beyaz adipositler içinde bir adipokindir ve adiponektinler obezite ile ilgili birçok hastalıklarda biyobelirteç olarak görev yapabilmektedir. Adipositler, tüm vücut metabolizmasının homeostatik kontrolünde ayrı bir öneme sahip olduğu belirtilmiştir. Onların birincil işlevi, enerji

fazlalığı dönemlerinde triaçilgliserol depolayarak ve enerji yoksunluğu sırasında harekete geçirecek enerji dengesini sağlamaktır. Yağ depolamanın dışında adipositler birçok lipid ve protein faktörünü salgılar. Adiponektin kaynaklı birçok tedavide kanser ilerlemesini durdurucu etkisi nedeniyle kanser ilerlemesini geciktirme amaçlı olarak terapötik olarak kullanılabilirliği belirtilmiştir. Bu etkileri nedeniyle adiponektinin rolü ve obezitenin prostat kanserinin gelişimi üzerindeki etkisi araştırılmaktadır (Muppala ve ark. 2017). AMP-aktive protein kinaz (AMPK), hücre içi sağkalımını ve büyüme ile ilgili metabolik yolları düzenleyen ve hücre yaşamını düzenleyerek hücre içi ATP seviyelerini koruyan yapı olarak belirtilmiştir. AMPK adiponektin reseptörü gibi yapılar ile birlikte hücre içersinde aktivite kazanarak asetil koenzim A karboksilaz (ACC) ile substrat olarak kullanarak lipid metabolizmasında ve insülin duyarlılığındaki artışa beraber rol oynamaktadır. Çeşitli kanser türlerinde tümör büyümesinde ve hayatta kalımda fonksiyonel olarak görev yapan AMPK, hücrel enerji düzenlenmesindeki rolü bu enzimi apoptoz ve otofajiyide içeren çeşitli hücrel enerji homeostazının sürdürülmesinde merkezi bir kontrol noktası haline getirmiştir (Zadra ve ark. 2010).

Prostat kanserinde metastatik ve lokalize tümörlerin büyük kısmında lipid metabolizmasının aktivasyonu önemle belirtilmektedir. Artık, prostat kanseri ilerlemesi sırasında gerçekleşebilecek değişikliklere karşı çeşitli metabolik yolların tanımlanmasına yönelik ilgi artmaktadır. AMPK lipojenik yolların ana düzenleyicisi olarak de novo lipogenezinin baskılanması sağlamaktadır. AMPK'nın doğrudan aktivasyonunun bağlı olarak androjene duyarlı prostat kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini, bölüme mitoz evresinde engellediği ve apoptozu tetiklediğini göstermektedir. Bu nedenle AMPK lipogenez kaynaklı prostat kanseri için terapötik bir hedef olarak belirlenmiştir (Zadra ve ark. 2014).

AMPK farmakolojik olarak aktive edilmesi, pleiotrofik etkiler göstererek tümör gelişimini baskılayıcı etkilere neden olmaktadır. Tümör baskılayıcı karaciğer kinaz beta (LKB1) ve kalsiyum/kalmoduline bağımlı protein kinaz kinaz beta (CaMKKB) tarafından tetiklenen AMPK aktivasyonu prostat kanseri hücrelerinde Androjen Reseptörü (AR) kontrolünde artan yağ asidi sentezi ve ACC ekspresyonunu artıran transkripsiyon faktörü olan sterol düzenleyici element bağlayıcı protein (SREBP)'ler üzerinde negatif etkilere sahiptir. AMPK, SREBP aktivitesini inhibe ederek yağ asidi sentezini baskıladığını gösterilmiştir. mTOR kompleks 1 (mTORC1) bir besin, enerji

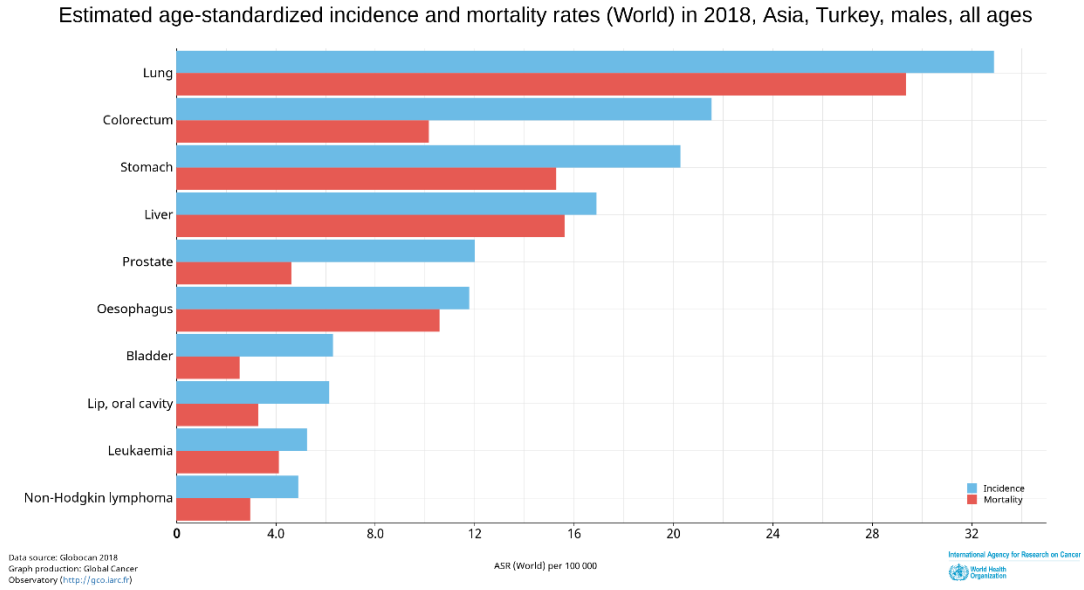
ve redoks sensörü olarak kritik bir rol oynar ve protein sentezini kontrol eder. AMP mTORC1'i doğrudan Raptor'u fosforile ederek baskılamaktadır (Khan ve Frigo 2017, Wright ve ark. 2017). Metformin ve tiyenopiridin A-769662 gibi birçok anti-diyabetik ilacın, AMPK'ya bağlı olarak mTORC1 anlatımını baskılayarak tümör ilerleyişi üzerinde negatif yönde etkili olduğu gösterilmiştir. AMPK'dan bağımsız spontan veya toksik etkiler nedeni ile kanser hücrelerinde bu ajanların etkinlikleri sorgulanmaktadır (Choudhury ve ark. 2014, Zhu ve ark. 2014) .

Elde edilen bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasındaki amaç, obezite tedavisinde sıklıkla kullanılan ve bir lipaz inhibitörü olan Orlistat'ın prostat kanserindeki terapötik etkisinin PC3 prostat kanseri hücrelerinde ve PNT1A epitel hücrelerinin proteomik haritasında meydana getirdiği değişikliğin belirlenmesidir. Bu noktada AR sinyal kaskadı ile birlikte hücre sağ kalım ve ölüm kararını etkileyen AMPK alpha alt ünitenin susturulması sonucu elde edilecek hücre modellerinde AMPK yoksunluğunun hücrenin proteomik içeriğinde meydana getirdiği değişiklikler iki Boyutlu Jel Elektroforez yönteminin geliştirilmiş yöntemi olan 2D-DIGE (2D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis) ile gösterilmiştir.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat Kanseri

Prostat kanseri erkeklerde en sık tanı konulan ve akciğer kanserinden sonra gelen en fazla ölümlü sonuçlanan kanserdir ve androjen reseptörünü hedefleyen ajanlara çeşitli önemli cevaplar veren heterojen bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Bu kapsamda gerçekleştirilen büyük veri analizlerinden biri CONCORD-3 çalışmasıdır (Allemani ve ark. 2018). CONCORD-3, küresel kanser yükünün %75'ini temsil eden 18 sık görülen kanserlerden en az biri için 2000–2014 yılları arasında tanı alan hastaları derleyen bir çalışmadır. Bu çalışmaya göre, prostat kanseri hastaları yoğunluk olarak gelişmiş ülkelerde gözlenmekte iken, az gelişmiş ülkelerde bu oran düşmektedir. Prostat kanseri, ülkemizde 2018 verilerine göre erkekler arasında 5. sırada en sık görülen kanser tipidir. Aynı zamanda 5. önem sırasında ölüme neden olmaktadır (Şekil 2.1)

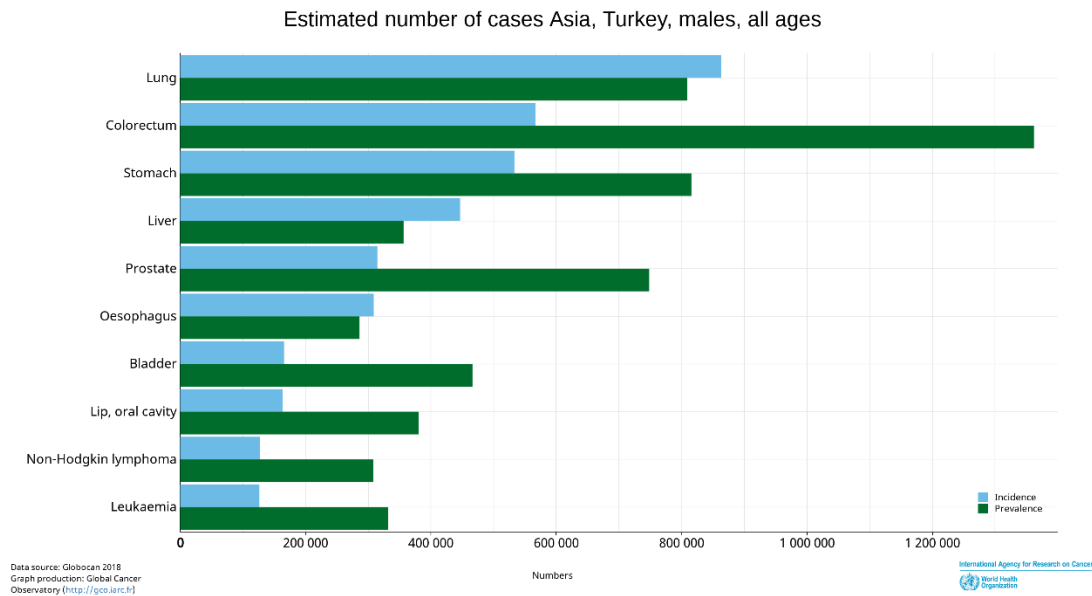


Şekil 2. 1. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2018 yılı ülkemizde en sık görülen ve ölüme neden olan kanserlerin sıralaması gösterilmiştir.

Prostat kanseri görülme sıklığı ve prevalans değerlerini 5 yıl süresince tahmini olarak hesaplandığında artmakta olan bir kanser türü olduğu dikkati çekmektedir (Şekil 2.2). CONCORD-3 veritabanına göre ülkemizde prostat kanseri sağ kalım oranlarının arttığını göstermektedir. Örneğin CONCORD-2 ve 3 çalışmaları kapsamında yaşa standardize edilen 5 yıllık sağkalım oranları incelendiğinde, Türkiye %5-10 ile prostat kanseri sağ kalım artışı gösteren ülkelerden birisidir.

Dünya sağlık örgütü, tüm ülkeler ile birlikte kanser verileri değerlendirmek ve risk faktörlerini araştırmaktadır. Bu sebeple, prostat kanseri risk faktörlerinin detaylı olarak belirlenmesi ve bu risk faktörlerini de göz önüne alarak uygun tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Prostat kanserinin etiyolojisi risk faktörleri olan; artan yaş, ırk, prostat kanseri aile öyküsü, obezite, hormonlar, beslenme faktörleri, fiziksel hareketsizlik, vazektomi, sigara kullanımı ve genetik yatkınlık gibi faktörlerin ilişkili olduğu yönünde bulgular bulunmaktadır (Verma ve ark. 2011).



Şekil 2. 2. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2018 yılı ülkemizde görülme sıklığı ve 5 yıllık prevalence değerleri sıralamasına göre öncü kanser türleri gösterilmiştir.

Prostat kanserinin biyolojisi ve epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılması için çeşitli risk faktörlerinin prostat kanseri ile ilişkisinin anlaşılması gerekmektedir. Prostat kanseri sıklığının etnik ve coğrafi koşullara bağlı olarak anlamlı farklılıklar olduğu epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir. Prostat kanseri sıklığının dünyada ve etnik açıdan değişiklik göstermesinin birçok nedeni vardır. Bu nedenler içerisinde genetik ve çevre olmak üzere iki ana faktörün etkisi belirtilmiştir (Chiam ve ark. 2014).

2.1.1. Prostat kanserinin epidemiyolojisi

Prostat kanserinin epidemiyolojisine bakıldığında, Okyanusya (Avustralya/Yeni Zelanda) bölgesinde, Kuzey Amerika, Avrupa ve Afrika'nın bazı bölgelerinde erkeklerde görülen en yaygın kanser türüdür ve kansere bağlı ölüm vakaları sıralamasında ikinci sırada yer almaktadır. Prostat kanseri, dünya genelinde 2016 yılında prostat kanseri teşhisi konulan 1,6 milyon vakanın 307.481 ölüm ile sonuçlandığı kaydedilmiştir. Bu sayı yeni teşhisi konan kanser hastalarının %8'ine, erkek hastaların ise %15'ine tekabül etmektedir. Ayrıca prostat kanseri teşhislerinin 2/3'ü gelişmiş ülkelerde yaşayan erkeklerde görülmektedir. İskandinav ülkeleri ve Kuzey Amerika'da, özellikle Afrika kökenli Amerikalılarda bu oran en yüksek seviyelerdedir ve en düşük prostat kanseri oranları ise Çin ve Japonya olmak üzere Asya ülkelerinde görülmektedir (Pernar ve ark. 2018).

Dünyada, erkeklerde ilk üç sıradaki kanser türü prostat, akciğer ve kolon iken; Türkiye'de bu sıralama akciğer, prostat ve mesane şeklinde olmaktadır. Prostat kanseri için, dünya ortalaması yüz binde 28'lerde iken, Avrupa ortalaması yüz binde 60'larda ve ülkemizde ise yüz binde 37'lerdedir. Türkiye'de toplam ölümlerin içinde kanserden kaynaklanan ölümlerin oranı 2000 yılı için hastalık yükü çalışmasında %13,1 oranında hesaplanmıştır (Zorlu ve ark. 2014). Prostat kanseri, insidansın sürekli artması Türkiye için önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. CONCORD-2 ve 3 çalışmaları kapsamında yaşa standardize edilen 5 yıllık sağ kalım oranları incelendiğinde, Türkiye %5-10 ile prostat kanseri sağ kalım artışı gösteren ülkelerden biri olduğu belirtilmiştir (Allemani ve ark. 2018).

Prostat kanseri, erkekler arasında önemli bir hastalık ve ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Prostat kanseri epidemiyolojisi üzerinde, hastalığın yaş, ırk / etnik köken, aile öyküsü ve genetik gibi belirlenmiş risk faktörlerinin etkili olduğu belirtilmiştir. Yaş

prostat kanserinin en önemli risk faktörüdür ve yaş ilerledikçe prostat kanserine yakalanma oranında artış olmakla birlikte riskte artmaktadır. Çeşitli yapılan çalışmalar prostat kanseri geçmişi olan birinci derece akrabası olan erkeklerde riskin iki veya üç kat arttığı gösterilmiştir. Prostat kanseri özellikle Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa da ve Yeni Zelanda'nın çoğunda, dünya ülkelerinin yarısından fazlasında erkeklerde görülen ve yaşanan ölümlerin önde gelen sebepleri arasında yer almaktadır (Bashir 2015).

2.2. Prostat Kanseri Risk Faktörleri

2.2.1. Ailesel yatkınlık ve yaş faktörü

Prostat kanserindeki çevresel ve genetik etmenlerin hastalığın ilerlemesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir ve potansiyel risk faktörleri olarak ailesel yatkınlık, genetik, yaş, ırk, hormon, enfeksiyon, çevresel faktörler ve diyet gibi unsurlar belirtilmektedir. Prostat kanseri epidemiyolojisi ve patogenez ile ilgili faktörler incelendiğinde aile öyküsü, prostat kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Yakın akrabalarında, ailesinde prostat kanseri öyküsü bulunması da yerleşik bir risk faktörüdür. Yapılan bir klinik çalışmada birinci dereceden akraba olan bireylerde prostat kanseri riski tespit edilmiştir. Genel popülasyona oranla birinci dereceden akraba bireylerde prostat kanseri gelişim olasılığının iki kattan fazla olduğu tespit edilmiştir. Kanada Alberta da yapılan bir vaka kontrol çalışmasında birinci dereceden akrabası olan erkeklerin, prostat öyküsü olmayan erkeklerle karşılaştırıldığında prostat kanseri geliştirme ihtimalinin üç katından fazla olduğunu ortaya koymuştur. Tüm prostat kanseri vakalarının yaklaşık %9'unun genetik mutasyon dan kaynaklandığı düşünülmektedir (Hemminki 2012).

Prostat kanserinin gelişme olasılığındaki artış yaş artıkça belirli oranlarda artış göstermektedir ve 39 yaşında %0.005 iken, 40-59 yaş aralığında risk oranı %2,2'i ve 60-79 yaş aralığında risk oranı %13,7 olacak şekilde artış gösterilmiştir (Bostwick ve ark. 2004).

Ailesinde prostat kanser öyküsü olan 45-49 yaş aralığındaki erkekler için standardize insidans oranı (SIR), 3.38; 80 yaş SIR, 4.45 olduğu tespit edilmiştir. Artan yaş, prostat kanseri için önemli risk faktörlerinden biridir. Bir erkek kırklı yaşların sonlarına ulaştığında prostat kanseri riski artmaya başlar ve yaşlandıkça bu riskin artmaya

başladığı tespit edilmiştir. Prostat kanserlerinin %70'in den fazlasında 65 yaş ve üzeri olan erkeklerde rastlandığı belirtilmiştir. Benzer bir klinik çalışmada 60 yaşındaki hastaların %7,1'i birinci derece akrabaları arasında en az bir prostat kanseri vakası bildirilmişken, 60 yaşındaki hastaların sadece % 22'sinde benzer aile öyküsü belirtilmiş olması ve çalışmalar gösteriyor ki aile öyküsünün ve yaş faktörünün, agresif prostat kanseri için yüksek risk oluşturduğu belirlenmiştir (Leitzmann ve Rohrmann 2012).

2.2.2. Prostat-spesifik antijen (PSA)

Prostat Spesifik Antijen, PSA olarak kısaltılmıştır. Prostat epitel hücrelerinde ve periuretral gland epitelinde üretilen ve 33.000 molekül ağırlığına sahip olan prostat hücrelerinin sitoplazmasında salgılanan bir glikoprotein yapılı serin proteazdır (Saxena ve ark. 2012).

PSA ilk kez 1970 yılında, PSA insan prostat dokusu ekstrelerinde ve Albin tarafından tespit edilmiştir. Yaklaşık on yıl içerisinde de prostat kanseri için en önemli tümör belirleyicisi olmuştur. PSA prostat kanserinin belirlenmesinde, tedavisinde ve tedavi sonrası izlenen yolların planlanmasında kullanılmaktadır (Kim ve Coetzee 2004). Prostat kanseri için PSA en önemli tümör belirleyicisi olmasına rağmen spesivite ve sensivite bakımından oldukça zayıftır. PSA prostat kansere spesifik değil, organa spesiftir. PSA' nın genç yetişkinlerde olması gereken değeri 0-4 ng/ml arasında olmalıdır ve görevi seminal plazmanın sıvılaştırılmasını sağlamaktır. Prostat kanserli vakalarda PSA değerinin yüksek olmasının nedenini prostat dokusunun bütünlüğünün bozularak PSA' nın ekstraselüler alana salgılanması ve PSA' nın kana karışarak prostat kanserinin serumunda çok daha fazla PSA' nın bulunmasına neden olmuştur (Stattin ve ark. 2015).

Prostat kanserinde, kandaki PSA düzeyi çoğunlukla yükselir ve PSA' nın yüksek olması, prostat kanserine spesifik olmayıp bu değer prostat dokusu dışında çok az oranda endometrium, normal meme dokusundan da sentezlendiğinden meme, malign olmayan prostat adenomlarında, periuretral bezler ve böbrek kanserlerinde de ölçülebilmektedir. (Sadi 2017). Roehrborn, Catalona ve ark., yapmış oldukları çalışmalarda prostat kanseri tespit ettikleri vakalarda uygulanacak total PSA değeri olarak 4ng/ml olarak belirlemişlerdir. Günümüzde yapılan çalışmalarda prostat kanseri vakalarında PSA değeri %20'sinde 4 ng/ml'in altında görülmüş ve 2,5-5 ng/ml arasında

PSA değerine sahip biyopsi yapılmış hastaların %22'sinde prostat kanseri saptanmıştır. Prostat kanserinde PSA'nın belirlenmesini sağlamak, yalancı pozitif test sonuçlarını azaltıp daha az gereksiz biyopsi yapılımları için eşik değeri PSA aralığı olarak 2,5-4 ng/ml belirlenmiştir (Pezaro ve ark. 2014, Nordstrom ve ark. 2018).

2.2.3. Androjenler

Prostat dokusu gelişimini, farklılaşmasını ve devamlılığını sürdürülmesi için androjenler, testosteron, dihidrotestosteron (DHT)'u da içeren steroid yapıdaki hormonlara fizyolojik olarak bağlıdır (Wen ve ark. 2014). Prostat kanserine sebep olan birçok faktörler arasında cinsiyet hormonları ve büyüme faktrleri de yer almaktadır. Prostat kanseri gelişiminde rol oynayan hormonlar arasında testosteron, östrojenler, leptin insülin, insülin benzeri büyüme faktörü de yer almaktadır.

Androjenlerin %90-95'i testislerden üretilir ve steroid yapıdaki erkek seks hormonları olarak vücut içersinde kanda dolaşan ana androjen testosterondur. Testosteronun %95'i 5-redüktaz aracılığı ile DHT'a dönüşmektedir. Ancak DHT'un AR afinitesi 10 kat daha fazladır AR için daha stabil ligand olma durumundadır. Prostat hücreleri üzerindeki farklılaştırıcı ve proliferatif etkiler AR aracılığıyla gerçekleşir. AR yoğunluğu, prostat içerisindeki androjenik etki düzeyinin belirlenmesinde etkilidir ve özelikle ileri evredeki prostat tümörlerinin gelişiminde peptid büyüme faktörleri steroidler, sitokinlerin yanı sıra bu moleküllerle reseptörlerinin yıkımı arasındaki karmaşık etkileşiminde yer almaktadır (Xu ve ark. 2019). Androjenik uyarımın olmadığı durumda prostat dokusu apoptozise gider ve belirgin organ gelişimi kaybı gelişmektedir. Ancak androjen stimulasyonunun yükselmesi durumunda hücre bölünmesini artmaya başlaması ile birlikte prostat karsinogenezi meydana gelmektedir. Androjen reseptörlerinin tümör ilerleyişine etki edebileceği üç farklı mekanizma bulunmaktadır; reseptör ekspresyonu ve aktivasyonunda artış, nokta mutasyonlar, ligand bağımsız aktivasyondur.

Prostat dokusundaki androjenik etki sistemini başlatmak için gereken doku DHT olmasına rağmen androjen deprivasyon (baskılama) tedavisi (ADT) alanlarda androjenlere aşırı duyarlı hale gelen mutant androjen reseptörlerinin adrenal kökenli olabilecek en düşük androjenik stimulasyon dahil olmak üzere androjenik etkiyi tetiklemesine olanak tanımaktadır. Normal ve androjene bağımlı malin hücrelerde,

androjenlerin ortamdan uzaklaştırılması ile birlikte apoptozise gidiş tetiklenmiştir ve hormona dirençli hücrelerde apoptoz gözlenmemektedir. (Kimura ve ark. 2001).

2.2.4. Diyabet

Prostat kanseri oluşumunda beslenme oldukça etkilidir ve diyete bağlı olarak yüksek miktarda yağ alımı ile prostat kanseri riski arasında bir ilişki bulunmaktadır. (Erdrich ve ark. 2015) Günümüzde yapılan çalışmalarda bazı yiyecek ve içeceklerin prostat kanseri gelişme riskini azalttığı bazı yiyecek ve içeceklerin tüketimi sonucu bu riskin arttığı tespit edilmiştir. Fazla miktarda yağ tüketimine dayalı diyetlerde uzun süreli bu tip beslenme sonucunda sirkülasyonda dolaşan androjenik stimülasyonun artma gözlenmiştir ve prostat kanser riskini artırmıştır (Jian ve ark. 2005).

Prostat kanseri yüksek kırmızı et tüketimi, sebze ve meyveden fakir beslenenlerde daha sık oranlarda görüldüğü belirtilmiştir. Ayrıca domates, kırmızı greyfurt, karpuz, yeşil çay gibi likopen bakımından zengin olan ürünler ve vitamin E, D ve selenyumun prostat kanseri oluşumu üzerindeki olumlu etkinin olduğu vurgulanmaktadır (Kristal ve ark. 2010).

2.3. Prostat Kanseri Terapötik Stratejiler

Prostat kanseri görülen hastaların büyük bir kısmının da androjene direnç geliştirebilmektedir. Prostat kanserinde özellikli de hormona dirençli prostat kanserinde (HDPK) AR'lerinin önemli bir rol oynamasında androjenik etkinin oluşması ve AR aracılığıyla mümkün olmasına rağmen dirençli prostat kanseri hücreleri AR dışındaki farklı yolları da kullanılabilmektedir. AR'üne bağımlı ve androjen reseptörüne bağımsız farklı yolların direnç gelişimi üzerindeki etkisi olarak kanser hücrelerinin çoğalmasına sebep olabilmektedir. Fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K) ve ilişkili çeşitli antiapoptotik yollar, androjen direnç geliştiren hücrelerin yaşamlarını sürdürmelerinde önemli etkiye sahiptirler (Harris ve ark. 2009). Sitokinler, epidermal büyüme faktörü, interlökin-6 (IL-6), reseptörü ilişkili molekül HER-2/neu (ErbB2), nörotransmitterler ve peptid hormonları gibi farklı bileşenlerin AR'lerini üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Liu ve ark. 2005).

İnterlökin-6 (IL-6) hücre proliferasyonu, apoptozis ve AR aktivitesinde rol oynayan non-steroidal düzenleyici olmasının yanısıra prostat kanserli hastaların serumlarında yüksek düzeyde bulunmaktadır (Day ve ark. 2017). Androjensiz ortamlarda IL-6'nın AR üzerindeki uyarıcı etkisi androjenlerin oluşturdukları etkinin yaklaşık %50 kadarı yüksek bir seviyeye gelmiştir. IL-6'nın AR üzerindeki etkisinin yanısıra PSA geni üzerinde de etkileri bulunmaktadır. IL-6, androjensiz ortamda PSA düzeyine etki ederek m-RNA seviyesini iki katına çıkmasında etkilidir ve prostat kanserinde uzun süreli IL-6 tedvisi sonucu AR ekspresyonun iki kat artmaktadır bundan kaynaklı olarak hücrelerin androjen bağlama kapasiteleride de bir artış gerçekleşmektedir (Chun ve ark. 2009). HER-2/neu epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörü ailesine ait bir moleküldür ve AR düzenlenmesinde ana rol oynamaktadır. HER-2/neu tarafından AR'nin fonksiyonunun düzenlenmesi, AR'nin DNA bağlanması ve protein stabilitesi üzerindeki etkilerle gerçekleşir. EGF tarafından, AR aktivasyonunda mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yolağı ligand bağımlı ve bağımsız olarak uyarılmaktadır (Baek ve ark. 2012, Kharmate ve ark. 2016).

2.3.1. Kemoterapi

Prostat kanserinde ilerlemiş veya metastatik evredeki hastalarda geçici bir etki oluşturan hormon baskılama tedavisi uygulanmakla birlikte tedavi açısından erken tanı oldukça önemlidir. Prostat kanseri gelişim sürecinde ve ilerlemesinde androjen hormonlar oldukça önemlidir. Birçok hastada androjen bağımsız tümörler değişik hormonal yaklaşımlara yanıt verebilirken, sistemik kemoterapi HDPK tümörleri değişik hormonal yaklaşımlara yanıt vermemektedir. Taksan ailesine üye olan kemoterapi tedavilerde HDPK'de sağ kalım etkisi gösteren birçok yeni kemoterapötik ajan tek başlarına veya kombine olarak kullanılmaktadır (Chang 2007).

Anti-kanser ajanlardan biri olan dositaksel (Taxotere (TAX 327), SWOG 9916) HDPK'de sağ kalım süresini artırdığı kanıtlanmıştır. Dositaksel bu görevi mikrotübül oluşumunu baskılayıp, hücre siklusunu durdurarak ve Bel-2'nin fosforilasyonunu sağlayıp apoptozu indükleyerek gerçekleştirmiştir. Sağ kalımı artırdığı kanıtlanırsa da dosetaksel kullanılan tedavilerden yanıt alınmaması veya belli bir cevaptan sonra tedavide ilerlemenin gerçekleşmemesi hastalarda dosetakselin etkinliğini arttıracak ikincil kemoterapötik ajanlar ve hedefe yönelik tedaviler kullanılmasına neden olmuştur (Calabro ve Sternberg 2007).

Anti-kanser ajanlardan biri olan dositaksel sonrası süreçte ilerleyen hastalıkta sağ kalıma katkısı olan kabazitaksel (Jevtana) kullanılmıştır (84). Sağ kalım üzerinde etkili olan diğer ajanlar ise abireteron ve enzalutamid (Xtandi)'dir (Scher ve ark. 2012).

2.3.2. Radyoterapi

Prostat kanseri tedavisinde birinci hedef, hastanın tedaviye nasıl cevap vereceğinin yöntemlerini araştırıp hastalığın seyri takip edilmektedir. Bunun için de hastanın rektal muayene bulguları, serbest prostat spesifik antijen (SPSA), total prostat spesifik antijen (TPSA) değerlerinin incelenmesi gerekmektedir. Prostat kanseri risk gurupları belirlenerek düşük riskli, orta riskli ve yüksek riskli (agresif) olup olmadıkları tespit edilip hastalara uygun tedavi seçenekleri uygulanmaktadır.

Prostat kanserinde tedavi seçenekleri arasında yer alan radyoterapi hastalıkların tedavi edilmesinde yüksek enerjili ışınların kullanılmasını sağlayan tedavi tekniği olarak bilinmektedir. Prostat kanseri tedavisinde kullanılan radyoterapisi erken evre prostat kanserinde eksternal radyoterapi (ERT) ve brakiterapi (BT) yöntemleri kullanılmaktadır. Bölgesel ileri kanserlerde ise hormonoterapi bunun yanı sıra ERT kullanılmaktadır (Yamada ve ark. 2015, Yılmaz ve ark. 2015). ERT yöntemi kullanılan radyasyon türüne göre sınıflandırılabilir. ERT yönteminde foton şeklinde radyasyon veya parçacık şeklinde radyasyon üreten cihazlar kullanılmaktadır.

ERT'de foton şeklinde radyasyon üreten X ışınlarının ya da parçacık şeklinde radyasyon üreten proton ve nötron tedavileri uygulanmaktadır. Eksternal parçacık radyoterapisi (EPT) yöntemi ile ışınlar tümörlü dokuya dışarıdan verildiği için hem tümörlü hem sağlam olan doku radyoterapiden etkileneceği için EPT yöntemi uygulanacak alan diğer normal dokuya zarar vermeyecek şekilde tespit edilmesi önem taşımaktadır. BT'de ise uygulanan tedavi yönteminde prostatın içine, küçük olan radyoaktif çekirdekler yerleştirilir ve bunların sayısı kanserin büyüklüğüne yerine göre değişmektedir. Bu nedenle uygulanan bu yöntem sadece prostat ile sınırlı olup diğer normal dokulara zarar vermemektedir (Nomiya ve ark. 2013, Gomez-Millan ve ark. 2015).

2.4. Prostat Kanseri Oluşumu ve Tedavisinde Temel Moleküler Mekanizmalar

2.4.1. Programlı hücre ölümü, apoptoz

Canlılar da hücrelerin bölünmesi kontrol eden mekanizmalar olduğu gibi belirli mekanizmalar yardımı ile de hücreler ölümlerini kontrollü olarak gerçekleştirebildiği öğrenilmiştir. Bu yapım ve yıkım olaylarının doğal bir denge halinde sürebilmesi için hücrede bölünme (proliferasyon)/ programlanmış ölüm(apoptoz) olayları arasında belirli dengenin sürekliliği gerekmektedir. Hücrelerde var olan bu dengenin bozulması, birçok hastalığın ortaya çıkmasında etkili olduğu belirtilmektedir.

Programlı hücre ölümü olarak kısaca ifade edilen ve ilk olarak 1972 yılında terimsel olarak kullanılan apoptoz; Yunancada apo=ayrı, ptosis=düşen anlamlarıyla ağaçtaki yaprakların gövdeden ayrılması veya çiçekten ayrılan petal olarak anlamlandırılan bir ölüm mekanizmasıdır (Elmore 2007).

Fizyolojik “programlı” hücre ölümü olarak apoptoz normal doku gelişimi ve morfogenezinde görülebildiği gibi, radyasyon, sitotoksik ajanlar ve enfeksiyon gibi hücrel stres ve hasara yol açan durumlar tarafından da tetiklenebilmektedir. Apoptotik hücre ölümü; dokuların gelişim evrelerinde, immün olaylarda, hücrelerin çeşitli seplere bağlı olarak hasarlanmasında hastalık veya zararlı ajanlara bağlı olarak ve yaşlanma sürecinde rol oynamaktadır. Nekrotik hücre ölümü ile apoptotik hücre ölümün farklı ve birirlerinden ayrılmalarını sağlayan belirleyici özellikleri bulunmaktadır. Apoptotik hücre ölümünün nükleus içinde ve hücrel morfolojide karakteristik değişiklikler meydana getirmektedir. Apoptotik hücre ölümünde; hücrenin kromatini nükleus çevresinde toplanması ile çekirdek yoğunlaşır, aktive olan endonükleazlar ile DNA internükleozomal bölgelerden parçalanmaktadır. Bu gerçekleşen olay apoptozun en özgün özelliğidir. Nekrotik hücre ölümünde ise kromatin yapısında önemli bir değişim gözlenmemektedir. Apoptotik hücre ölümünde birçok patolojik ve fizyolojik olayda önemli işleve sahiptir ve bunlar içerisinde en önemlileri ise yapım ve yıkım olaylarıdır. Özellikle dokularda yapım-yıkım olaylarının hızlı olduğu ve yaşlanan hücreler de gerçekleşen apoptoz ile yaşlanan bu hücreler ortadan kaldırılır böylece yeni oluşan hücreler için uygun çevre hazırlanmıştır (Barisic ve ark. 2003, Wyllie 2010).

Genel olarak apoptozun düzenlenmesinde rol alan genler ve gen aileleri bulunmaktadır. Bu düzenlenmede gerçekleşen bazı bozukluklar kanser başlaması, gelişimi ve metastaz gibi tümör oluşumu süreci üzerinde oldukça etkilidir. Tümör süpresör gen olarak çalışan ve apoptozu düzenleyen gen olarak bilenen p53 hücre hasarı ile birlikte DNA'ya direkt olarak bağlanmaktadır. DNA'ya bağlanması sonrasında hücre siklusunun G1 evresine etki edip bu evrede kalmasını sağlayıp onarımda rol oynamaktadır ya da hasar çok fazla ise hücreyi apoptoza yönlendirmektedir. Apoptozun regülasyonunda rol oynayan ve Bcl-2/Bax gen ailesinde pro- apoptotik ve anti-apoptotik genler tanımlanmaktadır. Antiapoptotik genler apoptoz inhibitörleri olarak tanımlanırken, proapoptotik genler ise apoptozu indükleyen olarak tanımlanmaktadır. Antiapoptotik genler: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bfl-1, Mcl-1'dir. Proapoptotik genler: Bax (Bax, Bak ve Bok) ve BH3 (Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bad, Bid gibi) olmak üzere ayrılmaktadır. Apoptozun düzenlenmesinde rol alan genler ve gen aileleri dışında üç temel grupta apoptoz üzerinde oldukça etkilidir. Bunlar proteolitik enzimlerdir (kaspazlar), ölüm reseptörleri, adaptör proteinlerdir. Ölüm reseptörleri: TNF (Tumour Necrosis Factor) reseptör gen ailesine dahildir ve TNF ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL), CD95 (APO-1/Fas), TNF-R1, DR6 bu grup içinde yer almaktadır. Adaptör proteinlerin görevi ise oluşan sinyaller reseptörler tarafından algılanır adaptör proteinler kaspazlara bağlanır ve kaspazları aktive etmektedir. TNF reseptörü-1 (TNFR1) ve Fas (CD95) bu reseptörler arasında bulunmaktadır (Renehan ve ark. 2001).

2.4.1.1. Dışsal (ekstrinsik) ve içsel (intrinsik) apoptoz sinyal yolları

Dışsal (ekstrinsik) ve içsel (intrinsik) sinyal yollarının her iki durumunda apoptoz hücre tarafından düzenlenmiş bir şekilde gerçekleşmektedir. Her iki sinyal yolağında kaspaz kaskadı aktive olur ve apoptoz hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır.

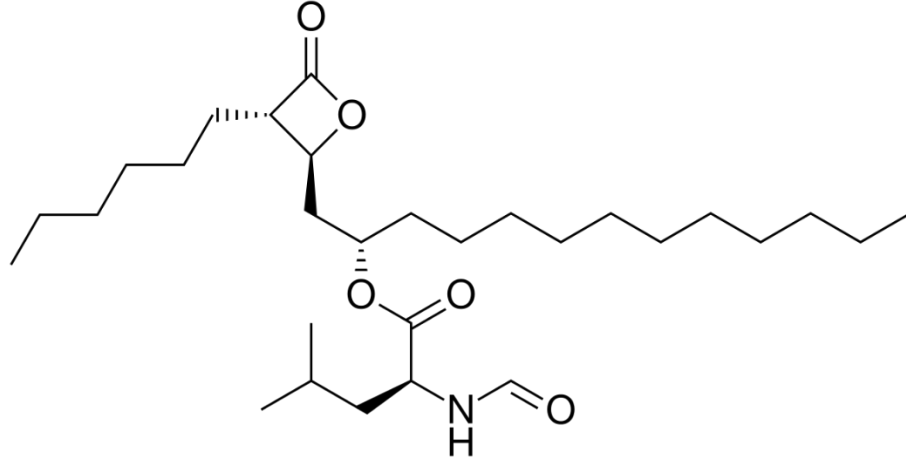
Dışsal (Ekstrinsik) apoptoz sinyal yolağı hücre yüzeyindeki, tümör nekroz faktörü (TNF) ailesine ait FAS, TNFR, DR5 ölüm reseptörleri ölüm sinyalleri olan FASL, TNF-alfa, apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) bağlanması ile sitoplazmaya kaspaz-8'i aktive eden sinyaller gönderir ve aktif kaspaz-8 ya direkt olarak kaspaz-3'ü aktive eder ya da Bid'i keserek dolaylı olarak kaspaz-9'u aktive eder sonrasında kaspaz-3'ü aktive edebilmektedir. Bu iki yol ile aktive olan kaspaz-3'ün DNA fragmentasyonuna neden olması Kaspaz aktive edici DNaz (CAD) aktivasyonu ile gerçekleşmektedir (Palmer ve ark. 2000).

İçsel (İntrinsik, mitokondriyal) sinyal yolağın da ise; hücre içinde meydana gelen sinyaller sonucunda apoptotik sinyaller algılanır Bax ve Bak'ı aktifleştirir. Böylece mitokondri membran potansiyeli değişmektedir. Bu olaylar sonucunda mitokondri membranındaki porlardan sitokrom-c, küçük mitokondri aktivatör kaspazları (SMAC)/DIABLO, Endo-G (Endonukleaz-G) ve Ca⁺⁺ salınımını için uyarılmaları sağlanmıştır. Sitokrom-c, Apoptotik proteaz aktive eden faktör (Apaf-1) adaptör proteinine bağlanarak apoptozom denen bir kompleks meydana gelmiştir. Apoptozom kaspas-9'u aktiveleştirir ve kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline gelmesini sağlamaktadır. Böylece aktif kaspaz-3 de İnaktif kaspaz aktive edici DNaz (ICAD)'ı inaktif hale getirerek CAD'ı serbestleştirip DNA fragmantasyonunun meydana gelmesini sağlamaktadır (Adrain ve Martin 2001).

2.4.2. İlaçlar ve inhibitörler

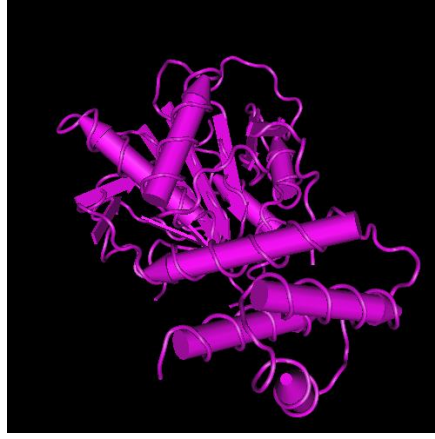
Kanser tedavisi için yardımcı olarak kullanılan bir ilaç olan metformin anti-enflamatuar özelliği ile tümör büyümesini inhibe edicidir ve metformin veya 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonukleotide (AICAR) gibi ajanların uygulaması sonucunda AMPK aktivasyonu ile anti-kanser etkiler gözlemlenebileceğine düşünülmektedir (Sajan ve ark. 2010). AMPK direkt hedefleyen A-769662 (Abbott Laboraories) gibi ajanların kanser vakalarında teropatik etkiye sahip olabileceğini gösterilmektedir. Bu ajanların AMPK'dan bağımsız olarak kanser hücrelerinde etkinlikleri araştırılmaktadır ve AMPK 'ın özelliklerine yönelik yeni teropatik hedeflerin incelenmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Goransson ve ark. 2007).

Orlistat, kanser gelişimde anti-proliferatif bir etki göstererek, apaoptozu indükleyen, kanser hücrelerinde toksik etki yaratıp normal hücrelere zarar vermeden tümör büyümesini baskılayan çok hedefli bir antikanser ve antiobesite ilaçtır.



Şekil 2. 3. Orlistat yapısal çizimi (2018).

Orlistat (Şekil 2.3.), FASN'i inhibe etmektedir. FASN aktivitesinin fazla olduğu kanser hücrelerinde orlistat hücresel FASN aktivitesinin inhibisyonunu sağlamaktadır (Şekil 2.4.) ve orlistat'ın inhibisyon etkisinin konsantrasyon bağımlı olduğu belirlenmektedir. Orlistat'ın FASN aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin konsantrasyon bağımlı olduğu ve genel olarak meme, kolon, prostat kanseri hücrelerinde anti-proliferatif etkisinin olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda FASN'ın, prostat kanseri hücrelerinde geçici olarak susturulmasının da apoptozu indüklediği ve bu nedenle Orlistat'ın FASN dışında başka hedef molekülleri de etkileyerek hücre ölüm mekizmasının aktive edilmesinde rol oynadığı belirtilmiştir. Orlistat'ın doza bağlı olarak uygulamaları sonucunda G2/M ve S fazlarında azalmaya ve subG1 popülasyonunda artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Kridel ve ark. 2004, Browne ve ark. 2006, Sarkar ve ark. 2007).



Şekil 2. 4. FASN protein yapısal thioesteraz domain yapısının çizimi (Madej ve ark. 2014).

2.4.3. AMPK

AMPK lipid ve glukoz metabolizmasını düzenleyen, artan hücrese AMP seviyeleri ile aktive olan ve hücrese metabolizma üzerinde etkili olan metabolik bir enerji sensörüdür. AMPK heterotrimer yapı olarak bir katalitik alt birim (α) ve iki düzenleyici alt birim (β ve γ) den oluşmaktadır. AMPK enerji homeostazını, tüm hücrelerin ihtiyaçlarından bir olan ATP tüketimini ve üretimini dengeleyerek korumaktadır. ATP'nin üretiminin azalması ve AMP'nin ya da ADP'nin artışları ile AMPK daha fazla ATP'nin üretilerek katabolik yola olan yönelimin sağlamaktadır. AMPK α adiponektin reseptörü gibi yapılar ile etkileşime girerek, PARP α aracılı yağ asidi sentez oksidasyon enzimlerinin yanısıra ACC ile substrat olarak kullanarak lipid metabolizmasında da beraber rol oynamaktadır (Mihaylova ve Shaw 2011). AMPK'nın ACC fosforilleyerek yağ asidi metabolizmasını kontrol ettiği bilinmektedir. Aynı zamanda SREBP, FASN ve ACC yardımı ile yağ asidi sentezinde ve metabolik bölgelerde önemli rol oynamaktadır. SREBP kesildiği bölgeden aktive olmaktadır ve AMPK SREBP'in kesilme bölgesine fosforilasyon yaparak SREBP aktivasyonunu önleyebilmektedir. AMPK'nın SREBP aktivasyonunu önlemesi, SREBP fosforillenmesini gerçekleştirerek proteolitik olgunlaşmasını ve nükleer translokasyonunu engelleyerek gerçekleştirmektedir. Buna bağlı olarak AMPK dolaylı olarak SREBP'i baskılayarak lipogenik yolda üzerinde etkin rol almaktadır (Yuan ve ark. 2009). AMPK aktivasyonunun iki aşamalı bir mekanizma tarafından düzenlendiği varsayılmaktadır. LKB1 ve CaMKK β tarafından tetiklenen AMPK aktivasyonu (α alt ünitesinde Thr172

amino asitinde fosforilasyon), prostat kanseri hücrelerinde AR kontrolünde artan lipogenik transkripsiyon faktörlerinden biri olan SREBP'ler üzerinde negatif düzenleyici etkiye sahiptir. Bu nedenle prostat kanserinde hormondan bağımsız süreci tetikleyen lipogenez nedeni sürecin durdurulabilmesine yönelik AMPK aktivatörlerinin ve AR yolağı inhibitörlerinin terapötik öneme sahip olabileceği belirtilmektedir. İlaçların etkisi ile aktive edilen AMPK pleiotrofik (tek bir genin birçok fenotipik özellik üzerindeki genetik etkisi) etkiler göstererek tümör gelişimini baskılayıcı etkilere neden olmaktadır. mTOR kompleks 1'in sinyal kaskad üyeleri tuberous sclerosis kompleks 2 (TSC) ve Raptor inhibisyonunun yanı sıra yağ asidi sentezi, kolesterol biyosentezinde azalma, hücre siklusunda tutulum ve dolayısı ile apoptoz ve otofaji sonuçlarının hücrelerde ortaya çıkmasına neden olmaktadır . Bu sonuçların tersine AMPK kaybı tümör ilerleyişini de tetikleyebilmektedir. Yukarı sinyal yolu mekanizmasında bulunan LKB1'in kaybı PIN (prostatik intraepitel neoplazi) oluşmasına neden olabilmektedir. Böylece aktive olmuş AMPK bir kerede birden fazla onkojenik yolu kapatabilmektedir (Shackelford ve Shaw 2009, Zadra ve ark. 2010, Zadra ve ark. 2014).

2.4.3. PI3-kinaz/Akt ve mTOR Sinyal Yolakları

Fosfatidilinositol-3 kinazlar (PI3K) / protein kinaz B (Akt) / mammalian target of rapamycin (mTOR) sinyal yolu, hücre büyümesi ve hücre döngüsünün düzenlenmesi, proliferasyon, sağkalım, farklılaşma, hücre iskeleti değişiminin düzenlenmesi ve tümörgenezde yer alan birçok fonksiyonu olan hayatta kalma yolu olarak bilinmektedir. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu bu düzenleme fonksiyonları üzerinde direkt ya da dolaylı olarak önemli rol oynamaktadır. Ayrıca bu sinyal yolunun triasilgliserolün sentezinde ve salgılanmasında önemli rol oynadığı belirlenmiştir. PI3K-Akt-mTOR sinyal yolu inhibitörleri incelendiğinde ise, hücre içerisinde lipid birikimini ve de novo yağ asidi sentezinde görev alan genetik materyal içindeki protein miktarı azaltmıştır. Aynı zamanda bu sinyal yolu inhibitörleri yağ asidi oksidasyonunda sırasında rol oynayan transkripsiyonel faktörleri ve protein seviyesi arttırmıştır. Sonuç olarak PI3K-Akt-mTOR sinyal yolu inhibitörler tarafından baskılanarak, yağ asidi oksidasyonunun artması ve lipid üretimi, lipogenezin azalmasına neden oldukları belirlenmiştir (Liu ve ark. 2016).

PI3K'lar, hücre büyümesi, sağkalım regülasyonunda, diagliserol ve inositol içeren lipidlerin fosforilasyonunun gerçekleştirmektedir. PI3K'ın fonksiyonlarının düzenlenmesinde tirozin kinazlar ile meydana gelen sinyallerin oldukça etkili olduğu bilinmektedir. PI3K'ın, primer in vivo substratları fosfatidil inositol 4,5 bifosfat (PIP2) iken bunu ikincil haberci ise fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfat (PIP3)'tür ve PIP2'nin fosforilasyonu ile PIP3 meydana gelmektedir. PI3K'ın bir formu G protein reseptörlerinin integrin ve sitokin reseptörlerinin uyarılması ile aktive edilirken diğer formu SH2 domainlerine sahiptir ve reseptör protein tirozin kinaz tarafından aktive edilmektedir. PIP3'ün ana hedefi, hücre çoğalması ve sağkalımında çok kritik olan bir protein serin/reonin kinaz yani Akt'tır. Akt PH ve kinaz domenlerinin etkileşimleri sebebiyle inaktif durumda bulunmaktadır. Akt'nin PH domenine PIP3 bağlanır ve diğer bir PH domain olan 3-fosfoinositid bağımlı protein kinaz 1 (PDK1), AKT'yi fosforiller ve Akt'ın aktivasyonu için aynı zamanda ikinci bir yerde fosforilasyona gereklidir ve bu da mTOR kompleksi rictor tarafından sağlanmaktadır. Ayrıca Akt'ın hem İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) hemde tümör süpressör olarak adlandırılan tensin homolog (PTEN) kaynaklı anti-apoptotik yolaklar üzerinde etkinliği belirlenmiştir.

PI3K/AKT sinyal yolunun aktivasyonu ya da PTEN kaybı agrasif prostat kanserlerinde sıklıkla rastlanılmaktadır. Akt fosforile olduğunda sağkalımı ile ilgili düzenleyici proteinleri ve transkripsiyon faktörleri gibi birçok hedef proteini fosforlamaktadır. Akt'ın hedeflediği transkripsiyon faktörleri FOXO ailesi üyeleridir. Akt'ın diğer hedefi protein kinaz GSK-3 β 'dır ve hücre çoğalması aynı zaman da sağkalımı düzenlemektedir (Guertin ve Sabatini 2007).

mTOR yolağı, PI3K/Akt yolağındaki birçok sinyal ile kontrol edilir ve hücre büyümesinde merkezi rol oynamaktadır. mTOR hücrede iki farklı kompleks halinde bulunmaktadır. Bu yapılar da mTOR ya rictor ya da raptor ile uyumluluk göstermektedir. mTOR/rictor kompleksi Akt'ı fosforile ve aktive eden protein kinazlar olarak bilinmektedir. Bunun aksine mTOR/raptor kompleksi Akt'ın alt yolakları ile aktive olur ve mTOR/raptor kompleksi Ras-bağlantılı GTP bağlayan protein Rheb tarafından düzenlenmektedir. (Zhou ve ark. 2004, Kumar ve ark. 2014, Liu ve ark. 2016).

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal sarflar, cihazlar, yazılımlar, hücre kültürü donanımları, antikorlar, kitler ekler bölümünde yer almaktadır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Kullanılan Hücreler ve Özellikleri

PC3 (ATCC CRL-1435); adenokarsinomlardan türevlenen kemiğe metastaz yapabilen, androjenlere, glukokortikoidlere veya epidermal veya fibroblast büyüme faktörlerine cevap oluşturmayan ve biyokimyasal değişikliklerin araştırılmasında ve kemoterapatik ajanlara cevaplarının değerlendirilmesinde kullanılan prostat kanseri hücre hattıdır.

PNT1A (ECACC 95012614); anaploid, adherent, insan prostat epitel hücre hattıdır.

3.2.2. Hücre kültürü

Prostat kanser hücresi olan PC3 (ATCC CRL-1435) ve prostat epitel hücresi PNT1A (ECACC 95012614), %5 CO₂ içeren nemli 37 °C'lik etüvde RPMI besi yerinde %10 fetal sığır serumu ve 10 U/ml Penisilin/Streptomisin ile büyütülmüştür. Petri içerisindeki hücre sayılarının artması ile hücrelerin pasajlama işlemi için ortamdan besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 75 cm²'lik petri kaplarında 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanılmıştır. 75 cm²'lik petri kaplarına 2 ml tripsin-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) ile CO₂ içeren nemli 37 °C'lik etüvde 5 dakika bekletilmiştir. Hücrelerin bu süre boyunca zarar görmesinin engellenmesi için hücrelerin üzerine RPMI besiyeri eklenerek tripsinin inaktif hale gelmesi sağlanır. Kalkmış halde petri kabında bulunan hücreler yıkama yapılarak 15 ml'lik falkon tüpe alınır 500 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra hücrelerin üzerine 1 ml RPMI besiyeri eklenerek pipetaj yapılır ve homojen bir hücre

süspansiyonu elde edilmiştir. Neubauer hemositometresinin kanalına hücre süspansiyonundan 10 µl alınmıştır ve üzeri lamel ile kapatılmıştır. Hemositometrede bulunan 25 karede içerisindeki hücre sayısı sayılmış ve 10^4 ile çarpılarak 1 ml'deki hücre miktarı hesaplanmıştır. 75 cm²'lik petri kaplarına 8×10^5 hücre ekilerek pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. AMPK α susturulması:

Prostat kanser hücresi olan PC3 (ATCC CRL-1435) ve prostat epitel hücresi PNT1A (ECACC 95012614), 6 kuyucuklu petriye 2×10^5 hücre olacak biçimde ekim yapılmıştır ve morfoloji almaları için 37°C'lik CO₂ etüvde bir gün boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra hücrelere 1:3 oranında 1 µg plazmit ve 3 µl FuGENE® HD Transfection Reagent eklenerek 48 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. 48 saat sonrasında petrideki besiyeri çekilip atılarak bu plazmid için uygun antibiyotik olan Puromycin'i 0,5 µM içeren besiyeri petriye konularak etüvde üç gün boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra 0,5 µM Puromycin içeren besiyeri çekilerek sıra ile beş günlük bekleme süresi ile 1 µM, 1,5 µM ve 2 µM Puromycin içeren besiyeri petriye konularak hücre yoğunluğu ve sitotoksositeye bakılmıştır. Hücrelerin selekte olduğu uygun Puromycin dozu belirlendikten sonra stabil koloniler seçilerek bu kolonideki hücreler 96 kuyucuklu petriye alınıp büyümeleri için etüvde inkübe edilmiştir ve bölünen hücreler T25'lik petriye aktarılarak büyümeleri sağlanmıştır. Elde edilen hücre hatlarından protein izolasyonu yapılmıştır ve immunoblotlama tekniği ile AMPK α protein seviyesi kontrol edilmiştir.

3.2.4. Doza ve zamana bağlı hücre canlılık testi (MTT testi)

Prostat kanser hücresi olan PC3 (ATCC CRL-1435) ve prostat epitel hücresi PNT1A (ECACC 95012614), 96 kuyucuklu petrinin her kuyucuğuna 1×10^4 hücre olacak şekilde ekildikten sonra, yapışması için bir gece boyunca 37°C 'lik CO₂ etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler üzerine 0-100 µM Orlistat uygulanmıştır. Hücreler 24 saat 37°C bekletilir. 24 saat sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerine 10 µl MTT ajanı, her kuyucuğa olacak şekilde eklenir ve 4 saat boyunca 37°C' de örnekler etüvde tutulmuştur. Daha sonra üzerinde tüm besiyeri çekilir ve her kuyucuğa 100 µl DMSO eklenilir ve karanlıkta 5 dakika bekletilmiştir. Mikroplaka ELİSA okuyucuda 570 nm ve 655 nm'de iki dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır.

3.2.4. Yara iyileşmesi deneyi

Prostat kanser hücresi olan PC3 (ATCC CRL-1435) ve prostat epitel hücresi PNT1A (ECACC 95012614), 6 kuyucuklu petriye 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiş ve inkübe edilmiştir. Petri tabanı ertesi gün 1000 μ l'lik pipet ucu ile hücreler olduğu yerde kalacak şekilde çizilmiştir ve oluşan yarıkların boyutu mikroskop yardımı ile ölçülmüştür. 15 μ M ve 20 μ M Orlistat uygulanan örnekler 24 saat boyunca 37°C 'lik CO₂ etüvde inkübe edilmiştir. Petri tabanında oluşturulan yarıklar ertesi günü tekrardan mikroskopta ölçülmüştür.

3.2.5. Hücre içi reaktif oksijen türevlerinin belirlenmesi

Prostat kanser hücresi olan PC3 (ATCC CRL-1435) ve prostat epitel hücresi PNT1A (ECACC 95012614), 60 mm'lik petrilere 6×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler yapışması için 37°C' lik CO₂ etüvde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücrelere 24 saat süre ile 15 μ M ve 20 μ M Orlistat uygulanmıştır. H₂DCFDA boyası 30 dakika boyunca 5 μ M konsantrasyonda hücrelere uygulanmıştır. Hücreler tripsin ile muamele edilerek 1xPBS çözeltisinde çözdürülüp akış sitometrisinde analiz edilmiştir.

3.2.6. Hücre devrinde tutulu kalan hücre popülasyonunun belirlenmesi

Prostat kanser hücresi olan PC3 (ATCC CRL-1435) ve prostat epitel hücresi PNT1A (ECACC 95012614), 60 mm'lik petrilere 6×10^5 hücre ekilmiştir. Hücreler yapışması için 37°C'lik CO₂ etüvde bir gün boyunca inkübe edilmiştir. Hücrelere 24 saat süre ile 15 μ M ve 20 μ M Orlistat uygulanmıştır. 24 saat sonrası tripsin uygulaması ile kaldırılan hücreler bir gece boyunca %70 etanol içerisinde -20°C' de tutulmuştur. Fikse edilen hücrelerden etanol uzaklaştırılmıştır ve hücreler 1x PBS çözeltisi içerisinde çözdürülüp 2,5 μ M PI boyası eklenerek 20 dakika boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Hücre akış sitometrisinde analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol) boyama

Prostat kanser hücresi olan PC3 (ATCC CRL-1435) ve prostat epitel hücresi PNT1A (ECACC 95012614), 6 kuyucuklu petriye 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir ve yapışması için bir gece boyunca 37 °C'lik CO₂ etüvde inkübe edilmiştir. Yapışan hücrelere 15 μ M ve 20 μ M Orlistat uygulanmıştır. Hücrelerin besiyeri 5 mg/ml DAPI

içeren medya ile değiştirilmiş ve 10 dakika bekletilmiştir. DNA'ya bağlanan boya floresan mikroskobunda eksitasyonu 350 nm ve emisyon 420 nm'de mavi olarak görüntülenmiştir.

3.2.8. DiOC6 (3',3-Dihexiloksakarbosiyenin İyodür) boyama

Prostat kanser hücresi olan PC3 (ATCC CRL-1435) ve prostat epitel hücresi PNT1A (ECACC 95012614), 6 kuyucuklu petriye 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiş ve yapışması için bir gece boyunca 37°C ' lik CO_2 etüvde inkübe edilmiştir. Yapışan hücrelere $15\ \mu\text{M}$ ve $20\ \mu\text{M}$ Orlistat uygulanmıştır. Hücrelerin medyası $4\ \text{nM}$ DiOC6 içeren medya ile değiştirilip 15 dakika boyunca bekletilmiştir. Sağlıklı mitokondri membranını boyayarak canlı hücrelerin seçimi sağlanmıştır. Sağlıklı mitokondri membranına sahip hücreler 15 dakika sonunda floresan mikroskobunda eksitasyonu 488 nm, emisyon 525 nm'de yeşil olarak görüntülenmiştir.

3.2.9. Koloni oluşumunun kristal viyole ile gösterilmesi

Prostat kanser hücresi olan PC3 (ATCC CRL-1435) ve prostat epitel hücresi PNT1A (ECACC 95012614), 6 kuyucuklu petriye 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiş ve yapışması için bir gece boyunca 37°C ' lik CO_2 etüvde inkübe edilmiştir. Yapışan hücrelere $15\ \mu\text{M}$ ve $20\ \mu\text{M}$ Orlistat uygulanmıştır. 24 saatlik ilaç uygulaması sonunda hücrelerin normal medya ile değişimi yapılmıştır. Kuyucuklardaki medya 14 gün sonunda uzaklaştırılarak 1xPBS ile yıkanmış ve 3 ml %100 metanol, 1 ml asetik asit ile 5 dakika inkübe edilmiştir. Fiksasyon sonucunda hücreler Kristal viyole ile boyanmış ve görüntülenmiştir.

3.2.10. Total protein izolasyonu

Prostat kanser hücresi olan PC3 (ATCC CRL-1435) ve prostat epitel hücresi PNT1A (ECACC 95012614), $100\ \text{nm}$ 'lik petrilere $1,5 \times 10^5$ hücre olacak biçimde ekim yapılmış ve yapışması için 37°C 'lik CO_2 lik etüvde bir gün boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler $15\ \mu\text{M}$ ve $20\ \mu\text{M}$ Orlistat uygulanarak 24 saat boyunca etüvde tutulmuştur. Hücreler, 24 saat sonrasında 1xPBS çözeltisi kullanılarak kazıma yöntemi ile petriden toplanmış ve 2 dakika süre ile $13200\ \text{rpm}$ 'de santrifüj işlemi ile çöktürülmüştür. Bu işlem petrideki tüm hücreler toplanıp çöktürülüne kadar tekrarlanmaktadır. Santrifüj ile çöktürülen hücrelere lizis tamponu ilave edilmiştir.

Örnekler, 20 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilmiş ve daha sonra 20 dakika da 16000 rpm'de +4°C' de santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni ependorf tüpüne alınarak -80°C' de saklanılır.

3.2.11. Fosfatlanmış proteinlerin izolasyonu

Prostat kanser hücresi olan PC3 (ATCC CRL-1435) ve prostat epitel hücresi PNT1A (ECACC 95012614), 100 nm'lik petrilere $1,5 \times 10^5$ hücre olacak biçimde ekim yapılmış ve yapışması için 37°C'lik CO₂ etüvde bir gün boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra hücrelere 15 µM ve 20 µM Orlistat uygulanarak 24 saat boyunca etüvde tutulmuştur. Hücreler 24 saat sonrasında, 1xTBS çözeltisi kullanılarak kazıma yöntemi ile petriden toplanarak 2 dakika boyunca 13200 rpm'de santrifüj işlemi ile çöktürülmüştür. Bu işlem petrideki tüm hücreler toplanıp çöktürülüne kadar tekrarlanmaktadır. Santrifüj ile çöktürülen hücrelere 1x fosfostop eklenmiş ve lizis tamponunda ilave edilmiştir. Örnekler 20 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Daha sonra 20 dakika da 16000 rpm'de +4°C' de santrifüj edilmiş ve üst faz yeni ependorf tüpüne alınarak -80°C' de saklanır.

3.2.12. Protein miktar tayini

Protein miktarının belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmış ve 96 kuyucuklu petri kullanılarak konsantrasyonu 1,5 µg/ml olan Bovine Serum Albumin (BSA), artan miktarlarda kullanılarak önce standart bir eğri oluşturulmuştur. Eğri oluşturulurken 1,5 µg/µl, 3 µg/µl, 4,5 µg/µl, 6 µg/µl ve 7,5 µg/µl BSA üzerine 200 µl Bradford solüsyonu ilave edilmiştir. 96 kuyucuklu petri kullanılmaya devam edilerek her örnekten 1 µl konulmuş ve üzerine de 200 µl Bradford solüsyonu ilave edilmiş karanlıkta 5 dakika süre ile bekletilmiştir. Örnekler 595 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucuda okutulmuştur. Oluşan absorbans değerleri kullanılarakta protein konsantasyon değerleri elde edilmiştir.

3.2.13. İmmunoblotlama tekniği ve protein düzeylerinin belirlenmesi

Bu teknik için, konsantrasyonu hesaplanan proteinler Laemmli (5X) yükleme tamponu ve 50 µg protein örnekleri 1:5 oranında karıştırılarak 95°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Hazırlanan proteinler %12'lik akrilamid/bisakrilamid jele belirlenen konsantrasyonlarda yüklenerek yürütme tamponu olan tankta 85V 'ta yürütülmüştür.

Yürütülen proteinler transfere alınmadan önce kullanılacak polivinilden florid (PVDF) membranlar metanol ile aktif hale getirilmiştir. Jeldeki proteinler, transferi gerçekleştiren makine ile 2,5 mA'da 7 dakika boyunca membrana transfer edilmiştir. Transfer işlemi sonrası membranlar, 1 saat oda sıcaklığında %5'lik yağsız süt tozu (%0,1 Tween 20 içeren 1xTBS) içerisinde çalkalayıcıda bekletilmiştir. Sütte bekleyen membranlar 1:1000 olarak hazırlanan primer antikorida bir gün boyunca +4 °C' de bekletilmiştir. 1:1000 olarak hazırlanan primer antikor işaretlemesinden sonra membran ikinci antikora alınmadan önce 7 dakika olarak üç kez 1xTBS-T çözeltisi ile yıkanmıştır. Daha sonra membran ikincil antikor ile bir gün boyunca +4°C' de inkübe edilir. Membran TBS-T çözeltisi ile iki kez ve TBS çözeltisi ile bir kez muamele edilmiştir. Membrandaki antikor ile muamele edilmiş protein bant görüntülemesi Chemidoc-MP ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.14. Protein saflaştırma (clean-up)

Total protein izolatından tuz, lipid, deterjan gibi kontaminasyona sebep olan ajanların ayrılması için protein temizleme basamağı olan ReadyPrep 2D Cleanup Kit (Bio – Rad) kullanılmıştır. Elde edilen proteinler, Cy Boyaması için, DIGE lizis tamponu içinde (9M üre, %4 CHAPS ve 30mM Tris, pH 11) çözdürülmüştür. RIPA kiti ile izolasyonundan elde edilen proteinlerin saflaştırılması sonucunda protein örneği için en az 500 µg toplam protein miktarı olarak elde edilmiştir. Clean-up için her bir örnekten 500 µg kullanılmıştır. Clean-up sonrası elde edilen pellete uygun miktarda Rehidratasyon tamponu ekleyerek çözdürülmüş ve 30 saniye boyunca vortexlenmiş ve oda sıcaklığında 3-4 dakika bekletilmiştir. Pellet tekrar 1 dakika boyunca vortexlenmiş ve pipetaj yapılarak çözdürülüp 5 dakika boyunca 18.000 rpm de oda sıcaklığında santrifüj edilmiş ve üst faz yeni mikrofüj tüpüne alınarak -80°C' de saklanmıştır. Elde edilen protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlenmiştir.

3.2.15. Cy boyası ile floresans işaretleme

Protein izolasyonu ve saflaştırma işlemlerinin ardından, örnekler lizin spesifik Cy (CY3, CY5 ve CY2) boya ile boyanmıştır. Örnekler, DMF (Dimetylformamide) ve Cy boya ile hazırlanan floresan boya (Cy3, Cy5 ve Cy2) uygulanmıştır. Boya anastok 1 mM olacak şekilde 25 µl DMF'te çözülmüştür. Çalışmamızda PC3 doğaltip ve orlistat, PC3 AMPKα susturma gerçekleştirilmiş ve/veya orlistat uygulanmış

şekilde optimize edilmiştir. Her bir set ayrıca PNT1A prostat epitel hücre hattı için Boyama aşamasının ardında, Cy boyalarının protein örneklerine bağlanmasını engellemek ve aktivitesini sonlandırmak için her bir örneğe 1 µL- 10µmol L-lizin (Sigma, USA) eklenmiş ve 10 dakika buzda bekletilmiştir. Bu basamakta gerçekleştirilen tüm işlemler karanlıkta gerçekleştirilmiştir.

3.2.16. 2D- DIGE Protokolü

Örneklerin Cy boyaları ile boyanmasının ardından 2D-DIGE protokolünün basamakları olan rehidrasyon, 1. boyut izoelektrik odaklama, 2. boyut SDS-PAGE işlemleri ve boyama gerçekleştirilmiştir. Bu basamakların hepsinde, gerekli olan solüsyonların tamamını içeren ReadyPrep 2-D Starter Kit (Bio-Rad, USA) ve önerilen protokol kullanılmıştır. 2D-protokol optimizasyonunda tüm örneklerde Cy3 ve C5 kontrol vs orlistat uygulanmış veya AMPKa+ vs AMPKa- örnekler yer değiştirerek veriler iki kez elde edilmiştir. Her iki örnek için ortak spot Cy2 ile doğrulanmıştır.

3.2.17. Rehidrasyon ve İzoelektrik Odaklama (IEF)

Cy boyalar ile boyanmış protein örnekleri, 1. boyut izoelektrik odaklama için, odaklama plakasında (FocusingTray, Bio-Rad, USA) belirtilen + ve - yüklü elektrotların üzerine gelecek şekilde konuldu. Protein örneklerine rehidrasyon tamponu (8M üre, %2 CHAPS, 50 mM DTT, %0,2 (w/v) Bio-Lyte 3/10 amfolit ve Bromofenol Mavisi eklendi. Readystrip IPG Strips (Bio-Rad) plakadaki + ve - yerler ile eşleşecek şekilde yerleştirilerek örneklerin IPG striplerdeki jelle emdirilmesi gerçekleştirildi. Çalışmamızda ilk olarak pH 3-10 arasındaki IPG stripler kullanılmış, ardından proteinlerimizin yoğunlaştığı pH aralıklarında tekrar edilerek en uygun ayırım gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Rehidrasyon ve izoelektrik odaklama PROTEAN IEF Cell cihazında (Bio-Rad), üretici firmanın önerdiği koşullarda gerçekleştirilecektir. Odaklama plakasında yaklaşık 12 saat rehidrasyon aşaması ve ardından 6-8 saat izoelektrik odaklama aşaması gerçekleşmektedir. 20°C'de 250 V da 20 dk lineer akımda ardından 2 saat 4000 Volt lineer akımda olmak üzere toplamda 5 saat 14000 Volt hızlı akımda IEF basamağı gerçekleştirilmiştir. Bu basamaklarda jelin kurummasının ve bozulmasının engellenmesi için sribin tamamının üzerine gelecek miktarda mineral yağ eklenmiştir.

3.2.18. Denge sağlanması (equilibration) ve 2D Jel

Proteinlerin pI noktalarına göre 1. boyut odaklama işleminin ardından SDS-PAGE işlemine geçmeden önce proteinlerin denge basamağından (equilibration) geçmeleri gerekmektedir. Bu basamakta proteinlerin SDS ile denature olmaları, DTT ile disülfid bağlarının redüklenmesi ve iodoasetamid ile alkillenmeleri sağlanarak yeniden disülfid bağları oluşturmaları engellenir. İlk olarak odaklama plakasından alınan IPG Stripleri rehidrasyon/denge sağlama plakasına (rehydratation/equilibration tray) alınır ve üzerine Denge Tamponu I (6M Üre, %2 SDS, 0.375M Tris-Hcl (pH 8.8), %20 Gliserol ve %2 DTT) eklenir ve 15 dakika oda sıcaklığında çalkalanır. Ardından Denge Tamponu II (6M Üre, %2 SDS, 0.375M Tris-Hcl (pH 8.8), %20 Gliserol ve iodoasetamid) eklenerek yeniden 15 dakika oda sıcaklığında çalkalanır. Bu aşamadan itibaren SDS-PAGE aşamasına geçilmiştir. Bu amaçla, %30 Akrilamid/Bisakrilamid, Tris pH (8.8), %10 SDS, %10 APS, TEMED ve distile sudan oluşan %12'lik Poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Rehidrasyon/Denge sağlama plakasından alınan strip, Tris-Glisin ve SDS içeren yürütme tampon ile yıkandıktan sonra hazırlanan jelin üzerine, yürütme tamponu ile yıkanan IPG strip yerleştirilmiştir ve IPG stripin yanında kalan kısmına filter kağıdına emdirilmiş protein markırı da yüklenmiştir. SDS-PAGE jelin üzeri % 0,8'lik Agaroz çözeltisi (1X TAE, Agaroz ve Bromofenol mavisi) ile kapatılmıştır. Hazırlanan jel, Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad) kasedine yerleştirilir, Tris-Glisin-SDS yürütme tampon ile doldurulmuştur ve 200V'da 1 saat yürütülmüştür.

3.2.19. Boyama

Jelin yürütme işleminin ardından, IPG Stripi jelin üzerinden ayrılır ve SDS' den arındırmak için birkaç kez distile su ile yıkanarak boyama solüsyonun (Coomassie Blue ya da SYPRO Ruby Protein Gel Stain) içine alınarak 1 saat bekletildi. Boyama işleminin ardından jel su içerisine alınarak 15-30 dakika arasında boyadan arındırma işlemi gerçekleştirildi. Çalışmanın bu aşamasında, prostat kanseri/epiteli doğal tip ve AMPK α ifadesinden yoksun olan hücrelerden elde edilen 2D-DIGE jeline ait görüntü eldesi ve önemli oranda değişkenlik gösteren protein spotlarının analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.20. Görüntü eldesi

2D-DIGE jellerine ait görüntü ChemiDoc MP (Bio-Rad) cihazında elde edilir. Cy2 ile boyalı protein noktaları 488 nm emisyon filtresi, Cy3 ile boyalı protein noktaları 532 emisyon filtresi ve Cy5 ile boyalı protein noktaları 635 nm emisyon filtresinde floresans ışına göstermektedir.

3.2.21. Biyoinformatik Analiz

Data analizleri PDQuest Gelişmiş 2-D analiz programı (Bio-Rad) ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen protein spotlarının kıyaslanması, birkaç farklı yönden gerçekleştirilmiştir. İlk olarak her bir jelin uygun floresans dalga boyunda ayrı ayrı görüntüsü alınmıştır ve bu görüntü tek jel üzerinde çoklu olarak birleştirilmiş dalga boyundaki görüntü ile kıyaslanmıştır. Daha sonra aynı örneğe ait olarak Cy3 ve Cy5 ile boyanmış örneklerin spot hacimlerinin internal kontrol Cy2 ile boyanmış örneklerin spot hacimlerine oranlanması ile normalize edilmiştir. Kontrol grubuna ait veriler, AMPK α ifadesi azalması ile elde edilen veriler ile karşılaştırılarak değişiklik göstermeyen ya da değişiklik oranı uygun olmayan noktalar elemine edilmiştir. Spotların gruplanma sürecinin sonunda scatter-plot analizi ile artan ya da azalan protein spotları belirlenmiştir. Her bir protein için elde edilen ortalama spot hacimleri hiyerarşik gruplama ve ikili karşılaştırma ile analiz edilmiştir. Protein spotlarının hacminde internal standart protein spotu hacmine kıyasla **en az iki kat artış** ya da **azalış** gösteren ve p değeri 0.05'in altında olan spotlar önemli olarak adlandırılacak, hiyerarşik kümeleme ile gruplanmış ve ardından

KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>),

BioCarta (http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta_Pathways) ya da

Reactome (<http://www.reactome.org/>) gibi yolak analizlerinin yapılabileceği programlarda hangi yolaklarda etkili oldukları belirlenmiştir. Swissprot veri tabanı üzerinde 2D-DIGE ile ilgili birçok ayrıca uygulama tanımlanmıştır. Gerekli görülmesi durumunda süreç diğer uygulamalar ile irdelenecektir.

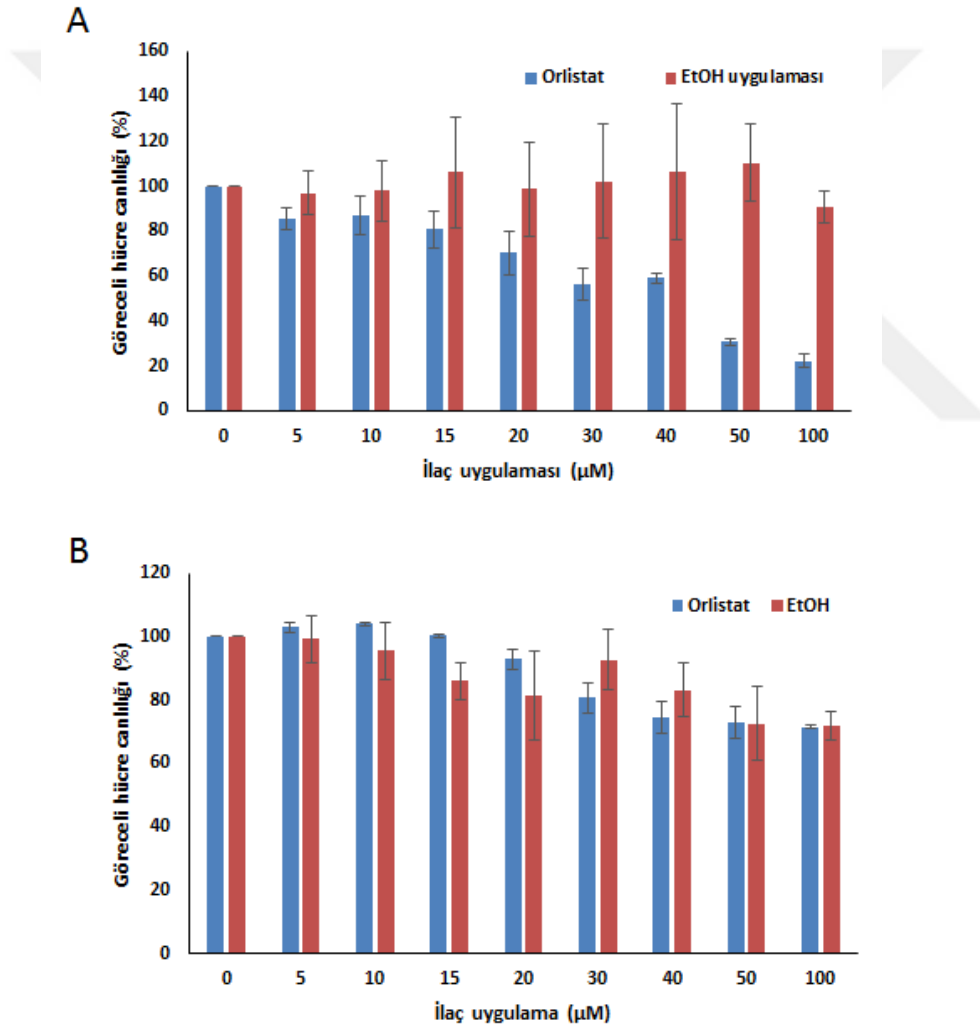
3.2.22. İstatistiksel analiz

Her bir uygulamanın etkisine yönelik elde edilen sonuçlar Graphpad programı aracılığı ile veri sayısı ile uyumlu istatistiksel yöntemlerle incelenerek ve grafik/tablo olarak sunularak PDQuest programı ile spotların kantitatif verileri elde edilebilmektedir.



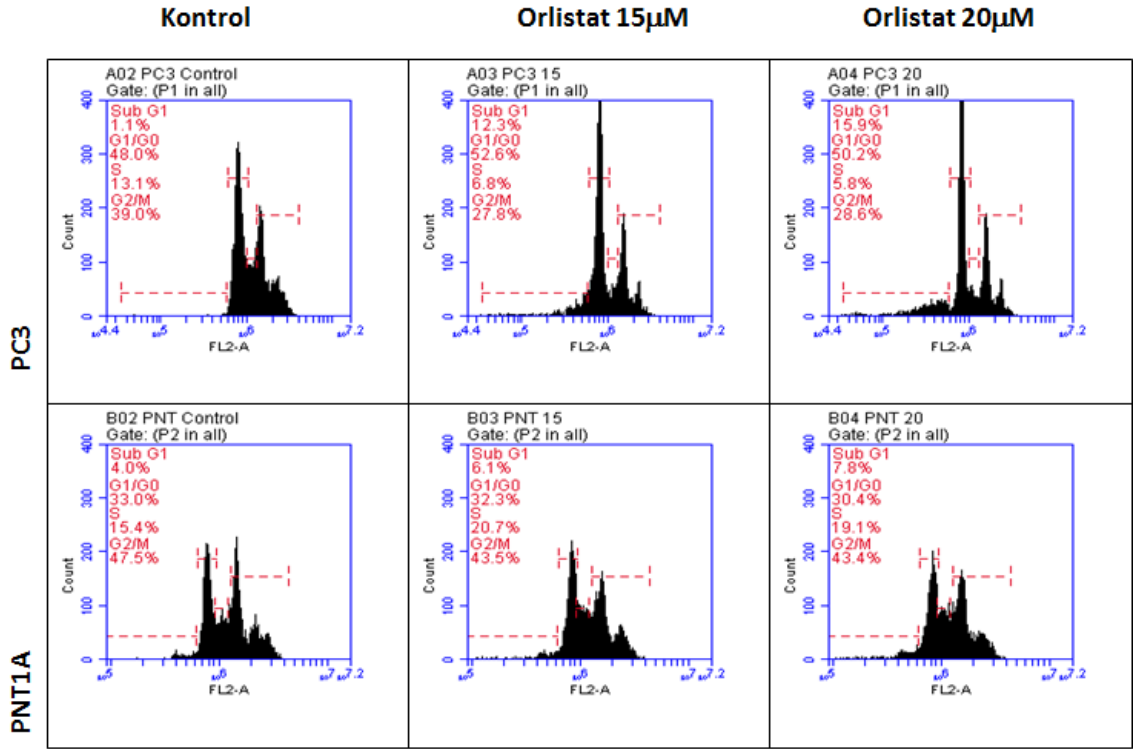
BÖLÜM 4. SONUÇLAR

Bu verilere göre Orlistat doza bağımlı bir şekilde PC3 prostat kanseri hücrelerinde hücre canlılığına etki etmiştir. MTT testi sonuçlarına göre benzer etki Etanol uygulaması sonucunda görülmemiştir (Şekil 4.1). Bu bulguların tersine bir şekilde Orlistat PNT1A hücrelerinde 0-100 μM etkili değildir. Orlistat uygulaması, taşıyıcı ajan Etanol uygulaması ile benzer bir hücre canlılığında etki göstermiş ve bu etki istatistiksel olarak uygulama yapılmayan kontrol hücrelerine göre anlamlı görülmemiştir ($p>0,05$).



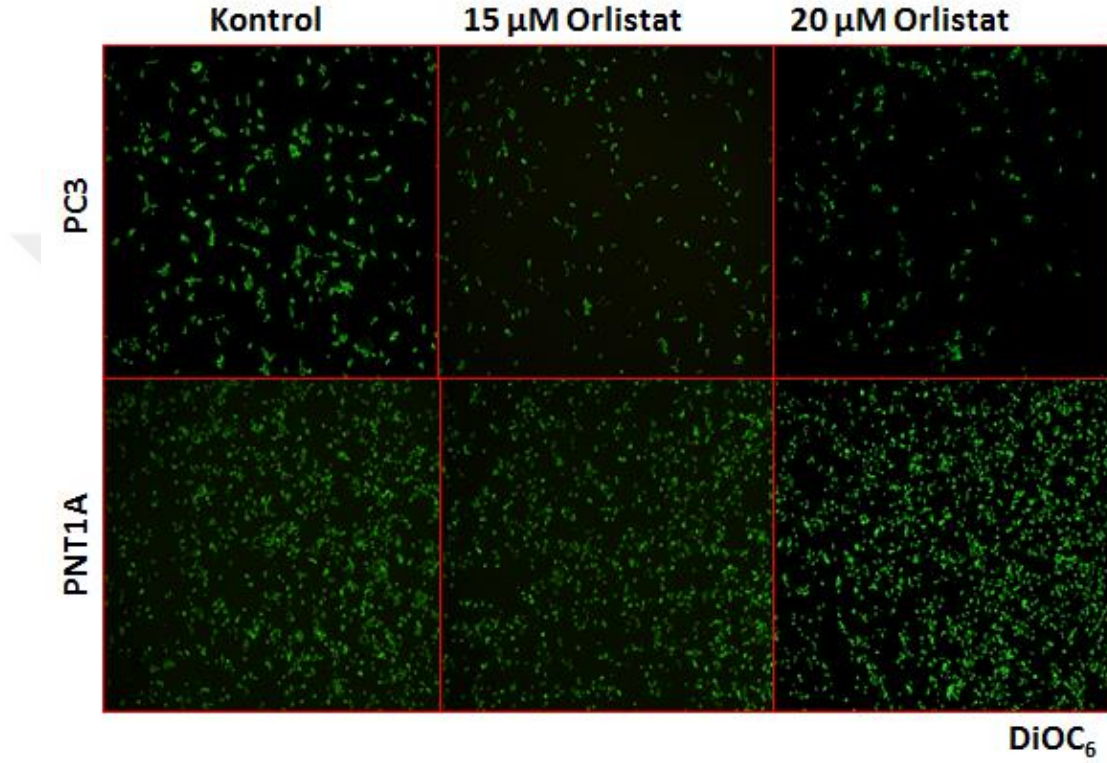
Şekil 4 1. PC3 (A), PNT1A (B) hücre hatlarında Orlistat uygulaması 24 saat boyunca gerçekleştirildikten sonra MTT hücre canlılığı testi ile göreceli canlılık analizi yapılmıştır. Etanol uygulama vektörüdür ve sonuçların ortalama \pm std. hata olarak sunulmuştur.

Orlistat için seçilen dozlar her iki hücre hattında uygulanmak üzere 15-20 μM seçilmiş olup, PC3 ve PNT1A hücrelerinde 24 saat boyunca uygulanmıştır. Orlistat her iki doz uygulamasında PC3 hücrelerinde G1/S aşamasında ket vurucu etki göstermiştir (Şekil 4.2). PNT1A hücrelerinde ise seçili dozlarda hücre siklusunda uygulama yapılmayan kontrol hücrelere göre değişim görülmemiştir. Bu sonuçlar orlistat'ın yüksek metastatik özellik gösteren PC3 hücrelerinde etkili olmasından ötürü olumlu olarak değerlendirilmiştir.



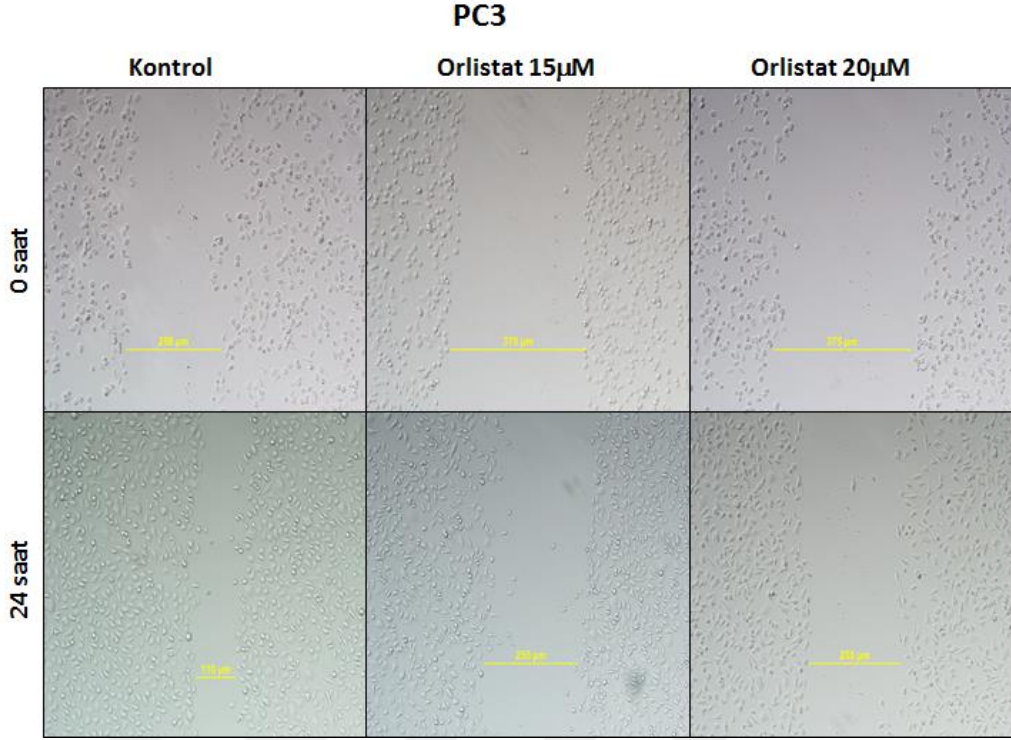
Şekil 4 2. Orlistat uygulaması sonucunda hücre siklusu değişimlerinin PC3 ve PNT1A hücrelerinde gösterilmesidir. 24 saat sonrasında fikse edilen hücreler PI ile boyandıktan sonra hücre sitometrisinde analiz edilmiştir.

Hücre siklusu ile birlikte hücrelerde Orlistat uygulamasına takiben mitokondri membran potansiyeli (MMP) değişimleri DiOC6 floresan boya ile tanımlanmaya çalışılmıştır. Hücrelerde DiOC6 pozitifliği PC3 prostat kanseri hücrelerinde 24 saat ilaç uygulamasında doza bağımlı bir şekilde azalma gösterirken, PNT1A prostat epitel hücrelerinde ise canlılık testinde ve hücre siklusu test sonuçlarına benzer bir şekilde değişim görülmemiştir (Şekil 4.3).



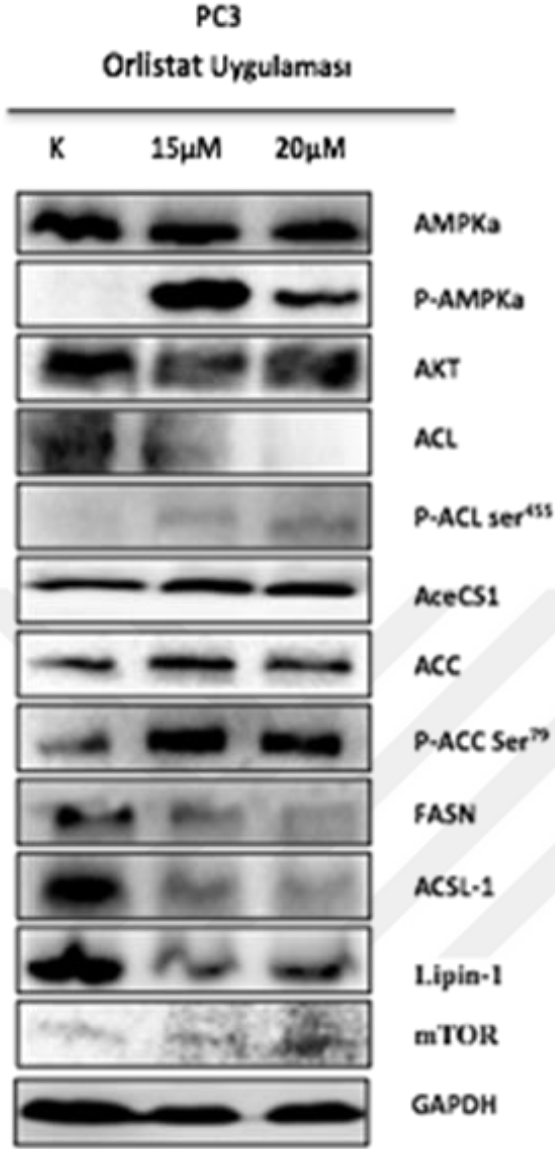
Şekil 4 3. DiOC6 boyaması ile mitokondri membran potansiyelinin Orlistat farklı konsantrasyonlarının 24 saat boyunca uygulandığı PC3 ve PNT1A hücrelerindeki değişimler gösterilmiştir. Büyütme: 200x ve DiOC6:3,3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide

Orlistat uygulanan hücrelerde sağ kalım mekanizmasının sonuçlarının irdelenebilmesi için yara iyileşmesi deneyi ile zamana bağlı olarak hücrelerin bölünme kinetikleri incelenmiştir. PC3 hücrelerinde 24 saat içerisinde çizim yapılan alanda kapanma görülürken, Orlistat uygulanan hücrelerde yara açıklığının kapanmasının olmadığı gözlemlendi. Bu nedenle Orlistat proje kapsamında önemli düzeyde sağkalıma ket vuran ajan olarak tanımlanmıştır. Orlistat'ın bu etkisi moleküler sinyal yollarında Orlistat ın etkisinin tanımlanmasının önemine dikkat çekmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4 4. Yara iyileşmesi modeli ile PC3 prostat kanseri hücrelerinde iki farklı Orlistat dozunun 24 saat boyunca etkisi tanımlanmıştır. Büyütme: 200x

AMPK α ile etkileşim halinde olan komşu etkileşim haritası STRING veri analizi ile tanımlanmıştır. Orlistat hipotezde yer aldığı üzere hücre sağkalımı ve ölümü ile ilişki merkezi rol oynayan AMPK üzerinde etkili bir ajan olarak tüm hücrel cevapları PC3 hücrelerinde meydana getiriyorsa, STRING analizinde olduğu üzere birden fazla moleküler hedef üzerinde etki gösterme potansiyelindedir (Şekil 4.5). Bu gruplar içerisinde öncül moleküler hedefleri PI3K/AKT, mTOR sinyal yolağı, yağ asidi sentaz enzimi (FASN) ile ilişkili protein hedefleri oluşturmaktadır. Bu nedenle tez kapsamında öncelikle orlistat'ın protein hedefleri üzerine etkileri kontrol edilmiştir (Şekil 4.6).

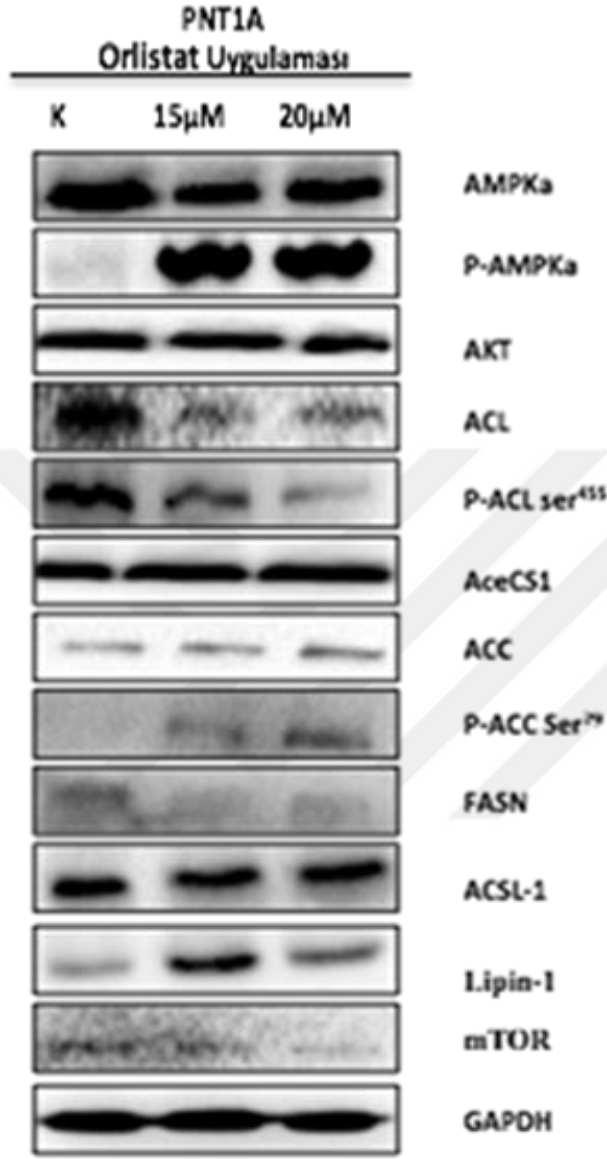


Şekil 4 5. PC3 prostat kanseri hücrelerinde 24 saat orlistat uygulaması sonucunda ifade düzeylerinde değişiklik görülen proteinler immunoblotlama yöntemi ile gösterilmiştir.

Şekil 4.5' de görüldüğü üzere PC3 hücrelerine 24 saat boyunca 15 ve 20 μ M orlistat uygulanmış ve ardından STRING analizi ile etkileşimde olduğu tespit edilen bazı moleküler hedeflerin immunoblotlama yöntemi ile ifade düzeyleri incelenmiştir. Orlistat AMPKa ifade düzeyine ket vurmamasına karşın, p-AMPK Thr172 hedefinin fosforilasyonunu tetiklemiştir. Bu durum AKT'in total protein ifadesi ile ilişkisiz olup, ATP-Citrate Lyase (ACL) ifade düzeyi doza bağımlı bir şekilde kontrol hücelere göre azalmıştır. ACL yağ asitleri, kolesterol ve asetilkolin biyosentezinin yanı sıra

glikojenez için anahtar adım olan sitozolde asetil-CoA ve oksaloasetat (OAA) oluşumunu katalize eden bir homotetraamindir. Anti-obezite ilaçlarının temel hedeflerinden birisi olan ACL Ser455 rezidüsünden PKA ve AKT tarafından fosforile edilerek enzimin katalitik aktivitesini artırılmaktadır. Bir diğer yağ asiti biyosentez yolağında önemli moleküler hedef Asetil-CoA karboksilaz (ACC)'dir. Asetil-CoA'nın malonil-CoA'ya karboksilasyonunu katalize etmekte böylece yağ asitlerinin biyosentez ve oksidasyonunda anahtar enzim olarak rol oynar. ACC1 (265 kDa, ACCa) formu öncelikle lipojenik dokularda eksprese edilirken, ACC2 (280 kDa, ACC) oksidatif dokulardaki ana izoform olarak gösterilmektedir. İnsanlarda, ACC2 hem lipojenik hem de oksidatif dokularda baskın izoformdur. Ser79'da AMPK veya Ser1200'de PKA tarafından fosforilasyona uğrayan ACC'nin enzimatik aktivitesini inhibe etmektedir. ACC, obezite karşıtı ilaçların potansiyel bir hedefi olarak önem kazanmıştır. Orlistat uygulaması sonucunda PC3 hücrelerinde toplam ACC miktarı değişmemekle birlikte Ser79'dan ACC fosforile edilmektedir. Bu durum AMPK aktivasyonunu valide etmektedir. Orlistat AMPK aktivasyonu ile ACC'nin Ser79'dan fosforilasyonu yolu ile yağ asiti sentez yolağında inhibe edici etki göstermektedir. FASN, asetil-CoA ve malonil-CoA'dan uzun zincirli yağ asitlerinin sentezini katalize eden önemli bir regülatördür. FASN, yedi farklı katalitik aktiviteye sahip bir homodimer olarak aktiftir ve yağda metabolik olarak aktif dokular veya adipoz dokuda depolanmak üzere karaciğerde lipitler üretilmesini sağlamaktadır. Diğer dokularda ise FASN ifadesi sınırlı olarak görülmektedir. FASN'nin artan ifadesi çoğu insan karsinomunda ortak bir fenotip olarak ortaya çıkmaktadır. Örneğin meme kanserinde immünohistokimyasal boyama, FASN düzeylerinin meme tümörlerinin boyutuyla doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir. Araştırma çalışmaları ayrıca FASN'nin akciğer ve prostat kanserlerinde yüksek oranda eksprese olduğunu ve FASN ekspresyonunun meme ve prostat kanserinde kötü prognozun bir göstergesi olduğunu göstermektedir. Bu nedenle anti-kanser etkinin tanınlanmasında proje kapsamında FASN üzerindeki etkinin gösterilmesi önem kazanmıştır. Orlistat FASN ifade düzeyine uygulama yapılmamış kontrol hücrelerine göre ket vurmıştır. Benzer şekilde Lipin ifadesinde de azalma saptanmıştır. Lipin 1, adipoz doku gelişimi için gerekli bir nükleer protein olarak tanımlanmıştır. Lipin 1, adiposit gelişimi ve besin algılayıcı yollar arasındaki bağlantıyı gösteren mTOR tarafından düzenlenmektedir. Ayrıca TORC2/CRTC2 tarafından hepatik insülin sinyalizasyonuna aracılık eder.

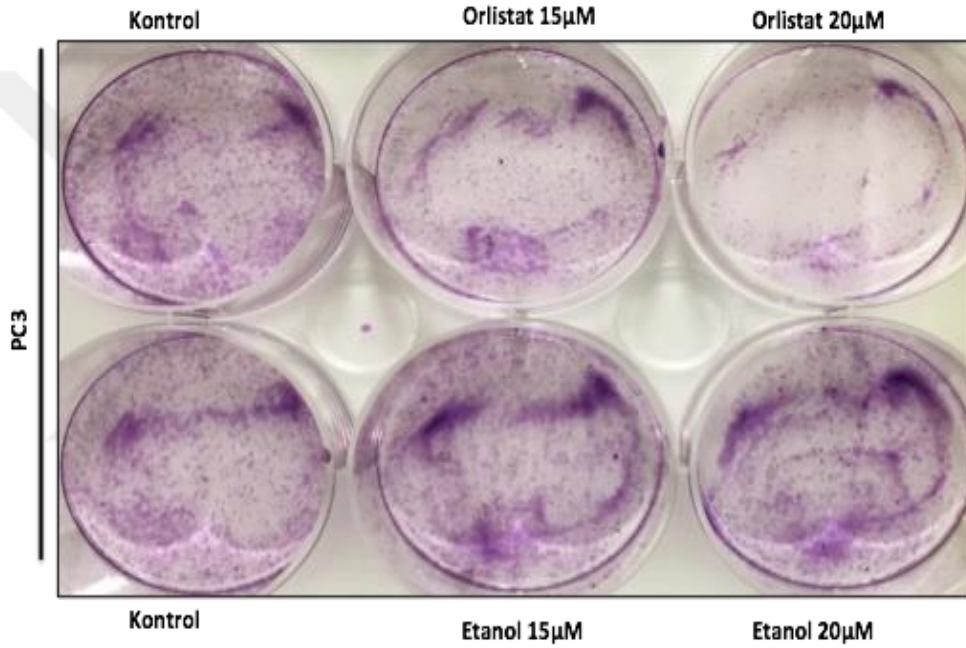
Lipin 1 toplam ifade düzeyindeki azalma sağ kalım sinyal yollarına orlistat'ın ket vurucu etkisi göstermektedir.



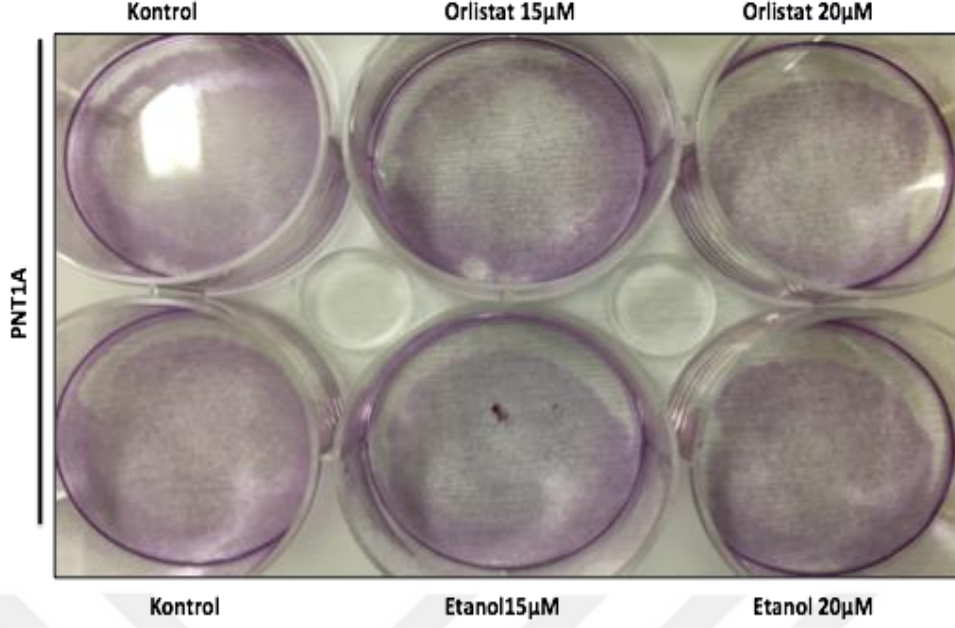
Şekil 4 6. PNT1A prostat epitel hücrelerinde 24 saat orlistat uygulaması sonucunda ifade düzeylerinde değişiklik görülen proteinler immunoblotlama yöntemi ile gösterilmiştir.

Şekil 4.6. incelendiğinde, AMPK Thr172 fosforilasyonunu orlistat her iki seçili konsantrasyon uygulaması sonucunda arttırmaktadır. ACL total protein düzeyinin azalması ile benzer bir profil gösteren p-ACL ser 455 fosforilasyonundaki azalmayı takiben, p-ACC ser 79 fosforilasyonunda orlistat uygulaması artışa neden olmuştur. FASN ifade düzeyindeki azalma PC3 hücrelerinde elde edilen sonuç ile benzer

olmakla birlikte orlistat PNT1A normal prostat epiteli hücrelerinde ifade düzeyinde artış göstermektedir. FASN bazal ifade düzeyi PC3 hücrelerinden daha fazla olarak görülmüştür. Bu durumda FASN'ın karsinogenezdeki önemine işaret etmektedir. Tüm sonuçlar incelendiğinde orlistat her iki hücre hattında da etkili olmakla birlikte, etkisi PC3 hücrelerinde PNT1A hücrelerine göre daha fazladır. Bu amaçla PC3 ve PNT1A hücrelerinde orlistat'ın anti-sağkalım etkisi koloni formasyonu testi ile incelenmiştir (Şekil 4 7-4 8). Koloni formasyonu testine göre orlistat her iki konsantrasyonda da PC3 hücrelerinde taşıyıcı Etanol uygulamasına karşın inhibitif etki göstermiştir. Ancak PNT1A hücreleri üzerinde hem orlistat hem de Etanol etkili olmamıştır.

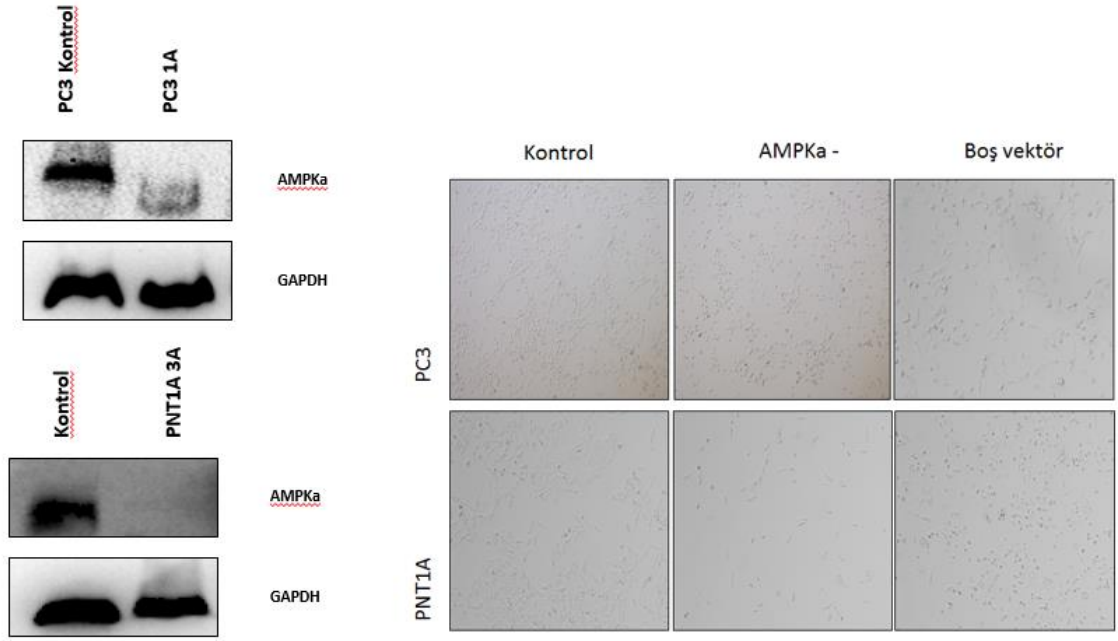


Şekil 4 7. PC3 prostat kanseri hücrelerinde koloni oluşturma deneyi orlistat ve etanol uygulaması ile gösterilmiştir. Hücreler fikse edildikten sonra kristal viyole ile boyanmıştır.



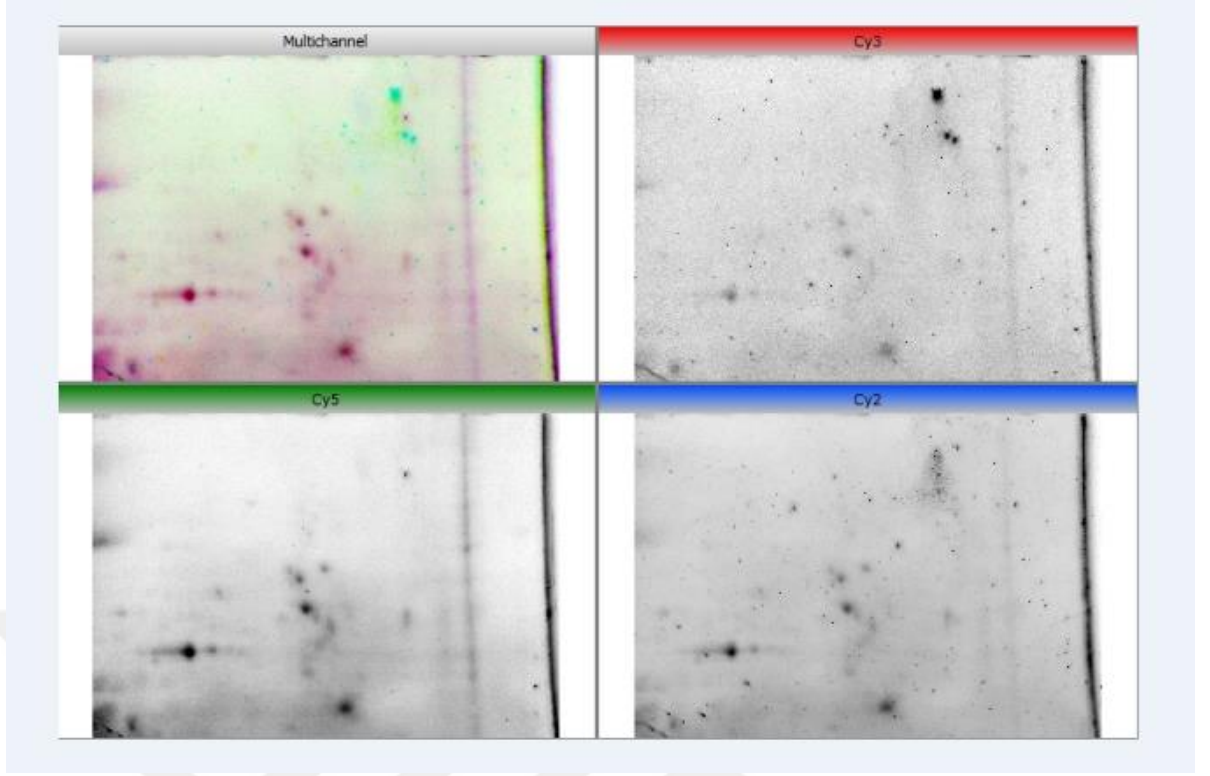
Şekil 4 8. PNT1A prostat kanseri hücrelerinde koloni oluşturma deneyi orlistat ve etanol uygulaması ile gösterilmiştir. Hücreler fikse edildikten sonra kristal viyole ile boyanmıştır.

Tüm bu sonuçlar sonucunda AMPK α sessizleştirilmesi ile ilgili deneylerde potansiyel moleküler hedefler tanımlanmıştır. AMPK α sessizleştirilmesi amacı ile hücrelerde gerçekleştirilen optimizasyon sonuçlarına göre Puromisine dirençli hücre kolonileri tek hücre halinde elde edilmeye çalışılmış, ardından seçili hücreler büyütülerek hücrelerde AMPK α ifadesi kontrol edilmiştir. Bu hücrelerde %50 den fazla miktarda AMPK seviyesindeki azalma olumlu olarak kabul edilmiş ve hücrelerin popülasyon olarak büyüme kinetikleri kontrol edilmiştir. Hücre morfolojisindeki değişimler puromisine direnç deneyleri boyunca gözlenmiştir. Puromisinin artan miktarlarda uygulanması ile dirençli hücre kolonileri tanımlanmıştır. Dirençli hücre kolonilerinde gerçekleştirilen immunoblotlamalar ile hücre moleküler hedefleri ayrıca irdelenmiştir (Şekil 4.9). Şekilde görüldüğü üzere elde edilen PC3 kolonileri tek tek incelenmiştir.

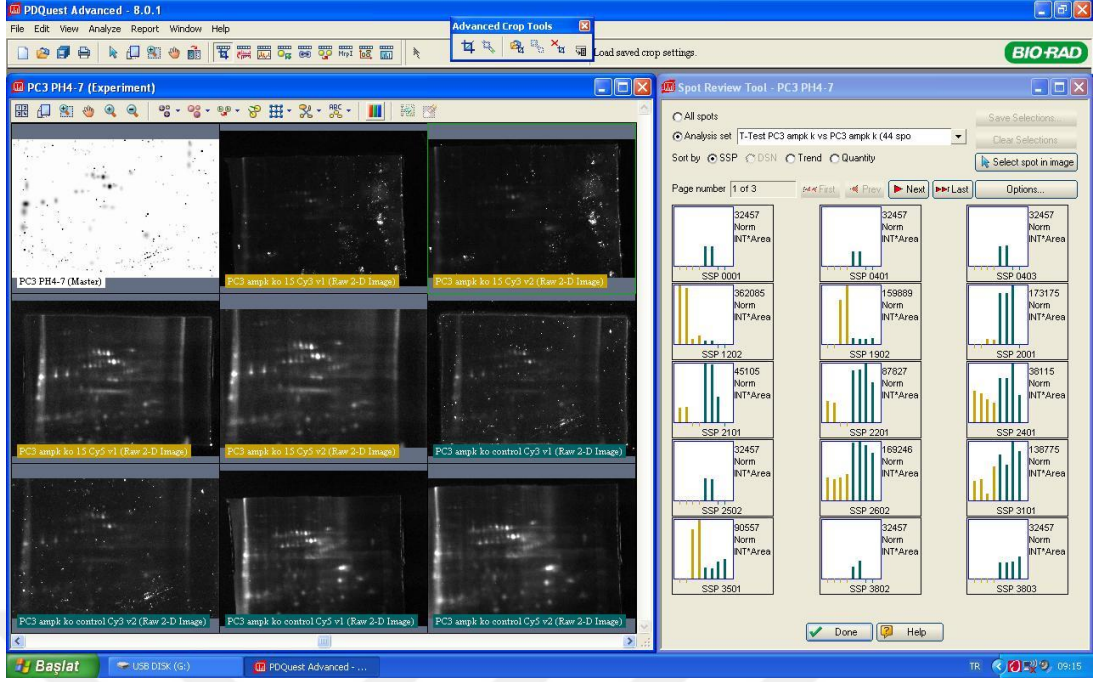


Şekil 4 9. Puromisin ile AMPKα sessizleştirilmesi sonrasında seçilen hücre kolonilerinde AMPKα ifadesinin kontrol edilmiştir ve hücrelerin sağ kalım profilleri ışık mikroskopunda 200x ile gösterilmiştir.

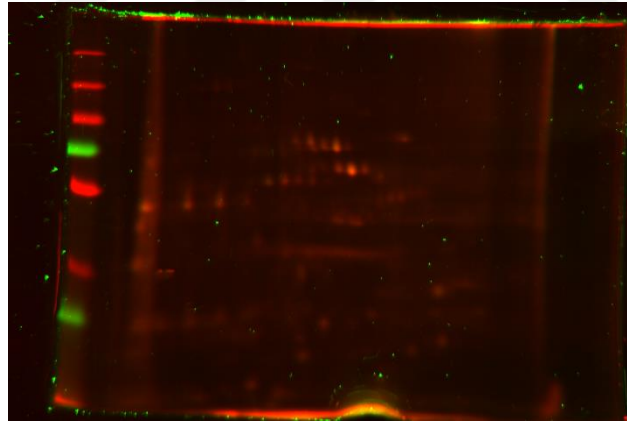
AMPK ifadesinden yoksun stabil hücre hatlarının eldesi ile hücreler 2-boyutlu elektroforez yöntemi (2D-DIGE) ile toplam protein ifadesindeki değişim incelenmiştir. Hızlı destek projemizin temel hedeflerinden birisi olan bu iş paketi ile AMPK+/AMPK- PC3 ve PNT1A hücre hatlarındaki karşılaştırmanın yanısıra doza bağımlı olarak orlistat ifadesinin gösterilmesine yönelik AMPK+ PC3 ve PNT1A hücre hatlarında 15 ve 20 μ M orlistat'ın 24 saat boyunca etkilediği proteinler belirlenmeye çalışılmıştır. 2D-DIGE yöntemine göre örnekler çok kanallı filtrelerin mevcut olduğu Chemiluminescence okuyucu görüntüleme cihazında görüntü analizleri için kaydedilmiştir. Örneklerin herbirisi için CY5 AMPK+, CY3 AMPK -ve CY2 hem AMPK+ hem de AMPK- protein lizatlarının yüklenmesi şeklinde analize alınmıştır. İkinci tekrar ise CY3 AMPK+, CY5 AMPK -ve CY2 hem AMPK+ hem de AMPK- şeklindedir. Böylece boyaya bağlı görüntüde meydana gelen ardıl noktalar elimine edilebilmiştir (Şekil 4. 10-11).



Şekil 4 10. Temsili 2D-DIGE sonuçları beyaz-siyah çevrimi ile çok kanallı okuma sisteminde gösterilmiştir. CY5 AMPK⁺, CY3 AMPK⁻ ve CY2 hem AMPK⁺ hem de AMPK⁻ olup, her bir koşul için toplam 60 µg toplam protein kullanılmıştır.



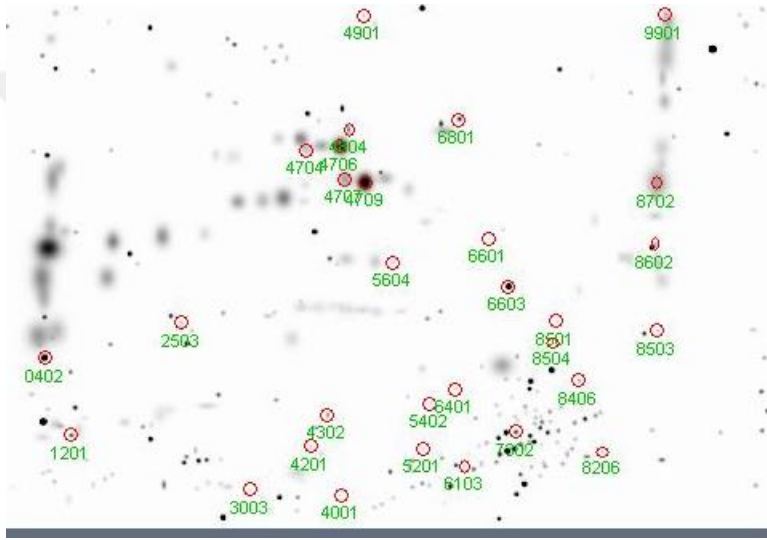
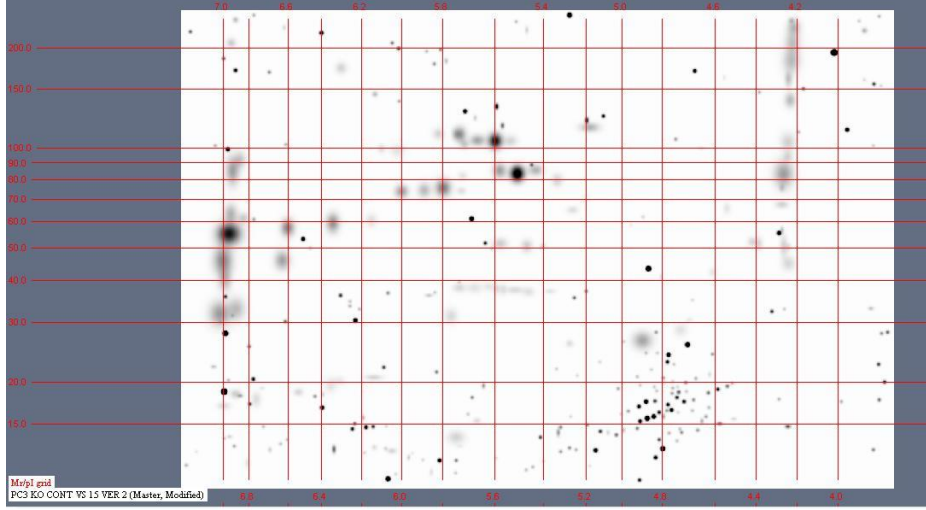
Şekil 4 11. PDQuest yazılımı üstünde yazılımın belirlediği spotlar analiz edilerek filtrelenmiştir



Şekil 4 12. Temsili 2D-DIGE sonuçları çok kanallı okuma sisteminde gösterilmiştir. CY5 AMPK⁺, CY3 AMPK⁻ ve CY2 hem AMPK⁺ hem de AMPK⁻ olup, her bir koşul için toplam 60 µg toplam protein kullanılmıştır.

Proje kapsamında iki tip strip ile çalışılmıştır: Sistemin optimize edilebilmesi amacı ile örnekler pH 3-10 aralığında IEF protokolüne tabi tutulmuştur. Daha sonra seçili örnekler pH 4-7 aralığında araştırılmıştır. Yapılan deneyler kapsamında her bir koşul (PC3 AMPK+, AMPK, 15- 20 µM Orlistat uygulaması) kendi grup örnekleminde mastır jel içerisinde değerlendirilmiş ve spot analizi gerçekleştirilmiştir. Örnekler arasında gerçekleştirilen spot analizi için silik ve büyük spotlar eşik değer olarak PDQuest (Biorad) programı yönergesine göre seçilmiş ve otomatik seçim ile spot sayısı elde edilmiş, silik bantların seçim yeri değiştirilerek her bir koşulda kontrol jel için 500-750 arasında spot olacak şekilde spot belirleme hassasiyet ayarı yapılmıştır.

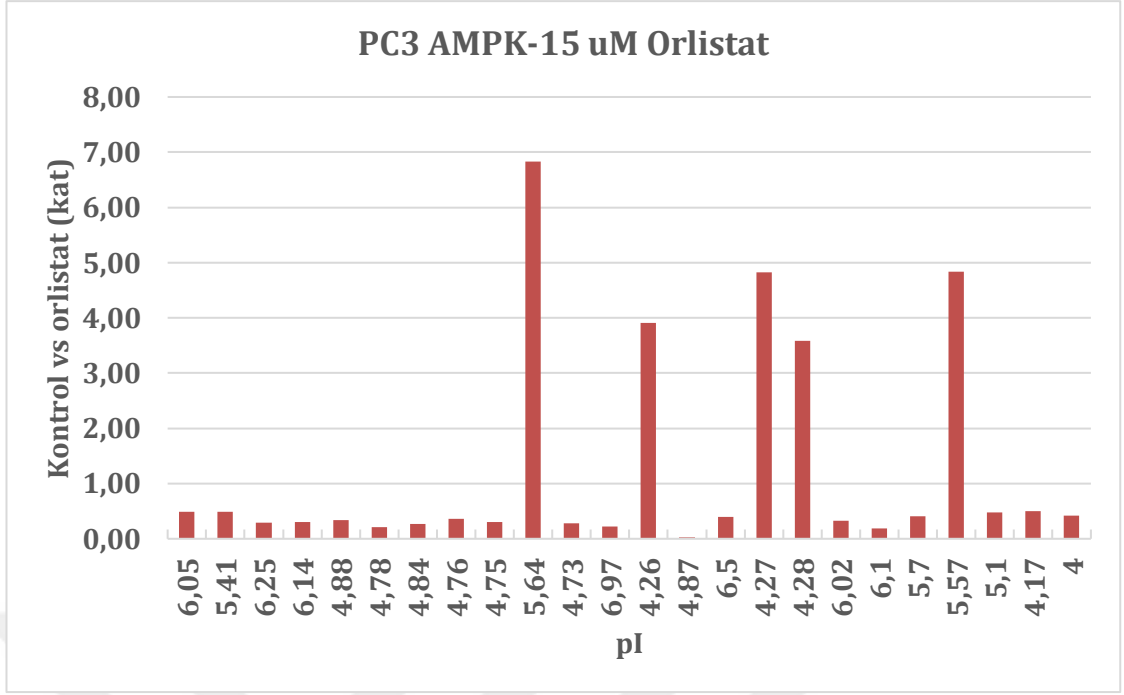
Daha sonra seçili spotlar sisteme kaydedilmiş ve mastır jel oluşturulmuştur (Şekil 4.13). Bu kopyaya göre spot analizinde yüklenen markır ve seçilen pH aralığında göre olası spotlar için pI ve moleküler ağırlık tanımlanmıştır. PDQuest yazılımında yer alan karşılaştırma verilerine göre en az 4 kat fark ile %90 hassasiyette ortak değişimde olan ve kendi içinde değişimlerin temel alındığı spotlar elde edilmiştir. Spotlar tek tek karşılaştırılmış ve ileride gerçekleştirilmesi muhtemel kütle spektroskopisi deneyleri için seçim yapılmıştır. 25 spot ortak değişim parametresi gösterirken, kendi başına değişen toplam 172 spot gösterilmiştir.



Şekil 4 13. PC3 AMPK⁻ hücrelerde kontrol vs 15 μ M Orlistat uygulaması için elde edilen master jel gösterilmektedir. (Üst) olası moleküler ağırlık ve pI dağılımı, (alt) olası jeller arasında anlamlı değişim gösteren spot seçimleri gösterilmiştir.

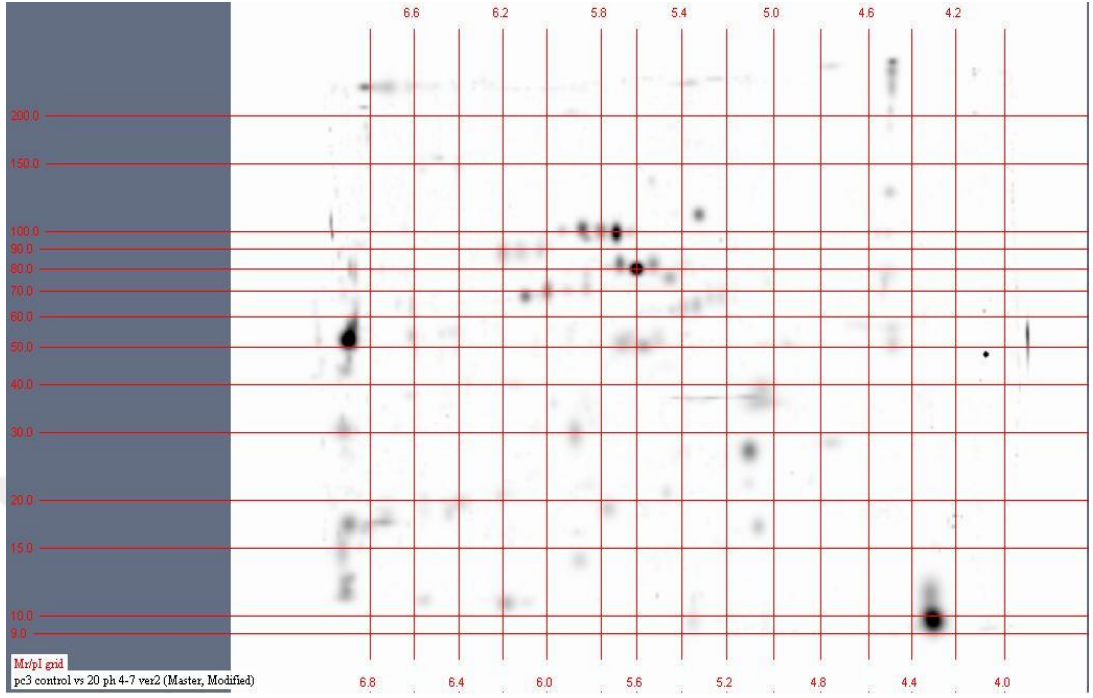
Tablo 1. PC3 AMPK⁻ hücrelerde kontrol vs 15 μ M Orlistat uygulaması için elde edilen mastır jele göre ortak değişen spotlar gösterilmiştir. (SSP: Spot kodu, MW: Moleküler Ağırlık, PI: izoelektrik noktası)

SSP	MW	pI	PC3 AMPK- 15 μ M Orlistat	Oran	PC3 AMPK- Kontrol	Oran
2003	12.51	6.05	8776.4	0.49	18086.2	1.00
5101	13.72	5.41	11257.4	0.49	23018.3	1.00
2102	14.52	6.25	7576.3	0.29	26535.3	1.00
2104	14.74	6.14	9845.9	0.30	33311.4	1.00
6205	15.63	4.88	64813.5	0.34	192071.4	1.00
7205	17.14	4.78	10305.5	0.21	49146.4	1.00
7302	17.57	4.84	8221.5	0.27	30624.9	1.00
7306	18.00	4.76	12672.9	0.36	35212.8	1.00
7308	18.67	4.75	8023.1	0.30	26617.0	1.00
4302	19.54	5.64	137982.1	6.83	20203.7	1.00
8402	19.92	4.73	5036.8	0.28	18165.3	1.00
0402	27.89	6.97	54653.3	0.22	244306.6	1.00
8503	32.93	4.26	31251.0	3.91	7989.9	1.00
6603	43.37	4.87	6564.0	0.03	235189.4	1.00
1604	52.90	6.50	18841.3	0.40	47633.0	1.00
8602	56.44	4.27	118734.0	4.83	24584.1	1.00
8701	75.50	4.28	60675.3	3.59	16895.7	1.00
3701	97.62	6.02	12366.5	0.33	37839.4	1.00
2701	98.99	6.10	13268.4	0.19	70201.8	1.00
4704	101.95	5.70	20557.1	0.41	49549.7	1.00
4804	116.53	5.57	132380.8	4.84	27323.6	1.00
6801	124.10	5.10	15466.9	0.48	31999.9	1.00
9804	150.05	4.17	8479.0	0.50	16985.6	1.00
0901	222.83	-1.00	9361.3	0.42	22105.7	1.00

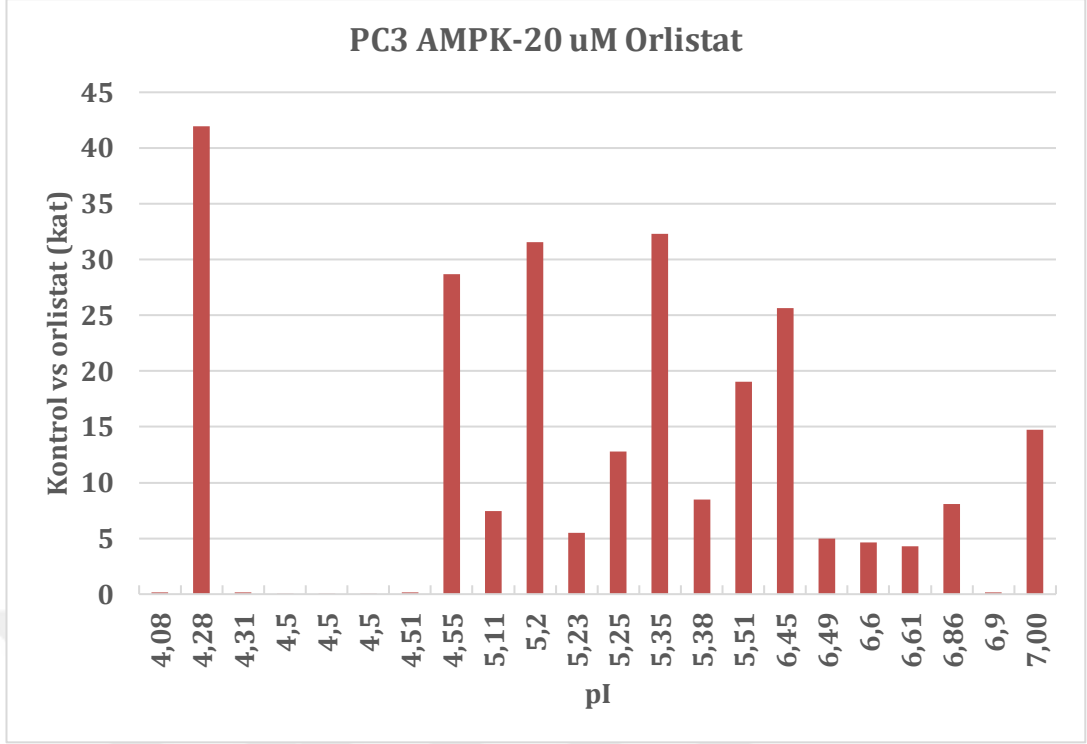


Şekil 4 14. PC3 AMPK- prostat kanseri hücrelerinde kontrol hücrelerin 15 μ M Orlistat uygulaması sonucunda ortak değişen spotlarının göreceli ifade düzeyine ilişkin grafik gösterilmiştir.

Benzer şekilde daha yüksek konsantrasyonda 20 μ M Orlistat uygulamasına takiben analizler gerçekleştirilmiştir. Mastır jel üzerinde ortak spotlar değerlendirilmiş ve kontrole göre değişen spotlar irdelenmiştir. 20 μ M Orlistat Şekil 4.15 de görüldüğü üzere kontrol hücrelere 23 farklı olduğu düşünülen protein hedefi (spotu) üzerinde etkili olmuştur. Bu veri setinde başlangıçta internal standart Cy2 normalizasyonu uygulanmadan veri seti işlenmiştir. Bu gruplar içerisinde 1605 spotun 1100 kadarı Cy5 boyası kaynaklı olduğunu düşündüğümüz artifakt olarak değerlendirmiştir. Bu veri Cy2 internal standart veri setinden filtrelendiğinde spotların değişiminin 500 civarında olduğunu göstermektedir. Muğlak olan internal standart ile karşılaştırmalı olarak tüm Cy3 ve Cy5 zıt boyamalı jellerden elde edilen veri içerisinde ortak olarak seçilemeyen 5-10 spot nedeni ile oluşmaktadır. Bu nedenle ana jel yeniden çizilmiş ve Şekil 4.15 de gösterilmiştir. Şekil 4.16 da ise kontrol ve seçili doz için orlistat uygulaması ortak kesişim kümesindeki jel spotlarının ileride gerçekleştirilebilecek kütle spektroskopisi deneyleri için aday veri seti oluşturduğu düşünülmüştür.

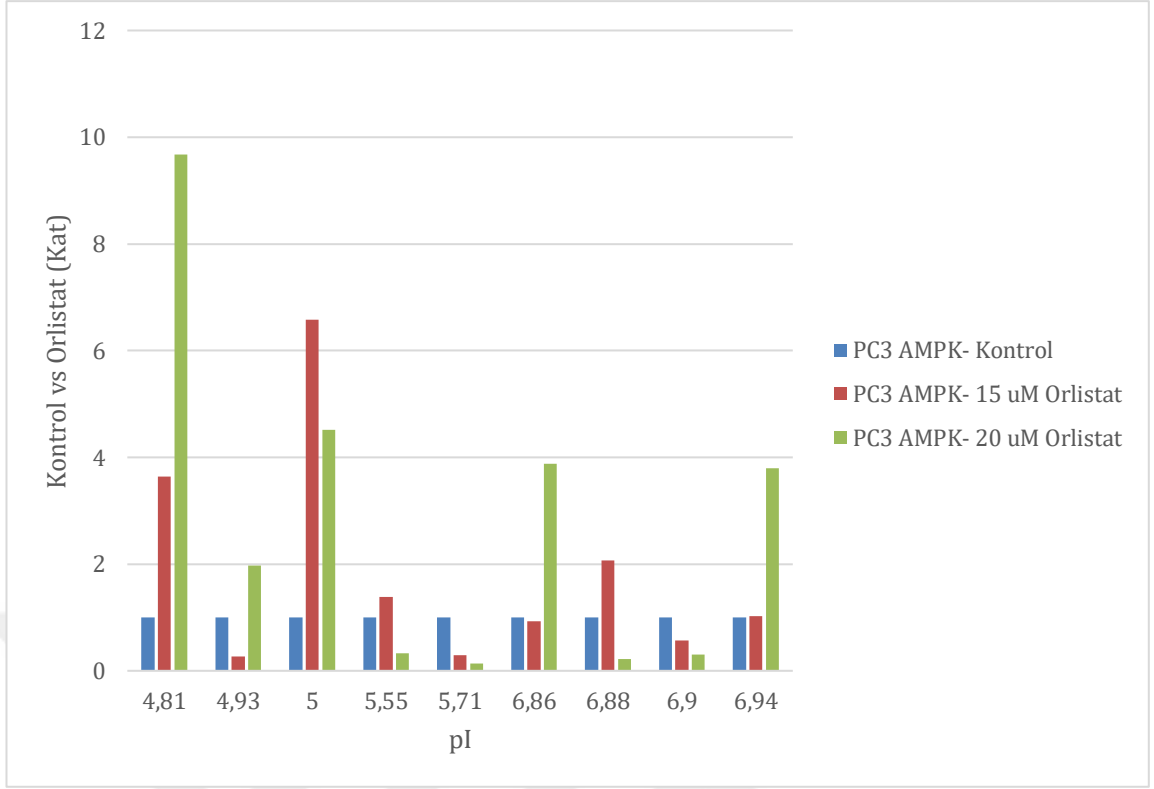


Şekil 4 15. PC3 AMPK- hücrelerde kontrol vs 20 μ M Orlistat uygulaması için elde edilen master jel gösterilmiştir.



Şekil 4 16. PC3 AMPK- prostat kanseri hücrelerinde kontrol hücrelerin 20 μ M Orlistat uygulaması sonucunda ortak değişen spotlarının göreceli ifade düzeyine ilişkin grafik gösterilmiştir.

Orlistatın doza bağlı etkisinin PC3 AMPK- hücrelerinde gösterimine yönelik hazırlanan mastır jel ile ortak değişimde olan ve t-testine göre anlamlı olarak tanımlayabildiğimiz ($p < 0,05$) 9 spot tanımlanmıştır. Toplamda mastır jel üzerinde 54 spot tüm durumlar için ortak olarak ayrıştırılabilmiş, bunlardan 9'u kesişim kümesinde yer almıştır (Şekil 4.18). pI noktasına göre spotlar sıralandığında doza bağlı etki 4,81 pH 33,32 KDa için tanımlanmıştır. Bu koşul ifade düzeyinde artış olarak gösterilmiştir. Aksine 5,71 ve 6,9 pI noktalarında tespit edilen spotlarda ise kontrole oranla doza bağlı bir şekilde spotlarında temsil ettiği protein düzeylerinde azalma şeklinde değerlendirilmiştir. 6,86 ve 6,94 noktalarında belirlenen pI spotlarında ise sadece 20 μ M Orlistat etkili olmaktadır.




Şekil 4 17. PC3 AMPK- prostat kanseri hücrelerinde kontrol hücrelerin 15-20 µM Orlistat uygulaması sonucunda ortak değişen spotlarının göreceli ifade düzeyine ilişkin grafik gösterilmiştir.


Sonuçlar için MW ve PI spot belirlemelerine göre TAGIdent (Expasy veri tabanı) biyoinformatik veri tabanı ile arama sonuçlarına göre doza bağımlı etki gösteren 4,81 PI noktasındaki hedef için 142 potansiyel protein hedefi saptanmıştır. UniProtKB/Swiss-Prot veritabanlarında Homo sapiens için seçili proteinlerin sayıca çokluğu temel olarak 4,7-4,9 olarak seçilen geniş aralıktan ötürü olduğu düşünülmüştür.

ELIF DAMLA ARISAN TagIdent Results



Inbox x

 **ExpASy web.expasy.org** <expasy@expasy.org>
to me ▾

 English ▾ > Chinese (Traditional) ▾ [Translate message](#)

```
*****
*   TagIdent Search on the ExpASy WWW Server           *
*   (mail for damlaarisan@gmail.com)                  *
*                                                       *
*   Here are the results of your TagIdent Search       *
*                                                       *
*****

Search performed in UniProtKB/Swiss-Prot with following values:
  Query name: ELIF DAMLA ARISAN

      pI range =      4.7 - 4.9
      Mw range =    29321.6 - 37318.4
      with cysteines in reduced form
      OS/OC/OX =      Homo sapiens (corresponding to TaxID: 9606)
      KW keyword =    ALL


-----
Scan done on 28-May-2018.
UniProtKB/Swiss-Prot Release 2018_05 of 23-May-18: 557491 entries

-----
-----
Scan in UniProtKB/Swiss-Prot database (557491)
---
142 proteins found in the specified pI/Mw range

----- This message was generated on ExpASy.
```

Şekil 4 18. TAGIDENT arama sonucu gösterilmiştir.

Arama sonuçları daraltıldığında 4.80-4.85 aralığında aynı kDa büyüklüğünde 31 potansiyel protein hedefi tanımlanmıştır (Şekil 4.19). Bu nedenle ileride seçili spotların 4-7 pH striplerinde taranmasının önemli olacağı ve bu spotların kütle spektroskopisi ile taranması yolu ile 2D-DIGE sistemden elde edilen verilerin doğrulanabileceği düşünülmektedir.

 **ExPASy web.expasy.org** <expasy@expasy.org>
to me ▾

 English ▾ > Chinese (Traditional) ▾ [Translate message](#)

...

```
*****
*   TagIdent Search on the ExPASy WWW Server           *
*   (mail for damlaarisan@gmail.com)       *
*
*   Here are the results of your TagIdent Search       *
*
*****

Search performed in UniProtKB/Swiss-Prot with following values:
  Query name: DOSAGE3

      pI range =      4.80 - 4.85
      Mw range =      29321.6 - 37318.4
      with cysteines in reduced form
      OS/OC/OX =      Homo sapiens (corresponding to TaxID: 9606)
      KW keyword =      ALL

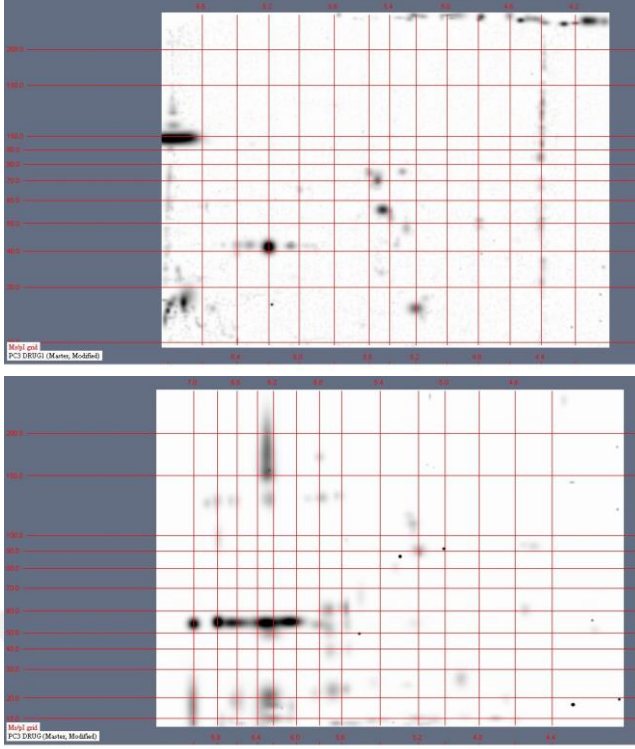
-----
Scan done on 28-May-2018.
UniProtKB/Swiss-Prot Release 2018_05 of 23-May-18: 557491 entries

-----
Scan in UniProtKB/Swiss-Prot database (557491)
---
31 proteins found in the specified pI/Mw range

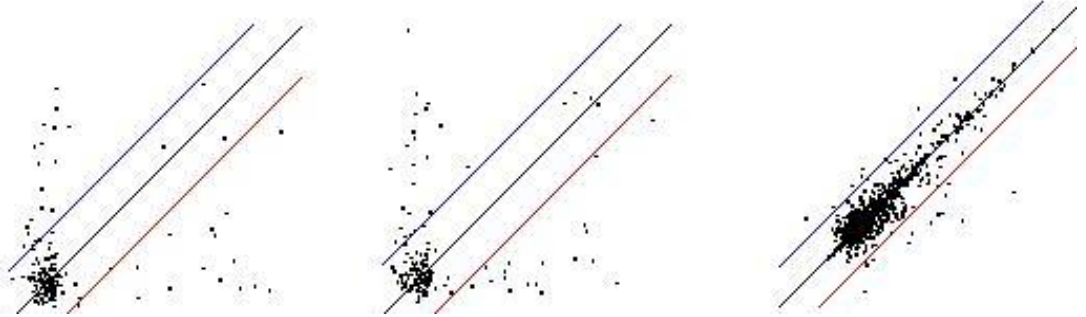
----- This message was generated on ExPASy.
```

Şekil 4 19. Daraltılmış TAGIDENT sonuçları gösterilmiştir.

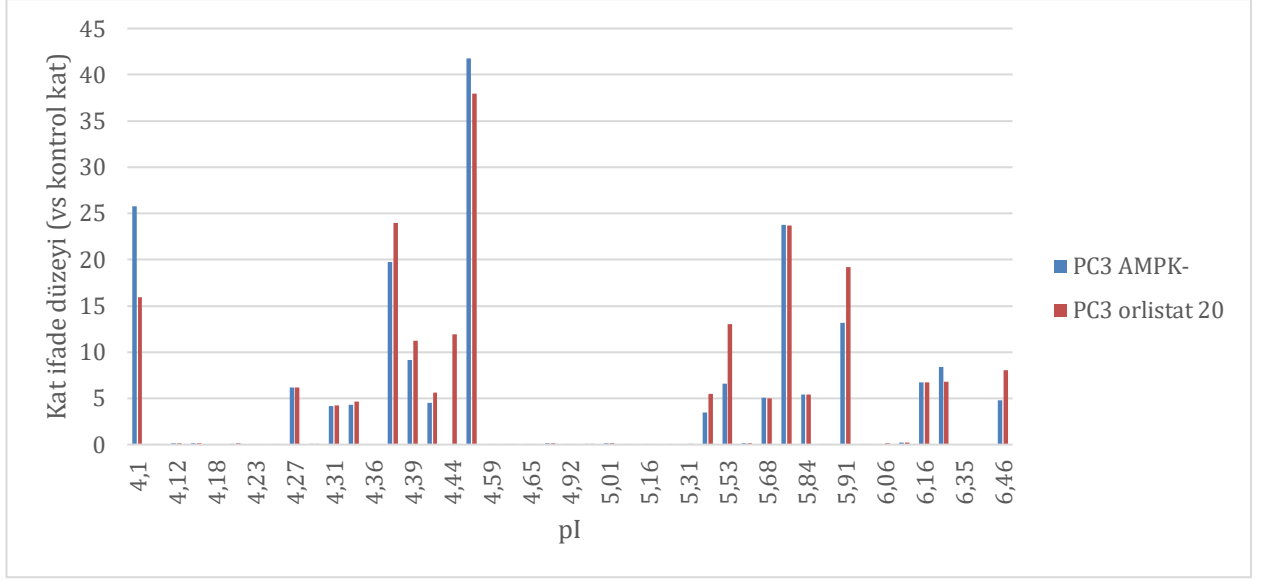
PC3 prostat kanseri hücrelerinin ilaca ve AMPK susturmasına karşın vermiş olduğu cevap ise bir başka spot analizi ile incelenmiştir. PC3 hücreleri için AMPK susturması ile 62 spot değişimi gösterilmiştir. Bu nedenle AMPK susturmasına karşılık olarak ilaç değişimi ile benzer sayıda spotun değiştiği gösterilmiştir (Şekil 4.20). Ancak spot dağılımlarının gösterilmesine yönelik oluşturulan ana jel benzer spotların değişmediğini göstermektedir.



Şekil 4 20. PC3 prostat kanseri hücrelerinde ilaç uygulaması ve AMPK susturmasına spot dağılımı gösterilmiştir.



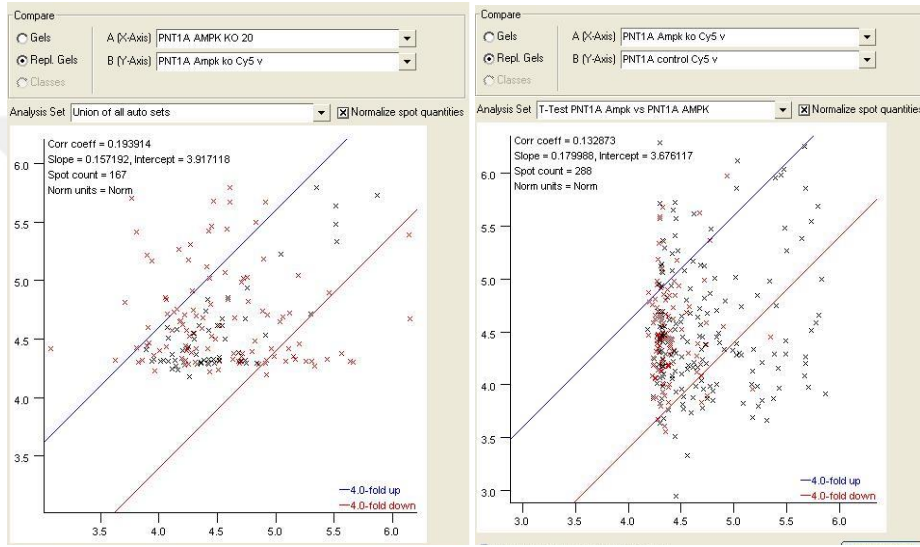
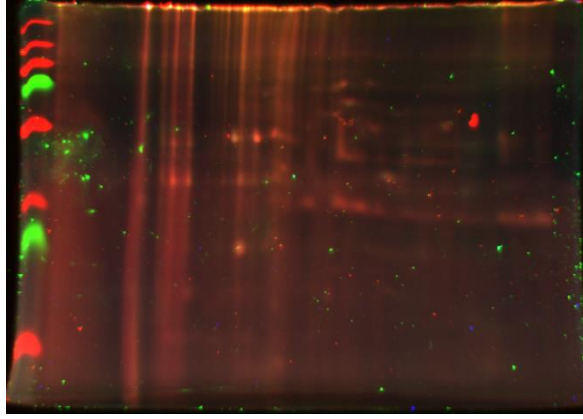
Şekil 4.21. PC3 prostat kanseri hücrelerinde (sol) PC3 kontrol vs AMPK susturması, PC3 kontrol vs Orlistat uygulaması ve PC3 kontrol vs kontrol normalizasyon grafikleri gösterilmiştir. Mavi 4 katdan ifade düzeyinde azalma sınırı, kırmızı çizgi 4 kat ifade düzeyinde artış sınırını göstermektedir.



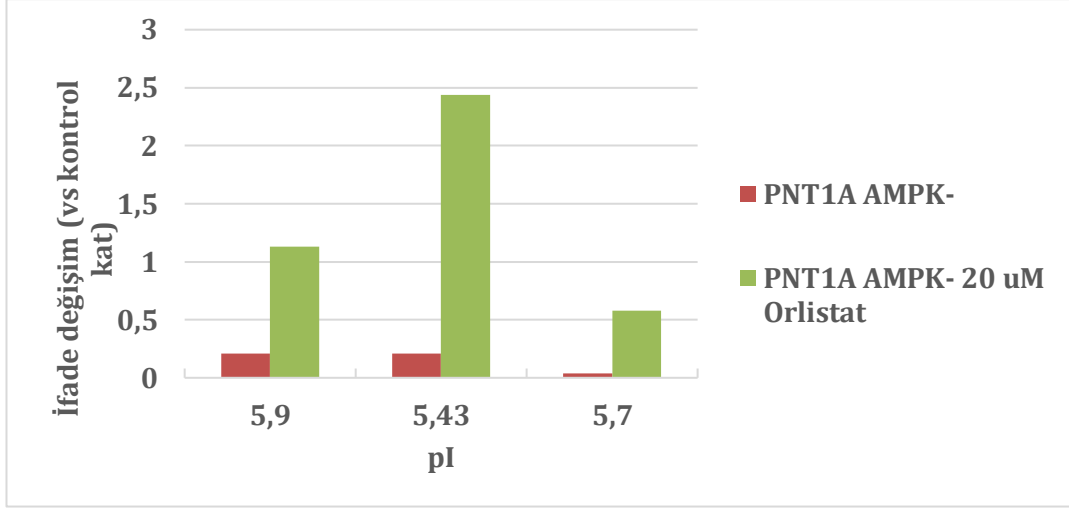
Şekil 4 22. PC3 prostat kanseri hücrelerinde sadece AMPK susturması ve sadece Orlistat uygulaması ile değişen protein spotlarının tahmini pI noktalarına göre dağılım grafiği gösterilmiştir.

PNT1A kontrol ve AMPK- hücrelerde değişim gösteren spot sayıları analiz edildiğinde normalizasyon ile birlikte iki tekrarlı jellerde toplamda 288 spot sayısı içerisinde 4 kat ifade düzeyinden daha çok azalan ve artan çok sayıda spot tanımlanmıştır (Şekil 4.21).

PNT1A için gerçekleştirilen spot analizlerinde PNT1A AMPK – hücelere en yüksek orlistat dozu yüklendiğinde (20 μ M) değişim gösteren spot sayısı tüm PNT1A örnekleri için toplamda 435 olup, bu gruplarda ortak değişim gösteren 167 spotun içerisinde 3 temel spotun 4 kat ifade düzeyinde artış şeklinde olduğu bulunmuştur (Şekil 4.22). Bu nedenle AMPK susturması PNT1A hücrelerinde orlistat ile benzer yolları etkilemiş ve 20 μ M Orlistat uygulaması hücrelerde AMPK yoksunluğunu tersine çevirmiştir. Bu veri daha sonra gerçekleştirilecek kütle spektroskopisi ile gerçekleştirilecek spot analizleri açısından anlamlı olarak değerlendirilmiştir. PNT1A hücrelerinde orlistat etkisinin PC3 hücrelerinden farklı olmasının nedenlerinin açıklanabilmesi amacı ile seçili 3 spotun 435 toplam spot sayısından indirgenebilmiş olması projenin başarı hedeflerinden birisinin karşılandığını göstermektedir.



Şekil 4 23. PNT1A kontrol, AMPK- ve PNT1A AMPK- +20 μ M Orlistat uygulaması sonucunda spotların regresyon analizlerinin gösterilmiştir. Üst resim 2D-DIGE PNT1A AMPK+ vs AMPK- 'dır. Alt resim normalizasyon verilerinden elde edilen spot analizleridir.

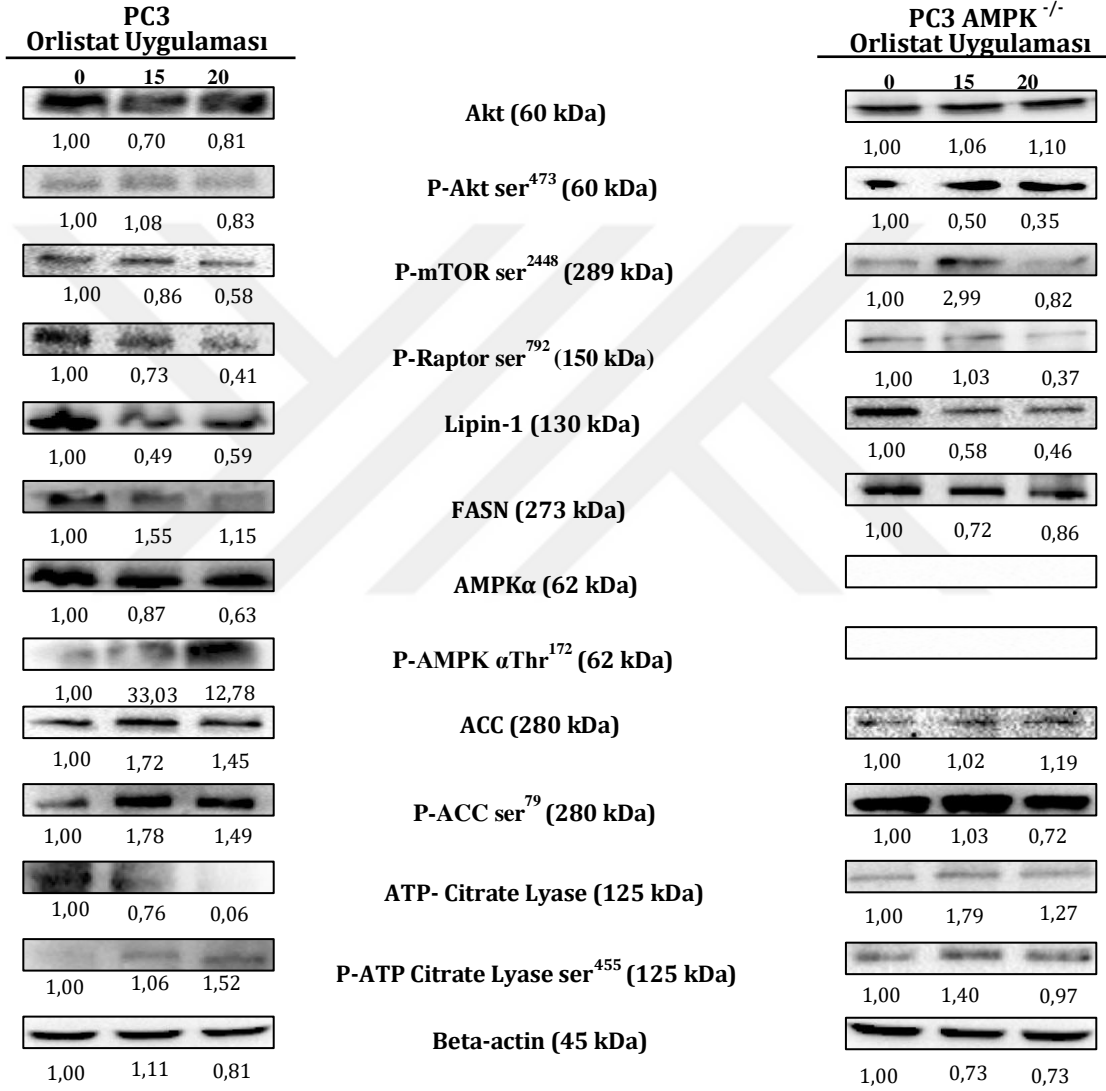


Şekil 4 24. PNT1A AMPK- hücrelerde AMPK+ hücelere göre 20 μ M Orlistat uygulamasının ortak değişime uğrattığı spotların analizi gösterilmiştir.

Tüm gruplar bir arada değerlendirildiğinde, sadece kontrol hücrelerine oranla AMPK sessizleştirilmesi veya sessizleştirilen hücelere orlistat uygulanması durumunda Kontrole oranla 224 protein spotunun değişimi görülmüştür. 224 spotun 18'i AMPK- hücrelerde ifade edilmezken, bu oran orlistat uygulaması ile 81 düzeyinde azalan protein olarak tespit edilmiştir. Ancak ttesti sonuçlarına göre tüm grupların sayısı olarak bu rakamlar sunulmaktadır. Bu nedenle tüm veri setinin filtrelediği ve ortak artan protein spotlarının gösterimi önem kazanmıştır. 81 azalan protein spotuna karşın 10 tane ifade düzeyi artan spot gösterilmiştir. Bu nedenle filtre edilen veri setlerinde upregüle ve downregüle gen sayılarından yola çıkılarak seçilen spotların kütle spektroskopisi sonuçlarının tüm yolak analizi açısından önemli veriler sağlayabileceğini düşündürmektedir.

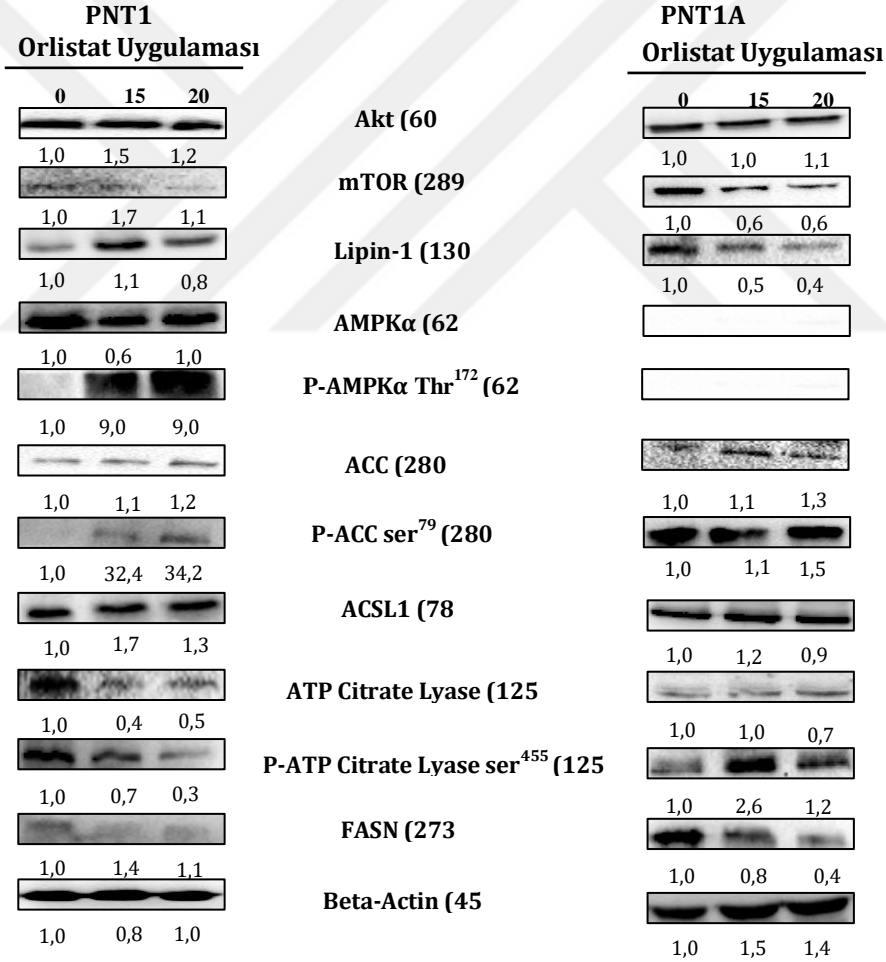
Bu verilerin doğrulaması amacı ile FASN ilişkili daha önce immunoblotlama yöntemi ile incelediğimiz proteinlerin ifade düzeylerin AMPK sessizleştirilmiş PC3 ve PNT1A hücrelerinde orlistatın iki farklı dozunda yeniden tekrarlanmıştır. Orlistat, ATP sitrat liyaz üzerinde AMPKdan bağımsız etki gösteremezken, Lipin üzerinde ifade düzeyindeki azalmayı teşvik etkisi AMPK yoksunluğunda daha belirgin bir şekilde gözlemlenmiştir. En kritik verilerden birisi ise Orlistat hücrelerde doza bağımlı bir şekilde FASN ifadesine ket vururken, bu etki AMPK sessizleştirilmesi yapılmış hücrelerde gözlenmemiştir. Bu nedenle AMPK ifadesinin orlistat ve FASN etkileşimi

açısından kritik rol oynadığı düşünülmektedir. PI3K/AKT mTOR eksenini ile ilgili verilerin halen fosforile formları ile ilgili araştırmalar laboratuvarlarımızda devam etmektedir. Bu anlamda AMPK dan bağımsız yağ asiti sentaz yolağı ile ilişki sinyal kaskadının daha iyi bir şekilde tanımlanmasına yönelik ileri çalışmalar bu proje sonuçları ile planlanmaktadır (Şekil 4.25) .



Şekil 4 25. AMPK susturması yapılan PC3 prostat kanseri hücrelerinde orlistat uygulamasına ile potansiyel değişim göstermesi beklenen hedeflerden biri olan yağ asiti sentez ve lipogenez yolağındaki moleküler hedeflerin immunoblotlama ile gösterilmiştir.

PNT1A prostat epitel hücrelerinin orlistat uygulamasına karşı daha dirençli olmaları nedeni ile değişen protein spotlarının temel olarak FASN ile ilişkili sinyal kaskadlarında tanımlanmasının önemli olduğu düşünülmüş ve benzer bir immunoblotlama analizi gerçekleştirilmiştir. PNT1A hücrelerinde orlistat AMPK'dan bağımsız bir şekilde FASN ifadesine ket vurmaktadır. Halen laboratuvarlarımızda gerçekleştirilen deneylerde AMPK α 2 ifadesinin AMPK α sessizleştirme ile değişmediği düşünülmekte ve bu hipotezin doğrulanmasına yönelik özgül antikolar ile deneylerin gerçekleştirilmesi planlanmıştır. AMPK'nın yoksunluğu Orlistat'ın etkisini FASN ve ilişkili sağ kalım yolları için değiştirmemiştir. Orlistat AceCS ve Lipin hedefleri üzerinde AMPK yoksun PNT1A hücrelerinde etkili olurken, mTOR ifade düzeyindeki azalma orlistatın otofaji gibi başka sinyal kaskadları üzerinde etkili olabileceğini düşündürmüştür (Şekil 4.26).



Şekil 4 26. AMPK susturması yapılan PNT1A prostat epitel hücrelerinde orlistat uygulamasına takiben potansiyel değişim göstermesi beklenen hedeflerden biri olan yağ asiti sentez ve lipogenez yolağındaki moleküler hedeflerin immunoblotlama ile doğrulanmasının gösterilmektedir.

BÖLÜM 4. TARTIŞMA

Teze konu olan ve insan kanser hücrelerinde son derece önemli bir moleküler hedef olarak tanımlanan metabolik değişimler, 1920'lerden beri Otto Warburg tarafından kanser hücrelerinde artan anaerobik glikoliz ile dikkati çekmiş ve eski bir fenomen olarak halen önemini korumaktadır (Warburg ve ark. 1927). Yakın dönemde FASN ifade düzeyindeki bozuklukların yaygın bir fenotip olarak kanser hücrelerinde gösterilmesi ile birlikte teze konu olan prostat kanseri gibi meme kanserinde de araştırmacıların ilgisini çekmiştir. FASN artan ifadesi kötü prognoz ile ilişkilendirilmekte ve kanser hücrelerinde değişen yağ asidi metabolik süreçlerinin önemli bir hedef olabileceğine işaret etmektedir (Lupu ve Menendez 2006, Jiang ve ark. 2014, Wu ve ark. 2014). FASN, asetil koenzim A, malonil koenzim A ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat gibi önemli organik enerji moleküllerinden elde edilen uzun moleküllü yağ asitlerinin *de novo* sentezini sağlayan önemli bir proteindir (Suburu ve Chen 2012). Bu mekanizmada, ACC, FASN için bir hız sınırlandırıcı enzim olarak işlev görmektedir. Her bir yağ asidinin üretimi yaklaşık 14 ATP ve 7 NADPH tüketilmesine neden olan anabolik bir süreç olarak işletilmektedir. FASN bu nedenle hem karaciğer hem de lipojenik dokularda aktif olduğu gibi 16 karbonlu yağ asiti (Palmitat) üretimi ile kanser hücrelerinde artan miktarlarda ifade edilmektedir. Palmitat yeni bir metabolit olarak kanserli hücrelerde normal hücrelere göre enerji yollarındaki dengeyi etkileyebilmektedir (Migita ve ark. 2009). Normal karaciğer ve yağ dokusu hücrelerinde yüksek kalori alımı ile trigliserit depolanmasına neden olmaktadır. Bu amaçla hem malonil koenzim A düzeyleri hem de karnitin palmitoiltransferaz-1 (CPT-1) üzerinde etkili olarak mitokondrial yağ asiti oksidasyonu indirgenerek depo materyal olan trigliseritler biriktirilir. Kanser hücrelerinde endojen yağ asiti sentezi ile trigliserit yerine fosfolipitler şeklinde esterleştirilmektedir. Ek olarak kanser hücrelerinde yağ asiti sentezinde yüksek kalorili besin alımının haricinde onkogen sinyal kaskadları ve transkripsiyonel olarak da düzenlenebilmektedir. Bu nedenle kanser hücrelerinde FASN regülasyonu üst ve alt sinyal yolları açısından kritik öneme sahiptir. Yapılan araştırmalarda FASN inhibisyonu yolu ile hem *in vitro* hem de *in vivo* modellerde apoptoz tetiklenmektedir. Normal hücrelerde (adipoz veya karaciğer dokusuna ait hücre tiplerinde), FASN ifadesinin bazal seviyede düşük düzeylerde olmasına karşın, prostat kanseri

hücrelerinde FASN'nin aşırı ifadesi ile dikkati çekmektedir. Bu durum FASN hedefli terapileri gündeme getirmekte ve FASN'in indirgenmesi ile kötü kanser progresyonunun azaltılması hedeflenmiştir. FASN aktivitesinde meydana gelen değişikliklerde Orlistat'ın önemi oldukça dikkat çekici düzeyde belirlenmiştir (Kuhajda 2006).

Yapılan çalışmalarda Orlistat'ın genel olarak prostat, meme ve kolon kanseri hücrelerinde kanser gelişimi sırasında anti-proliferatif etki göstererek apoptozu indüklediği ve FASN'nin inhibisyonuna bağlı olarak meme kanseri, T hücreli lenfoma hücrelerinde hücre büyümesini baskıladığı gösterilmiştir (Schcolnik-Cabrera ve ark. 2018). Orlistat bir FASN inhibitörüdür ve prostat kanserinde metastatik hücrelerde terapötik etkisini, FASN'nin etki mekanizmasının azaltılmasını sağlayarak gerçekleştirmektedir. Orlistat'ın FASN üzerindeki bu inhibisyon etkisi doza bağımlı olarak gerçekleşmektedir ve doza bağımlı orlistat uygulamasının hücre fazlarından G2/M fazlarında azalma, subG1 hücre popülasyonunda artışa sebep olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda genel olarak kanserli dokular incelendiğinde metastatik hücrelerin en belirgin özelliği, yağ metabolizmasını kullanarak fazla miktarda çoğalma, büyüme ve enerji için ihtiyacı olan desteği sağlamak amacıyla yağ asitleri ve fosfolipitler üretmektir. Ayrıca normal hücrelere oranla kanser hücrelerinin enerji gereksinimleri oldukça fazladır ve membran sentezi, hücre göçü, sinyal iletimi dahil birçok fonksiyonun gerçekleştirilmesi noktasında lipogenez kritik rol oynamaktadır (Lu ve ark. 2015, Huang ve ark. 2017).

Prostat kanserinde metastatik büyüme gösteren hücre tiplerine bakıldığında yağ asidi sentez yolağının uyarılması sonucunda lipid sentezinin arttığı belirlenmiştir. Buna bağlı olarak lipogenik enzimler prostat kanserinde kritik rol oynamaktadır. Prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesi sürecinde, dolaşımda var olan lipid miktarından bağımsız olarak daha yüksek miktarlarda lipid sentezi en belirgin özelliklerin başını da gelmektedir (Migita ve ark. 2009, Dalmau ve ark. 2015). Prostat kanser hücrelerinde FASN'nin aşırı ekspresyonu sonucu, AR'e bağlı olarak apoptozu inhibe edip onkogen gibi hareket ettiği ve hücre proliferasyonunu arttırdığını gösterilmektedir. FASN, SREBP ve ACC yardımı ile yağ asidi sentezinde ve metabolik bölgelerde önemli rol oynamaktadır. AR'ler lipid metabolizmasının ana düzenleyicisi olan SREBP aktivitesinin düzenlenmesinde etkilidirler. Prostat kanseri hücrelerinde AR kontrolünde artan lipogenik transkripsiyonel faktörlerden olan SREBP'ler tümör baskılayıcılar ile tetiklenen AMPK tarafından baskılanmaktadır ve AMPK lipogenik

yolak üzerinde etkin rol almaktadır (Tan ve ark. 2015). Prostat kanserine etki eden ana mekanizmalar yağ asidi sentezinden sorumlu olan kilit enzim FASN ve metabolik enerji sensörü olan AMPK'dır. Orlistat, ATP sitrat liyaz üzerinde AMPK'dan bağımsız etki gösteremezken, Orlistat etkisi AMPK yoksunluğunda daha belirgin bir şekilde gözlemlenmiştir. En kritik verilerden birisi ise Orlistat hücrelerde doza bağımlı bir şekilde FASN ifadesini baskılamakta, bu etki AMPK sessizleştirilmesi yapılmış hücrelerde gözlenmemiştir. Bu nedenle AMPK ifadesinin Orlistat ve FASN etkileşimi açısından kritik rol oynadığı düşünülmektedir (Galbraith ve ark. 2018). FASN'nin aşırı ekspresyonu sonucu, bir onkogen gibi hareket etmesi ile apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir. AMPK'nın SREBP, FASN ve ACC yardımı ile yağ asidi sentezinde ve metabolik bölgelerde önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Aktive edilmiş olan AMPK bir tümör baskılayıcısı gibi etki ederek birden fazla onkogenik yolu kapatabilmektedir ve lipogenezi inhibe edebilmektedir. AMPK bu fonksiyonları gerçekleştirmek için lipogenez için anahtar enzimlerden olan ATP sitrat liyaz (ACL), ACC ve FASN'ı direkt olarak fosforilayarak SREBP'i ise kesilme bölgesine fosforilasyon yaparak aktivasyonunu önleyebilmektedir. Ayrıca AMPK, mTOR sinyal yolu ile de apoptozu tetikleyebilmektedir. AMPK bu fonksiyonunu gerçekleştirmek için mTOR kompleksi 1 (mTORC1) doğrudan raptoru fosforile ederek engellemektedir (Luo ve ark. 2010). p53 ve FOXO3a AMPK tarafında fosforile olmasıyla hücre döngüsü ya da apoptoz tetiklenebilmektedir. Hücredeki AMPK miktarı ATP miktarının üzerine çıktığında hücrede oluşan açlık sebebi ile LKB1 proteini AMPK'ı fosforillemektedir. AMPK'ın fosforillenmesi ile FASN'nin etkili olduğu yollardan ACC'a fosfatlayarak bu yolağın çalışmasını önleyici şekilde inhibe etmektedir (Shackelford ve Shaw 2009). Bu yolağın çalışması durumunda FASN miktarında artış belirlenmiştir. AMPK bunu üst akışta ACC durdurarak FASN'nin artışının önüne geçerek sağlamaktadır. AMPK susturulduğunda orlistat uygulanmasına karşın FASN'de azalma gözlenmemektedir. Çünkü ortamda FASN'in üretimini engelleyecek bir fosforile olmuş AMPK'da bulunmamakta ve ACC fosfatlayarak FASN'nin çalışmasını durduramamaktadır (Yoshii ve ark. 2013). Bunun yanısıra ACLY, AMPK varlığında orlistat ile birlikte azalırken AMPK yoksunluğunda orlistat uygulanmasına karşın ACLY seviyesi sabit kalmaktadır. Aynı zamanda AMPK, Ser792' den Raptor'u fosforile eder bu durum mTOR ile Raptor arasındaki ilişkinin kesildiği yani kompleksin dağıldığı anlamı taşımaktadır. Bu fosforilasyon, raptoru içeren mTORC1 inhibisyonu gerçekleştirir ve raptor hücrenin enerji durumuna bağlı olarak hücre döngüsünün ilerlemesi noktasında

kritik öneme sahiptir. mTOR aktivitesi azaldıkça lipin seviyesi düşmektedir (Giunchi ve ark. 2019).

Bu projede, AMPK ifadesinin azalmasına bağlı olarak hücre sağ kalım ve ölüm yollarının araştırılması ve doza bağlı olarak Orlistat kullanımı ile FASN ifadesinin azaltarak agresif prostat kanser hücrelerinden olan PC3 ve prostat epitel hücresi olan PNT1A üzerindeki etkisi gösterilmeye çalışılmıştır. Sonuçlara bakıldığında MTT yöntemi ile prostat kanser hücresi olan PC3 ve prostat epitel hücresi olan PNT1A hücrelerine taşıyıcısı Etanol olan Orlistat'ın belirlenmiş olan dozları uygulanarak hücrelerdeki spesifik etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bakıldığında metastatik özellik gösteren PC3 hücrelerinde Orlistat uygulaması sonrasında göreceli hücre canlılığının %50' ye yakın bir oranda azaldığı ve PNT1A prostat epitel hücrelerin ise aynı dozlarda %30'a kadar daha az oranda etkilendiği belirlenmiştir ve bu sebeple çalışma boyunca bu dozlar tercih edilmiştir. PNT1A prostat epitel hücre hattında ise bu canlılık düşüşü belirlenememiştir (Şekil 4.1). Bakıldığında Orlistat PC3 ve PNT1A hücre hatları olmak üzere her iki hücre hattı üzerinde de etkili olmaktadır özellikle PC3 hücrelerinde, PNT1A hücrelerine göre daha yüksek oranda etki ettiği belirlenmiştir. Bu amaçla PC3 ve PNT1A hücrelerinde Orlistat'ın canlılığa olan etkisi koloni formasyonu ile gösterilmeye çalışılmıştır. Buna bağlı olarak belirlenen dozlarda Orlistat uygulaması sonrasında PNT1A hücreleri neredeyse etkilenmezken, PC3 hücreleri gözle görülür şekilde koloni oluşturma yeteneklerini kaybetmektedir. Orlistat taşıyıcısı olan Etanol uygulaması ile Orlistatın etkinliğini ispat edilmiştir. Orlistat'ın FASN inhibitörü olduğu düşünüldüğünde FASN ekspresyonun fazla olduğu hücre hatlarında canlılığın azaldığı düşünölmektedir (Şekil 4.7, 4.8). Orlistatın hücre morfolojisi üzerindeki etkisinin gösterilmesi amacıyla DiOC6 floresan boyaması yapılmış mitokondri membran potansiyeli (MMP) değişimler sağlıklı mitokondri ile gösterilmeye çalışılmıştır. PNT1A hücrelerinde herhangi bir azalma gözlemlenmezken PC3 hücrelerinde büyük miktarda bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.3). Orlistat tarafından tetiklenen MMP bozulması, hücrelerde iç apoptotik yolağı aktive etme potansiyelindedir. PNT1A hücrelerinde herhangi bir bozulma olmaması ise hücrelerin sağ kalıma doğru hareket ettiğini düşündürmüştür. Orlistat'ın PC3 hücreleri üzerinde belirgin bir antiproliferatif etki yarattığı daha önce yapılmış araştırmalarda gösterilmiştir. Buna bağlı olarak Orlistat uygulanmasının PC3 ve PNT1A prostat kanser hücre hatlarında genel olarak mTOR, FASN, AMPK, Akt

ilişkili proteinler üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 4.5, Şekil 4.6). Orlistat uygulamasına bağlı olarak fosforile olmuş olan Akt'ın azaldığı, FASN ve Lipin seviyesinde önemli azalmaların olduğu ve hücre canlılığının pozitif yönde etki oluşturup sağkalım üzerinde etkili olduğu göstermiştir. Fosforillenen AMPK'ın protein seviyesi artmış ve sağ kalım yolağında azalma olurken mTOR'da azalma belirlenmiştir. Hücrenin fosforilenmiş Akt, fosforilenmiş mTOR miktarlarında azalma ve fosforillenmiş AMPK'sında artış meydana gelmesi ile hücrenin stres altında olduğunu ve hücrede buna bağlı olarak apoptozun gerçekleşebileceğini düşünülmüştür. Daha önce yapılmış çalışmalarda Orlistat, hücre çoğalmasında ve hücre canlılığını önemli ölçüde azaltmıştır. Orlistat uygulaması yapılan prostat kanseri hücrelerinde G0/G1 hücre döngüsü durduğu ve Orlistat'ın FASN inhibisyonuna bağlı hücre ölüm yolunu apoptoz ile ilişkilendirmiştir (Vander Heiden ve ark. 2009). Elde edilen sonuçlar ile uyum gösteren PI sonucundaki Sub-G1 birikiminde hücrenin DNA'sının parçalandığı ve hücrenin öldüğü PC3 hücrelerinde Sub-G1 popülasyonunda doz bağlı Orlistat uygulaması sonrasında kontrole oranla %12,3'e kadar bir artış gözlenmişken, PNT1A prostat epitel hücrelerindeki dozlara bağlı orlistat uygulaması sonrasında kontrole oranla Sub-G1 popülasyonunda %2,1'e oranın bir popülasyon artışı belirlenmiştir. PC3 hücrelerinde yaklaşık 12 katlık çok ciddi miktarda bir Sub-G1 popülasyonunda artış gözlenirken PNT1A prostat epitel hücre hattında ise çok küçük bir artış belirlenmiştir (Şekil 4.2). Ama iki hücre hattında da AMPK'ya bağlı olarak artan açlık stresi ile ilişkili apoptoz olduğu düşünülmüştür. PNT1A prostat epitel hücrelerindeki hücre ölümünün az olmasının sebebi fosforillenmiş olan AMPK da meydana gelen artışın epitel hücrelerinde otofajik yolların artışına izin vererek hücre sağ kalımını sağlayan ve hücre enerji metabolizmasının korunmasını hedefleyen bir yol izlemiş olduğu düşünülebilir. Fosforile olmuş olan AMPK artığında hücrelerde AMP ve ADP vardır ancak ATP miktarı yeterli olmadığı için hücrenin enerjisi geri kazanması amacı ile otofaji yolağının aktivite kazanması gerekmektedir (Kim ve ark. 2011). Ancak bazı hücrelerdeki enerji metabolizması bozulması bağlı olarak hücreler otofaji yolağını kullanıp hayatta kalmak yerine ölmeyi tercih edebilmektedir. Bu noktadan hareketle PC3 ve PNT1A hücrelerinde meydana gelen hücre ölümündeki artışın bu sebeple çok olduğu düşünülebilir. Oluşan stres prostat kanseri hücrelerinde Sub-G1 artışı ölüm ile sonuçlanırken PNT1A hücrelerinde sağ kalım ve ölümden kaçışla cevaplanmış demek ki bu noktada PC3 hücreleri strese bağlı

bir apoptoz yolağı çalıştırırken PNT1A hücreleri strese bağlı bir otofajik yolak çalıştırarak hayatta kaldıkları düşünülebilmektedir (Wright ve ark. 2017).

Yara iyileşmesi testi bakıldığında PC3 hücrelerine uygulanan iki farklı dozda orlistat uygulaması sonrasında açıklığın azaldığı gösterilmiştir (şekil 4.4). Bu durum hücrenin bölünebilme, invazyon hareket edebilme yeteneğinin kısıtlandığı ve hücrenin strese bağlı olarak bölünerek oğalmada zorlandığı anlamına gelebilmektedir. AMPK susturulmasında CRISPR gen silme tekniği kullanılmış ve prostat kanser hücresi olan PC3 ve prostat epitel hücresi PNT1A için belirlenen dozlarda plazmit ve FuGENE® HD Transfection Reagent eklenmiş sonrasında bu plazmid için uygun antibiyotik olan Puromycin'i için uygun doz hücre yoğunluğu ve sitotoksositeye bakılarak seçilmiştir. Stabil koloniler seçilerek hücreler bytlmştir ve elde edilen yeni hücre hatlarından protein izolasyonu yapılmıştır ve immunoblotlama tekniği ile AMPK α protein seviyesi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (şekil 4.9). AMPK protein seviyelerine normale kıyaslandığında CRISPR tekniği kullanılan AMPK- hücrelerdeki AMPK protein seviyesi %50 den fazla miktarda bir azalma gerçekleşmiştir (Grenier ve ark. 2018). AMPK+/AMPK- PC3 ve PNT1A hücre hatlarındaki morfolojidede değişimler gözlenmiştir. AMPK ifadesinden yoksun stabil hücre hatlarına, daha sonrasında iki boyutlu jel elektroforezi yöntemi (2D-DIGE) uygulanarak AMPK+/AMPK- PC3 ve PNT1A hücre hatlarındaki toplam protein ifadesindeki değişim incelenmiştir. PC3 AMPK+, AMPK seçilen dozlarda Orlistat uygulaması kendi grup örnek alınarak mastır jel içerisinde değerlendirilmiş ve PDQuest (Biorad) programı spot analizi gerçekleştirilmiştir. PDQuest yazılımında yer alan karşılaştırma verilerine göre en az 4 kat fark ile %90 hassasiyette ortak değişimde olan ve kendi içinde değişimlerin temel alındığı spotlar elde edilmiştir. Elde edilen değişimler bilindiği üzere proapoptotik ve antiapoptotik proteinler daha kk kDa aralığında 10-27 arasında gösterilmekte iken yüksek kDa ise daha çok ULK-1, mTOR gibi proteinler gösterilmektedir. Değişikliklerin hangi moleküler ağırlıkta ve pH aralığında olduğunun bilinmesi oldukça önemlidir. TAGIDENT arama sonucu incelendiğinde 4.80-4.85 PI aralığında aynı kDa büyüklüğünde 31 potansiyel protein hedefi tanımlanmiştir. Bu nedenle ileride seçili spotların 4-7 pH striplerinde taranmasının önemli olacağı ve bu spotların kütle spektroskopisi ile taranması yolu ile 2D-DIGE sistemiden elde edilen verilerin doğrulanabileceği dşnlmektedir. Normalizasyon grafiklerindeki PC3 kontrol ve AMPK susturulması, PC3 kontrol ve orlistat uygulaması ve PC3 kontrol ve kontrol

örneklerine bakıldığında Mavi renk ile ifade edilen çizgi 4 kat ifade düzeyinde azalma sınırını, kırmızı çizgi ise 4 kat ifade düzeyinde artış sınırını göstermektedir (Şekil 4.21). Normalizasyon ile spot sayıları analiz edildiğinde iki tekrarlı jellerde toplamda 288 spot sayısı içerisinde 4 kat ifade düzeyinden daha çok azalan ve artan çok sayıda spot tanımlanmıştır. AMPK susturulması ve sessizleştirilen hücrelere orlistat uygulanması durumunda kontrole oranla 224 protein spotunun değişimi görülmüştür. 224 spotun 18'i AMPK- hücrelerde ifade edilmezken, bu oran orlistat uygulaması ile 81 düzeyinde azalan protein olarak tespit edilmiştir. Burada önemli olan ortak artan protein spotlarının gösterimidir (Şekil 4.24). 81 azalan protein spotuna karşın 10 tane ifade düzeyi artan spot gösterilmiştir. Çalışması arttırılan ve çalışması baskılanan gen sayılarının belirlenmesi ile seçilen spotların kütle spektroskopisi sonuçları tüm yolak analizi açısından önemli sonuçlar elde edilmesini sağlayabilecektir (Pasquali ve ark. 2017). Elde edilen diğer verilerin doğrulanması için AMPK sessizleştirilmiş PC3 ve PNT1A hücrelerinde orlistatın iki farklı dozu uygulanarak proteinlerin ifade düzeyleri immunoblotlama yöntemi belirlenmiştir ve FASN ilişkili daha önce immunoblotlama yöntemi ile incelenen proteinlerin ifade düzeyleri ile karşılaştırılmıştır. Akt ve fosforile olmuş mTOR azalmış burada PC3 ve PC3 AMPK- hücrelerini etkileyen etkin orlistat dozu 20 μM 'dir (Şekil 4.25). PNT1A ve PNT1A AMPK- hücrelerinde ise mTOR artmış, lipin azalmış AMPK neredeyse sabit ama fosforile olmuş AMPK artmış ACL protein seviyesindeki azalama PNT1A hücrelerine oranla daha fazla görülürken fosforile olmuş ACL'da ise kontrole oranla azalma göstermemiş ancak FASN' de azalma görülmüş bu da ortamda AMPK olmamasına karşın orlistat doğrudan FASN'e etki ederek FASN'i inhibe ettiği düşünülmüştür (Şekil 4.26) (Chen ve ark. 2019). Proteom düzeyinde araştırmalar Orlistat'ın etkilerinin geniş spektrumlu olarak gösterilebilmesinde önemlidir. Bu açıdan değerlendirildiğinde bir tetrahidrolipstatin olan Orlistat tripanozoma tedavisinde öngörülmekte ve proteom düzeyinde etkileri değerlendirildiğinde sadece bir lipaz inhibitörü olmanın yanısıra, anti-kanser yolaklarda etkili olabileceği gösterilmiştir (Yang ve ark. 2012) pH 3-10 aralığında striplerle gerçekleştirilen 2D elektroforez çalışmalarında Orlistat uygulanan SKOV hücre hatlarında, LC-MS/MS ile spotlar karakterize edilmiştir. ALDOA, ENO1, AHCY, GAPDH, ACOT7 ve FABP5 protein ifadelerinin kontrole oranla değiştiği gösterilmiştir. PKM2 ve FASN ifadesindeki düşüşler Orlistat'ın terapotik etkisi konusunda bilgi verici olmuştur (Huang ve ark. 2012).

Sonuç olarak anti-obezite tedavisinde Orlistat terapotik açıdan önem arz etmektedir. Orlistat'ın bu çalışma ile hücre içerisinde AMPK kanser hücrelerinde Orlistat ile ilişkili terapotik etkide önem arz etmektedir. Malign olmayan epitel hücrelerinde Orlistat'ın bu moleküler hedeflerden bağımsız bir şekilde hücre canlılığını azaltmaması anlamlı olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmayı takiben, daha ileri proteomik veri analizleri hücreler içerisindeki özgün hedeflerin değerlendirilmesi yönünde çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



KAYNAKLAR

(2018). "Orlistat: <https://en.wikipedia.org/wiki/Orlistat>." from <https://en.wikipedia.org/wiki/Orlistat>.

Adrain, C. veS. J. Martin (2001). "The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas." *Trends Biochem Sci* **26**(6): 390-397.

Allemani, C., T. Matsuda, V. Di Carlo, R. Harewood, M. Matz, M. Niksic, A. Bonaventure, M. Valkov, C. J. Johnson, J. Esteve, O. J. Ogunbiyi, E. S. G. Azevedo, W. Q. Chen, S. Eser, G. Engholm, C. A. Stiller, A. Monnereau, R. R. Woods, O. Visser, G. H. Lim, J. Aitken, H. K. Weir, M. P. Coleman veC. W. Group (2018). "Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries." *Lancet* **391**(10125): 1023-1075.

Baek, K. H., M. E. Hong, Y. Y. Jung, C. H. Lee, T. J. Lee, E. S. Park, M. K. Kim, J. H. Yoo veS. W. Lee (2012). "Correlation of AR, EGFR, and HER2 Expression Levels in Prostate Cancer: Immunohistochemical Analysis and Chromogenic In Situ Hybridization." *Cancer Res Treat* **44**(1): 50-56.

Barisic, K., J. Petrik veL. Rumora (2003). "Biochemistry of apoptotic cell death." *Acta Pharm* **53**(3): 151-164.

Bashir, M. N. (2015). "Epidemiology of Prostate Cancer." *Asian Pac J Cancer Prev* **16**(13): 5137-5141.

Bostwick, D. G., H. B. Burke, D. Djakiew, S. Euling, S. M. Ho, J. Landolph, H. Morrison, B. Sonawane, T. Shifflett, D. J. Waters veB. Timms (2004). "Human prostate cancer risk factors." *Cancer* **101**(10 Suppl): 2371-2490.

Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre veA. Jemal (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." *CA Cancer J Clin* **68**(6): 394-424.

Browne, C. D., E. J. Hindmarsh veJ. W. Smith (2006). "Inhibition of endothelial cell proliferation and angiogenesis by orlistat, a fatty acid synthase inhibitor." *FASEB J* **20**(12): 2027-2035.

Calabro, F. veC. N. Sternberg (2007). "Current indications for chemotherapy in prostate cancer patients." *Eur Urol* **51**(1): 17-26.

Chang, S. S. (2007). "Treatment options for hormone-refractory prostate cancer." *Rev Urol* **9 Suppl 2**: S13-18.

Chen, Z., C. Lei, C. Wang, N. Li, M. Srivastava, M. Tang, H. Zhang, J. M. Choi, S. Y. Jung, J. Qin veJ. Chen (2019). "Global phosphoproteomic analysis reveals ARMC10 as an AMPK substrate that regulates mitochondrial dynamics." *Nat Commun* **10**(1): 104.

Chiam, K., C. Ricciardelli veT. Bianco-Miotto (2014). "Epigenetic biomarkers in prostate cancer: Current and future uses." Cancer Lett **342**(2): 248-256.

Choudhury, Y., Z. Yang, I. Ahmad, C. Nixon, I. P. Salt veH. Y. Leung (2014). "AMP-activated protein kinase (AMPK) as a potential therapeutic target independent of PI3K/Akt signaling in prostate cancer." Oncoscience **1**(6): 446-456.

Chun, J. Y., N. Nadiminty, S. Dutt, W. Lou, J. C. Yang, H. J. Kung, C. P. Evans veA. C. Gao (2009). "Interleukin-6 regulates androgen synthesis in prostate cancer cells." Clin Cancer Res **15**(15): 4815-4822.

Dalmau, N., J. Jaumot, R. Tauler veC. Bedia (2015). "Epithelial-to-mesenchymal transition involves triacylglycerol accumulation in DU145 prostate cancer cells." Mol Biosyst **11**(12): 3397-3406.

Day, K. C., G. Lorenzatti Hiles, M. Kozminsky, S. J. Dawsey, A. Paul, L. J. Brose, R. Shah, L. P. Kunja, C. Hall, N. Palanisamy, S. Daignault-Newton, L. El-Sawy, S. J. Wilson, A. Chou, K. W. Ignatoski, E. Keller, D. Thomas, S. Nagrath, T. Morgan veM. L. Day (2017). "HER2 and EGFR Overexpression Support Metastatic Progression of Prostate Cancer to Bone." Cancer Res **77**(1): 74-85.

Di Sebastiano, K. M., K. E. Bell, A. S. Mitchell, J. Quadrilatero, J. A. Dubin veM. Mourtzakakis (2018). "Glucose metabolism during the acute prostate cancer treatment trajectory: The influence of age and obesity." Clin Nutr **37**(1): 195-203.

Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol **35**(4): 495-516.

Erdrich, S., K. S. Bishop, N. Karunasinghe, D. Y. Han veL. R. Ferguson (2015). "A pilot study to investigate if New Zealand men with prostate cancer benefit from a Mediterranean-style diet." PeerJ **3**: e1080.

Force, U. S. P. S. T., D. C. Grossman, S. J. Curry, D. K. Owens, K. Bibbins-Domingo, A. B. Caughey, K. W. Davidson, C. A. Doubeni, M. Ebell, J. W. Epling, Jr., A. R. Kemper, A. H. Krist, M. Kubik, C. S. Landefeld, C. M. Mangione, M. Silverstein, M. A. Simon, A. L. Siu veC. W. Tseng (2018). "Screening for Prostate Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement." JAMA **319**(18): 1901-1913.

Galbraith, L., H. Y. Leung veI. Ahmad (2018). "Lipid pathway deregulation in advanced prostate cancer." Pharmacol Res **131**: 177-184.

Giunchi, F., M. Fiorentino veM. Loda (2019). "The Metabolic Landscape of Prostate Cancer." Eur Urol Oncol **2**(1): 28-36.

Gomez-Millan, J., M. F. Lara, R. Correa Generoso, A. Perez-Rozos, Y. Lupianez-Perez veJ. A. Medina Carmona (2015). "Advances in the treatment of prostate cancer with radiotherapy." Crit Rev Oncol Hematol **95**(2): 144-153.

Goransson, O., A. McBride, S. A. Hawley, F. A. Ross, N. Shpiro, M. Foretz, B. Viollet, D. G. Hardie veK. Sakamoto (2007). "Mechanism of action of A-769662, a

valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase." J Biol Chem **282**(45): 32549-32560.

Grenier, A., P. Sujobert, S. Olivier, H. Guermouche, J. Mondesir, O. Kosmider, B. Viollet veJ. Tamburini (2018). "Knockdown of Human AMPK Using the CRISPR/Cas9 Genome-Editing System." Methods Mol Biol **1732**: 171-194.

Guertin, D. A. veD. M. Sabatini (2007). "Defining the role of mTOR in cancer." Cancer Cell **12**(1): 9-22.

Harris, W. P., E. A. Mostaghel, P. S. Nelson veB. Montgomery (2009). "Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion." Nat Clin Pract Urol **6**(2): 76-85.

Hemminki, K. (2012). "Familial risk and familial survival in prostate cancer." World J Urol **30**(2): 143-148.

Huang, F., G. Ding, Z. Yang veF. Yu (2017). "Two novel peptides derived from *Sinonovacula constricta* inhibit the proliferation and induce apoptosis of human prostate cancer cells." Mol Med Rep **16**(5): 6697-6707.

Huang, H. Q., J. Tang, S. T. Zhou, T. Yi, H. L. Peng, G. B. Shen, N. Xie, K. Huang, T. Yang, J. H. Wu, C. H. Huang, Y. Q. Wei veX. Zhao (2012). "Orlistat, a novel potent antitumor agent for ovarian cancer: proteomic analysis of ovarian cancer cells treated with Orlistat." Int J Oncol **41**(2): 523-532.

Jian, L., C. J. Du, A. H. Lee veC. W. Binns (2005). "Do dietary lycopene and other carotenoids protect against prostate cancer?" Int J Cancer **113**(6): 1010-1014.

Jiang, L., H. Wang, J. Li, X. Fang, H. Pan, X. Yuan veP. Zhang (2014). "Up-regulated FASN expression promotes transcoelomic metastasis of ovarian cancer cell through epithelial-mesenchymal transition." Int J Mol Sci **15**(7): 11539-11554.

Khan, A. S. veD. E. Frigo (2017). "A spatiotemporal hypothesis for the regulation, role, and targeting of AMPK in prostate cancer." Nat Rev Urol **14**(3): 164-180.

Kharmate, G., E. Hosseini-Beheshti, J. Caradec, M. Y. Chin veE. S. Tomlinson Guns (2016). "Epidermal Growth Factor Receptor in Prostate Cancer Derived Exosomes." PLoS One **11**(5): e0154967.

Kim, J. veG. A. Coetzee (2004). "Prostate specific antigen gene regulation by androgen receptor." J Cell Biochem **93**(2): 233-241.

Kim, J., M. Kundu, B. Viollet veK. L. Guan (2011). "AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1." Nat Cell Biol **13**(2): 132-141.

Kimura, K., M. Markowski, C. Bowen veE. P. Gelmann (2001). "Androgen blocks apoptosis of hormone-dependent prostate cancer cells." Cancer Res **61**(14): 5611-5618.

Koc, G., H. Turk, M. Karabicak, S. Un, B. Ergani veR. G. Ekin (2017). "Is Prostate Biopsy Recommended in Turkish Men with a Prostate-Specific Antigen Level between 2.5 and 4 ng/mL?" Curr Ther Res Clin Exp **84**: 50-53.

Kridel, S. J., F. Axelrod, N. Rozenkrantz veJ. W. Smith (2004). "Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity." Cancer Res **64**(6): 2070-2075.

Kristal, A. R., K. B. Arnold, M. L. Neuhouser, P. Goodman, E. A. Platz, D. Albanes veI. M. Thompson (2010). "Diet, supplement use, and prostate cancer risk: results from the prostate cancer prevention trial." Am J Epidemiol **172**(5): 566-577.

Kuhajda, F. P. (2006). "Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway." Cancer Res **66**(12): 5977-5980.

Kumar, D., S. Shankar veR. K. Srivastava (2014). "Rottlerin induces autophagy and apoptosis in prostate cancer stem cells via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway." Cancer Lett **343**(2): 179-189.

Leitzmann, M. F. veS. Rohrmann (2012). "Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates." Clin Epidemiol **4**: 1-11.

Liang, Y., N. S. Ketchum, P. J. Goodman, E. A. Klein veI. M. Thompson, Jr. (2014). "Is there a role for body mass index in the assessment of prostate cancer risk on biopsy?" J Urol **192**(4): 1094-1099.

Liu, D. D., C. C. Han, H. F. Wan, F. He, H. Y. Xu, S. H. Wei, X. H. Du veF. Xu (2016). "Effects of inhibiting PI3K-Akt-mTOR pathway on lipid metabolism homeostasis in goose primary hepatocytes." Animal **10**(8): 1319-1327.

Liu, Y., S. Majumder, W. McCall, C. I. Sartor, J. L. Mohler, C. W. Gregory, H. S. Earp veY. E. Whang (2005). "Inhibition of HER-2/neu kinase impairs androgen receptor recruitment to the androgen responsive enhancer." Cancer Res **65**(8): 3404-3409.

Lu, W., S. Du veJ. Wang (2015). "Berberine inhibits the proliferation of prostate cancer cells and induces G(0)/G(1) or G(2)/M phase arrest at different concentrations." Mol Med Rep **11**(5): 3920-3924.

Luo, Z., M. Zang veW. Guo (2010). "AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth." Future Oncol **6**(3): 457-470.

Lupu, R. veJ. A. Menendez (2006). "Pharmacological inhibitors of Fatty Acid Synthase (FASN)--catalyzed endogenous fatty acid biogenesis: a new family of anti-cancer agents?" Curr Pharm Biotechnol **7**(6): 483-493.

Madej, T., C. J. Lanczycki, D. Zhang, P. A. Thiessen, R. C. Geer, A. Marchler-Bauer veS. H. Bryant (2014). "MMDB and VAST+: tracking structural similarities between macromolecular complexes." Nucleic Acids Res **42**(Database issue): D297-303.

Malik, S. S., R. Batoool, N. Masood veA. Yasmin (2018). "Risk factors for prostate cancer: A multifactorial case-control study." Curr Probl Cancer **42**(3): 337-343.

Migita, T., S. Ruiz, A. Fornari, M. Fiorentino, C. Priolo, G. Zadra, F. Inazuka, C. Grisanzio, E. Palescandolo, E. Shin, C. Fiore, W. Xie, A. L. Kung, P. G. Febbo, A. Subramanian, L. Mucci, J. Ma, S. Signoretti, M. Stampfer, W. C. Hahn, S. Finn veM. Loda (2009). "Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer." J Natl Cancer Inst **101**(7): 519-532.

Mihaylova, M. M. veR. J. Shaw (2011). "The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism." Nat Cell Biol **13**(9): 1016-1023.

Muppala, S., S. K. P. Konduru, N. Merchant, J. Ramsoondar, C. K. Rampersad, B. Rajitha, V. Mukund, J. Kancherla, A. Hammond, T. K. Barik, M. Mannarapu, A. Alam, R. Basha, P. V. Bramhachari, D. Verma, P. S. Sushma, S. Pattnaik veG. P. Nagaraju (2017). "Adiponectin: Its role in obesity-associated colon and prostate cancers." Crit Rev Oncol Hematol **116**: 125-133.

Nomiya, T., H. Tsuji, S. Toyama, K. Maruyama, K. Nemoto, H. Tsujii veT. Kamada (2013). "Management of high-risk prostate cancer: radiation therapy and hormonal therapy." Cancer Treat Rev **39**(8): 872-878.

Nordstrom, T., O. Akre, M. Aly, H. Gronberg veM. Eklund (2018). "Prostate-specific antigen (PSA) density in the diagnostic algorithm of prostate cancer." Prostate Cancer Prostatic Dis **21**(1): 57-63.

Palmer, A. M., P. M. Greengrass, D. Cavalla veR. Society for Medicines (2000). "The role of mitochondria in apoptosis." Drug News Perspect **13**(6): 378-384.

Pasquali, M., T. Serchi, S. Planchon veJ. Renaut (2017). "2D-DIGE in Proteomics." Methods Mol Biol **1654**: 245-254.

Pernar, C. H., E. M. Ebot, K. M. Wilson veL. A. Mucci (2018). "The Epidemiology of Prostate Cancer." Cold Spring Harb Perspect Med **8**(12).

Pezaro, C., H. H. Woo veI. D. Davis (2014). "Prostate cancer: measuring PSA." Intern Med J **44**(5): 433-440.

Rebbeck, T. R., S. S. Devesa, B. L. Chang, C. H. Bunker, I. Cheng, K. Cooney, R. Eeles, P. Fernandez, V. N. Giri, S. M. Gueye, C. A. Haiman, B. E. Henderson, C. F. Heyns, J. J. Hu, S. A. Ingles, W. Isaacs, M. Jalloh, E. M. John, A. S. Kibel, L. R. Kidd, P. Layne, R. J. Leach, C. Neslund-Dudas, M. N. Okobia, E. A. Ostrander, J. Y. Park, A. L. Patrick, C. M. Phelan, C. Ragin, R. A. Roberts, B. A. Rybicki, J. L. Stanford, S. Strom, I. M. Thompson, J. Witte, J. Xu, E. Yeboah, A. W. Hsing veC. M. Zeigler-Johnson (2013). "Global patterns of prostate cancer incidence, aggressiveness, and mortality in men of african descent." Prostate Cancer **2013**: 560857.

Renehan, A. G., C. Booth veC. S. Potten (2001). "What is apoptosis, and why is it important?" BMJ **322**(7301): 1536-1538.

Sadi, M. V. (2017). "PSA screening for prostate cancer." Rev Assoc Med Bras (1992) **63**(8): 722-725.

Sajan, M. P., G. Bandyopadhyay, A. Miura, M. L. Standaert, S. Nimal, S. L. Longnus, E. Van Obberghen, I. Hainault, F. Fougelle, R. Kahn, U. Braun, M. Leitges veR. V.

Farese (2010). "AICAR and metformin, but not exercise, increase muscle glucose transport through AMPK-, ERK-, and PDK1-dependent activation of atypical PKC." Am J Physiol Endocrinol Metab **298**(2): E179-192.

Sarkar, S., J. E. Davies, Z. Huang, A. Tunnacliffe veD. C. Rubinsztein (2007). "Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein." J Biol Chem **282**(8): 5641-5652.

Saxena, P., M. Trerotola, T. Wang, J. Li, A. Sayeed, J. Vanoudenhove, D. S. Adams, T. J. Fitzgerald, D. C. Altieri veL. R. Languino (2012). "PSA regulates androgen receptor expression in prostate cancer cells." Prostate **72**(7): 769-776.

Scholnik-Cabrera, A., A. Chavez-Blanco, G. Dominguez-Gomez, L. Taja-Chayeb, R. Morales-Barcenas, C. Trejo-Becerril, E. Perez-Cardenas, A. Gonzalez-Fierro veA. Duenas-Gonzalez (2018). "Orlistat as a FASN inhibitor and multitargeted agent for cancer therapy." Expert Opin Investig Drugs **27**(5): 475-489.

Scher, H. I., K. Fizazi, F. Saad, M. E. Taplin, C. N. Sternberg, K. Miller, R. de Wit, P. Mulders, K. N. Chi, N. D. Shore, A. J. Armstrong, T. W. Flaig, A. Flechon, P. Mainwaring, M. Fleming, J. D. Hainsworth, M. Hirmand, B. Selby, L. Seely, J. S. de Bono veA. Investigators (2012). "Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy." N Engl J Med **367**(13): 1187-1197.

Shackelford, D. B. veR. J. Shaw (2009). "The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression." Nat Rev Cancer **9**(8): 563-575.

Stattin, P., A. J. Vickers, D. D. Sjoberg, R. Johansson, T. Granfors, M. Johansson, K. Pettersson, P. T. Scardino, G. Hallmans veH. Lilja (2015). "Improving the Specificity of Screening for Lethal Prostate Cancer Using Prostate-specific Antigen and a Panel of Kallikrein Markers: A Nested Case-Control Study." Eur Urol **68**(2): 207-213.

Suburu, J. veY. Q. Chen (2012). "Lipids and prostate cancer." Prostaglandins Other Lipid Mediat **98**(1-2): 1-10.

Takayama, K. veS. Inoue (2013). "Transcriptional network of androgen receptor in prostate cancer progression." Int J Urol **20**(8): 756-768.

Tan, M. H., J. Li, H. E. Xu, K. Melcher veE. L. Yong (2015). "Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery." Acta Pharmacol Sin **36**(1): 3-23.

Vander Heiden, M. G., L. C. Cantley veC. B. Thompson (2009). "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." Science **324**(5930): 1029-1033.

Verma, M., P. Patel veM. Verma (2011). "Biomarkers in prostate cancer epidemiology." Cancers (Basel) **3**(4): 3773-3798.

Warburg, O., F. Wind veE. Negelein (1927). "The Metabolism of Tumors in the Body." J Gen Physiol **8**(6): 519-530.

Wen, S., Y. Niu, S. O. Lee veC. Chang (2014). "Androgen receptor (AR) positive vs negative roles in prostate cancer cell deaths including apoptosis, anoikis, entosis, necrosis and autophagic cell death." Cancer Treat Rev **40**(1): 31-40.

Wright, C., A. K. V. Iyer, V. Kaushik veN. Azad (2017). "Anti-Tumorigenic Potential of a Novel Orlistat-AICAR Combination in Prostate Cancer Cells." J Cell Biochem **118**(11): 3834-3845.

Wu, X., L. Qin, V. Fako veJ. T. Zhang (2014). "Molecular mechanisms of fatty acid synthase (FASN)-mediated resistance to anti-cancer treatments." Adv Biol Regul **54**: 214-221.

Wyllie, A. H. (2010). ""Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology." Mol Neurobiol **42**(1): 4-9.

Xu, L., J. Chen, W. Liu, C. Liang, H. Hu veJ. Huang (2019). "Targeting androgen receptor-independent pathways in therapy-resistant prostate cancer." Asian J Urol **6**(1): 91-98.

Yamada, Y., K. Okihara, T. Iwata, K. Masui, K. Kamoi, K. Yamada veT. Miki (2015). "Salvage brachytherapy for locally recurrent prostate cancer after external beam radiotherapy." Asian J Androl **17**(6): 899-903.

Yang, P. Y., M. Wang, K. Liu, M. H. Ngai, O. Sheriff, M. J. Lear, S. K. Sze, C. Y. He veS. Q. Yao (2012). "Parasite-based screening and proteome profiling reveal orlistat, an FDA-approved drug, as a potential anti *Trypanosoma brucei* agent." Chemistry **18**(27): 8403-8413.

Yilmaz, H., G. Aksu veO. Dillioglugil (2015). "External beam radiotherapy for localized prostate cancer." Asian J Androl **17**(6): 892-898; discussion 897.

Yoshii, Y., T. Furukawa, N. Oyama, Y. Hasegawa, Y. Kiyono, R. Nishii, A. Waki, A. B. Tsuji, C. Sogawa, H. Wakizaka, T. Fukumura, H. Yoshii, Y. Fujibayashi, J. S. Lewis veT. Saga (2013). "Fatty acid synthase is a key target in multiple essential tumor functions of prostate cancer: uptake of radiolabeled acetate as a predictor of the targeted therapy outcome." PLoS One **8**(5): e64570.

Yuan, H., J. Y. Shyy veM. Martins-Green (2009). "Second-hand smoke stimulates lipid accumulation in the liver by modulating AMPK and SREBP-1." J Hepatol **51**(3): 535-547.

Zadra, G., C. Photopoulos, S. Tyekucheva, P. Heidari, Q. P. Weng, G. Fedele, H. Liu, N. Scaglia, C. Priolo, E. Sicinska, U. Mahmood, S. Signoretti, N. Birnberg veM. Loda (2014). "A novel direct activator of AMPK inhibits prostate cancer growth by blocking lipogenesis." EMBO Mol Med **6**(4): 519-538.

Zadra, G., C. Priolo, A. Patnaik veM. Loda (2010). "New strategies in prostate cancer: targeting lipogenic pathways and the energy sensor AMPK." Clin Cancer Res **16**(13): 3322-3328.

Zhou, X., M. Tan, V. Stone Hawthorne, K. S. Klos, K. H. Lan, Y. Yang, W. Yang, T. L. Smith, D. Shi veD. Yu (2004). "Activation of the Akt/mammalian target of

rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers." Clin Cancer Res **10**(20): 6779-6788.

Zhu, Y., J. Zhou, R. Ao veB. Yu (2014). "A-769662 protects osteoblasts from hydrogen dioxide-induced apoptosis through activating of AMP-activated protein kinase (AMPK)." Int J Mol Sci **15**(6): 11190-11203.

Zorlu, F., R. Zorlu, R. T. Divrik, S. Eser veK. Yorukoglu (2014). "Prostate cancer incidence in Turkey: an epidemiological study." Asian Pac J Cancer Prev **15**(21): 9125-9130.



EKLER

Ek 1. Kullanılan Çözeltiler

10X Fosfat Tampon Çözeltisinin (PBS) Hazırlanışı ((pH 7,4), 1 L için)

Sodyum klorür (NaCl) 80,0 gr

Potasyum klorür (KCl) 2,0 gr

Disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) 14,4 gr

Mono potasyum fosfat (KH₂PO₄) 2,4 gr

Distile su (dH₂O) 1000 ml

Kimyasallar 800 ml distile suyun içinde belirtilen miktarlarda çözülerek pH 7,4'e ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi distile su kullanılarak 1 L'ye tamamlanır ve çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir.

Hücre Dondurma Medyası Hazırlanışı (10 ml için)

Fetal sığır serumu (FBS) 9 ml

Dimetil sülfoksit (DMSO, (CH₃)₂SO) 1 ml

Hücre kültürüne uygun DMSO kullanılarak hazırlanan medya 0,22 µm'lik filtre kullanılarak süzülür ve -20°C'de muhafaza edilir. Dondurulan hücreler sıvı azot içerisinde uzun süreli olarak saklanır.

Tris-Baz Çözeltisinin (1,5 Molar) Hazırlanışı ((pH 8,8), 500 ml için)

Tris-baz ($C_4H_{11}NO_3$) 90,8 gr

Distile su (dH_2O) 500 ml

Tris-baz 800 ml suyun içinde belirtilen miktarda çözülerek pH 8,8'e ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır ve çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir.

Tris-Baz Çözeltisinin (0.5 Molar) Hazırlanışı ((pH 6,8), 500 ml için)

Tris-baz ($C_4H_{11}NO_3$) 30,25 gr

Distile su (dH_2O) 500 ml

Tris-baz 800 ml suyun içinde belirtilen miktarda çözülerek pH 6,8'e ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır ve çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir.

Hücre Lizis Tamponunun (CLB) Hazırlanışı (10 ml için)

M-PERTM Mammalian Protein Extraction Reagent 10 ml

Roche® PhosSTOP fosfataz inhibitör kokteyli 1 tablet

Roche® proteaz inhibitör kokteyli 1 tablet

Hazırlanan CLB +4°C'de muhafaza edilir.

5X Laemmlı Tamponunun Hazırlanışı (10 ml için)

1,5 M Tris-Cl çözeltisi (pH 6,8) 2,0 ml

Bromofenol mavisi (%1(ağırlık/hacim)) 0,5 ml

Gliserol 5,0 ml

β -merkaptoetanol 2,5 ml

Sodyum dodesil sülfat (SDS, $NaC_{12}H_{25}SO_4$) 2,0 gr

Hazırlanan Laemmlı tamponu -20°C'de muhafaza edilir.

Bradford Çözeltisinin Hazırlanışı (250 ml için)

Coomassie mavisi ($C_4H_5O_7N_3S_2$) 25,0 mg

%95 (hacim/hacim) etanol (C_2H_5OH) 12,5 ml

%85 (hacim/hacim) asetik asit (CH_3COOH) 25,0 ml

Distile su (dH_2O) 212,5 ml

Hazırlanan Bradford çözeltisi $+4^{\circ}C$ 'de muhafaza edilir.

%10 (w/v) Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisinin Hazırlanışı (100 ml için)

Sodyum dodesil sülfat (SDS, $NaC_{12}H_{25}SO_4$) 10,0 gr

Distile su (dH_2O) 100 ml

Hazırlanan SDS çözeltisi oda sıcaklığında muhafaza edilir.

%30 (v/v) Akrilamid/Bis-Akrilamid Çözeltisinin Hazırlanışı (100 ml için)

Akrilamid (C_3H_5NO) 29,2 gr

Bis-Akrilamid ($C_7H_{10}N_2O_2$) 0,8 gr

Distile su (dH_2O) 100 ml

Hazırlanan akrilamid/bisakrilamid çözeltisi $+4^{\circ}C$ 'de muhafaza edilir.

%10 (w/v) Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml için)

Amonyum persülfat ($(NH_4)_2S_2O_8$) 1,0 gr

Distile su (dH_2O) 10 ml

Hazırlanan APS çözeltisi $-20^{\circ}C$ 'de muhafaza edilir.

%12 (v/v) Poliakrilamid Jel Hazırlanışı

	ALT JEL	ÜST JEL
Distile su (dH ₂ O)	3,4 ml	3,075 ml
Tris-Baz çözeltisi	2,5 ml (1,5 M, pH 8,8)	1,125 ml (0,5 M, pH 6,8)
%10 (ağırlık/hacim) SDS	0,1 ml	0,05 ml
%30 (hacim/hacim) Akrilamid/Bis-akrilamid	4,0 ml	0,67 ml
%10 (ağırlık/hacim) APS	0,05 ml	0,025 ml
Tetrametiletilediamin (TEMED)	0,005 ml	0,005 ml

10X Yürütme Tamponun Hazırlanışı ((pH 8,3), 1 L için)

Tris-baz (C₄H₁₁NO₃) 30,3 gr

Glisin (C₂H₅NO₂) 144,0 gr

Sodyum dodesil sülfat (SDS, NaC₁₂H₂₅SO₄) 10,0 gr

Distile su (dH₂O) 1000 ml

Tris-baz ve glisin 800 ml distile su içinde belirtilen miktarlarda çözülerek pH 8,3'e ayarlanır. SDS bu aşamadan sonra eklenir ve çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir. 1X olarak kullanılır.

10X Transfer Tamponunun Hazırlanışı ((pH 8,3), 1 L için)

Tris-baz (C₄H₁₁NO₃) 30,3 gr

Glisin (C₂H₅NO₂) 144,0 gr

Distile su (dH₂O) 1000 ml

Kimyasallar 800 ml distile suyun içinde belirtilen miktarlarda çözülerek pH 8,3'e ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır ve çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir. 1X olarak kullanılır. %20 metanol içerir.

10X Tris Tampon (TBS) Çözeltisinin Hazırlanışı (pH 7,6), 1 L için)

Tris-baz ($C_4H_{11}NO_3$) 12,11 gr

Sodyum klorür (NaCl) 86,6 gr

Distile su (dH_2O) 1000 ml

Kimyasallar 800 ml suyun içinde belirtilen miktarlarda çözülerek pH 7,6'ya ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır ve çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir. 1X olarak kullanılır. TBS-Tween çözeltisi için 1X TBS içerisine 1:1000 (hacim/hacim) oranında Tween eklenir.

%5 (w/v) Süt Çözeltisinin Hazırlanışı (50 ml için)

Yağsız süt tozu 2,5 gr

1X TBS-T çözeltisi 50 ml

Hazırlanan süt çözeltisi $-20^{\circ}C$ 'de muhafaza edilir.

Tris-Baz Çözeltisinin (1 Molar) Hazırlanışı (pH 8,5), 500 ml için)

Tris-baz ($C_4H_{11}NO_3$) 60,5 g

Distile su (dH_2O) 500 ml

Hazırlanan 1 M Tris-baz çözeltisi oda sıcaklığında muhafaza edilir.

Kumarik Asit Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml için)

p-Kumarik asit ($C_9H_8O_3$) 0,15 gr

Dimetilsülfoksit (DMSO, $(CH_3)_2SO$) 10 ml

Hazırlanan kumarik asit çözeltisi $+4^{\circ}C$ 'de muhafaza edilir.

Luminol Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml için)

Luminol ($C_8H_7N_3O_2$) 0,44 gr

Dimetilsülfoksit (DMSO, $(CH_3)_2SO$) 10 ml

Hazırlanan Luminol çözeltisi $-20^\circ C$ 'de muhafaza edilir

Kemiluminesans Çözeltisinin hazırlanışı

Kemiluminesans A Çözeltisi	
Distile su (dH ₂ O)	9,0 ml
1 M Tris-baz çözeltisi, pH 8,5	1,0 ml
Kumarik asit çözeltisi	45,0 µl
Luminol çözeltisi	100,0 µl
Kemiluminesans B Çözeltisi	
Distile su (dH ₂ O)	9,0 ml
1 M Tris-baz çözeltisi, pH 8,5	1,0 ml
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	6,0 µl

A ve B çözeltileri hazırlandıktan sonra karıştırılır ve karanlık koşullarda kullanılır.

PBS/BSA Çözeltisinin Hazırlanışı (50 ml için)

BSA 0,5 gr

1X PBS çözeltisi 50 ml

Hazırlanan PBS/BSA çözeltisi $+4^\circ C$ 'de muhafaza edilir.

Blok Çözeltisinin Hazırlanışı (50 ml için)

BSA 0,5 gr

% 10 (w/v) SDS çözeltisi 2,5 ml

1X PBS çözeltisi 50 ml

Hazırlanan Blok çözeltisi $+4^\circ C$ 'de muhafaza edilir.

Hücre Dondurma Medyasının Hazırlanışı

9 ml filtre edilmiş Fetal Sığır Serumı ve 1ml dimetilsülfoksit (DMSO) ile hazırlanan dondurma medyası yardımıyla hücreler uzun süreli olarak sıvı azot tankının içinde saklanır.



EK 2. Cihazlar

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature Freezer	Arctiko
Derin dondurucu	2041D	Arçelik
Buzdolabı (No frost)	4263TMB	Arçelik
Distile su cihazı	TANKPE030	Millipore q-5UV
Protean i12 IEF Cell		Bio-Rad
UV-Translüminatör Transluminatör	GeIDOC	BioRad
Laminar Flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
Laminar flow	LN090	Nüve
Otoklav cihazı	OT40L	Nüve
Soğutmalı etüv	ES120	Nüve
Mikropipet (0,5-10 µl)	EH52836	Thermo Scientific
Mikropipet (20-200 µl)	EH46925	Thermo Scientific
Mikropipet (200-1000 µl)	T27274	Thermo Scientific
Floresan mikroskopu	1X71	Olympus
İnverted mikroskop	XDS-1B	SOIF
Optik mikroskop	701	İvyemen
Stereo mikroskop	V12	Zeiss
Kuru ısıtıcı blok	FN120	Nüve
Akış sitometri cihazı	AC6531180147	BD Biosciences
HPLC cihazı	120	Agilent Technologies
Kuru ısıtıcı blok	FN120	Nüve
İnkübatör	51026280	Thermo Scientific
Hassas tartı	LE6202S	Sartorius
pH metre	N315	BIO Technologies
Elektroforez sistemi	1658004	Bio-Rad
Transfer cihazı	10016505C	Bio-Rad
Rotasyon cihazı	SRT9D	Stuart Equipment
Vorteks	SA8	Stuart Equipment
Spektrofotometre	2100	Amershan Biosciences
Sıvı azot tankı	Arpege 40	Air Liquide
Santrifüj cihazı	5417R	Eppendorf
Santrifüj cihazı (Büyük)	5810R	Eppendorf
Santrifüj cihazı	22331	Eppendorf

Ek 3. Hücre Kültürü Donanımları

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
75cm ² hücre büyütme kapları	90076	TPP
25cm ² hücre büyütme kapları	90026	TPP
100mm hücre büyütme kapları	93100	TPP
60mm hücre büyütme kapları	93060	TPP
Steril pipetler (5ml)	94005	TPP
Steril pipetler (10ml)	94010	TPP
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	99722	TPP
Enjektör set	21G	ASTRAJE CT
Tripsin-EDTA	25200-056	Gibco
Penisilin/Streptomisin	15140-122	Gibco
Fetal Bovine Serum	10500-064	Gibco
RPMI 1640Medium	41966-029	Gibco
Hemositometre	640110	Marienfeld-Superior
Laminar flow	12469 2000	Thermo Scientific
Laminar flow	LN090	Nüve
Kriyovial tüp	V7634	Thermo Scientific
Ready strip IPG strips 7cm (pH 4-7)	1632001	Bio-Rad
Ready strip IPG strips 7cm (pH 3-10)	1632000	Bio-Rad
Pipet uçları (1000 µl)	4130135	CAPP
Pipet uçları (200 µl)	5130070	CAPP
Pipet uçları (10 µl)	5030010	CAPP

Ek 4. Kimyasallar

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Orlistat (Xenical)		
DMSO	K46505343517	Merck
DMSO	D2650	Sigma-Aldrich
Ready Prep 2-D cleanup Kit	1632130	Bio-Rad
Ready Prep 2-D Starter Kit	1632105	Bio-Rad
RIPA Lysis Buffer 50ml	24948	SantaCruz
N,N -Dimethylformamide (DMF) 1 mL	13050	Lumiprobe
2-D Kits ,Cyanine2 25 nmol	3A041	Lumiprobe
2-D Kits ,Cyanine3 25 nmol	3B041	Lumiprobe
2-D Kits ,Cyanine5 25 nmol	3C041	Lumiprobe
Etanol	CAS 64-17-5	Alko Med
Saf Etanol	32221	Sigma-Aldrich
2-merkaptotanol	S4805940 517	Merck
2-merkaptotanol	M7522	Sigma-Aldrich
Metanol	24229	Sigma-Aldrich
İzopropanol	K44518295 321	Merck
Agaroz	A9539	Sigma-Aldrich
H2O2 Hidrojen peroksi	K39218400838	Merck
Asetik Asid	27225	Sigma-Aldrich
Hidroklorik Asit	K43804717 239	Merck
Sodyum Klorür	A2941	Applichem
Protein İzolasyonu Tamponu	78501	Thermo
Phosphate buffered saline (PBS)	BE17-51-5F	Lonza
PI Boya	P4170-100MG	Sigma-Aldrich
Akrilamid / Bis-Akrilamid 30% çözelti	A9099	Sigma-Aldrich
Sığır Serum Albumin (BSA)	A2153-10G	Sigma-Aldrich
Laemli Tamponu	S3401-1V	Sigma
p-Coumaric Asid	C9008-1G	Sigma-Aldrich
Luminol	A2185	Applichem
Page Ruller Plus Prestained Protein Ladder	26619	Fermentas
Coomassie Blue Belirteci	A3480	Applichem
Ponceau kırmızı Belirteci	A1405	Applichem
Kristal Viyole	FN1048735	Merck
Amonyum persülfat	A2941	Applichem
EDTA	A2937	Applichem
DiOC6 Boya	2129966	Fluka
DCFH-DA Boya	C6827	Invitrogen
DAPI Boya		

Fetal Bovine Serum (FBS)	P290310	Pan Biotech
MTT Solüsyonu	M2128-5G	Sigma-Aldrich
SDS (Sodyum dedosil sülfat)	UN1888	Applichem
Tris Baz	648310	CALBIOCHEM
Tris-HCl	648317	CALBIOCHEM
Tween 20	S6740684 348	Merck
TEMED	A1148,0100	Applichem
Yağsız Süt Tozu	SC-2325	Santa Cruz Biotechnology
Glisin	3570	CALBIOCHEM
Nükleaz Bulundurmayan Su	42480093	QIAGEN
Super Block T20 Blocking Buffer	37536	Thermo



Ek 5. Antikorlar

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
β -Actin (13E5)	4970	Cell Signaling Technology
AMPK α (D63G4)	5832	
mTOR (7C10)	2983	
Akt (pan) (C67E7)	4691	
Fatty Acid Synthase (C20G5)	3180	
Acetyl-CoA Carboxylase (C83B10)	3676	
Phospho-Raptor (Ser792)	2083	
Phospho-AMPK α (Thr172) (40H9)	2535	
Raptor	AB5454	
Raptor (24C12)	2280	
ULK1 (R600)	4773	
Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2) XP(R)	5536	
Phospho-ULK1 (Ser757)	6888	
Phospho-mTOR (Ser2481)	2974	
Phospho-mTOR (Ser2448)	2971	

Özgeçmiş



1. Adı Soyadı: Esra NEBİLER

İletişim Bilgileri:

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

Telefon: 0 546 782 97 45

E-posta: nebileresra@gmail.com

2. Doğum Tarihi: 10.05.1990

3. Ünvanı: Yüksek Lisans Öğrencisi

4. Öğrenim Durumu:

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	İstanbul Üniversitesi	2011-2015
Y. Lisans Düzeyinde Özel Öğrenci	Tıbbi Biyoloji	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	2015-2016
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi	2016-2019

5. Ulusal ve Uluslararası Projeler

1.“Obezite tedavisinde kullanılan orlistat’ın prostat kanseri PC3 ve PNT1A hücre hatlarında AMPK α hedefi ilişkili global protein ifade düzeylerinin 2D-DIGE yöntemi ile tanımlanması” (TÜBİTAK 1002 Projesi, Proje no: 116Z804, 2017-2018, Bursiyer)

6. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Esra Nebiler*, Elif Damla Arisan, Ajda Coker Gurkan, Pinar Obakan, Narcin Palavan-Unsal "Orlistat is a Fatty Acid Synthase (FASN) inhibitor caused the modulation of AMPK and lipogenesis signaling axis in PC3 prostate cancer cells but not in PNT1A prostate epithelial cells" P.5.4069, 42nd FEBS Congress "From molecules to cells and back" 2017/Jerusalem, Israel (Poster sunumu: Esra Nebiler)

7. Çalışma ve Araştırma Deneyimleri

2016 Güz Yarıyılı Genel Biyoloji Laboratuvarı asistanlığı, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Bölümü

2015 Bahar Yarıyılı İmmünohistokimya ve İn situ Hibridizasyon Laboratuvarı Stajı, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Bölümü

8. Katıldığı Bilimsel Kongre/Seminer/Sempozyum ve Bilimsel Toplantılar

2014	İstanbul Üniversitesi "İyon Kanalları ve Kanser" Sempozyumu
2014	İstanbul Üniversitesi "İnsan Beynin Evrimi" Sempozyumu
2015	İstanbul Kültür Üniversitesi "Kök Hücre Temelli Tedavilerde Güncel Yaklaşımlar" Çalıştay
2015	İstanbul Üniversitesi Uluslararası "İÜGEN 12.Kış Okulu" Kongresi
2017	42nd FEBS Congress "From Molecules To Cells And Back"

9.Aldığı Sertifikalar

T.C İstanbul Üniversitesi Hasan Ali Yücel Eğitim Fakültesi Pedagojik Formasyon Sertifikası (22.11.2016)

10.Bilimsel ve Mesleki Kurslara Üyelik

2014 İstanbul Üniversitesi Diyabet Araştırma Grubu

