

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**PROSTAT KANSERİ GELİŞİMİNDE
ANDROJENLERİN OKSİDATİF STRES
KONTROLÜNDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Nurşah ERTUNÇ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 614.02.07

Sunuş Tarihi : 18.06.2015

**Bornova-İZMİR
2015**

Nurşah Ertunç tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Prostat kanseri gelişiminde androjenlerin oksidatif stres kontrolündeki rolünün araştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 18.06.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ

.....

Raportör Üye: Prof. Dr. Semra KOÇTÜRK

.....

Üye : Doç. Dr. Günay Yetik Anacak

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

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

18/06/2015

Nurşah Ertunç

ÖZET**PROSTAT KANSERİ GELİŞİMİNDE ANDROJENLERİN
OKSİDATİF STRES KONTROLÜNDEKİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

ERTUNÇ, Nurşah

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kemal Sami Korkmaz

Haziran 2015, 100 sayfa

Androjen reseptörü (AR), ligand-bağımlı steroid reseptör ailesine ait bir transkripsiyon faktörüdür. AR sinyal yolağı prostat gelişiminde önemli olduğu kadar, prostat kanseri gelişiminde, büyümesinde ve ilerlemesinde de önemli rol alır. Oksidasyon hücrede reaktif oksijen türlerinin artışına yada azalışına sebep olur. Dolayısıyla, doğrudan yada dolaylı yollardan etkileşim aracılığı ile androjen reseptör sinyalizasyonunu içeren çeşitli hücresel olayların yanıtına neden olur.

Bu tez çalışmasında, normal ve tümör (androjene duyarlı ve dirençli) prostat hücre hatlarında, oksidatif stres oluşumu ile prostat kanseri arasındaki ilişki ve androjenlerin ilgili yollara olan etkisinin çalışılması amaçlanmıştır. İnflamasyon ile indüklenmiş prostat kanserinde AR proteininin kaybının önemi LNCaP prostat kanser hücrelerinde *in vitro* akut ve kronik inflamasyon modelleri ile çalışılmıştır. Koşullandırılmış ortam (CM) uygulamalarında, CM dozuna bağlı olarak AR'ın yıkımı görülürken, bu yıkımın antioksidan LNAC uygulaması ile geri döndürülebildiği bulgulanmıştır. LNCaP hücrelerinde CM uygulaması ile birlikte siRNA aracılıklı olarak AR susturulduğunda, AR yoksunluğu ve CM-aracılıklı proteosomal yıkımın toplam sonucu olarak NKX3.1 seviyesinin azaldığı gözlenmiştir. Dahası, DCFH array yöntemiyle intraselüler ROS seviyesi androjen uygulaması sonrası araştırıldığında, AR varlığında, hidrojen peroksit konsantrasyonuna bağlı olarak artan ROS seviyesinin androjen uygulaması ile gerilediği görülmüştür. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, ROS seviyesinin androjenlere duyarlılık gösteren prostat kanseri hücrelerinde androjen uygulaması ile baskılanmış olması androjen varlığının ve AR aktivasyonunun antioksidan yanıt üzerindeki önemini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: Prostat kanseri, AR, inflamasyon, ROS

ABSTRACT**INVESTIGATING THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS
CONTROL OF ANDROGENS ONTO DEVELOPMENT OF
PROSTATE CANCER**

ERTUNÇ, Nurşah

MSc in biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Kemal Sami Korkmaz

June 2015, 100 pages

The androgen receptor (AR) is a ligand activated transcription factor that binds DNA response element as a homodimer. The androgen receptor and its signaling pathway play an important role in development, growth and progression of prostate cancer. Oxidative stress caused by an increase in reactive oxygen species levels or a decrease in cellular capacity can evoke the modulation of various cellular events including androgen receptor signaling via direct or indirect interaction.

In this study, using prostate cell lines, it is aimed to examine the effect of androgens to related pathways and relationship between oxidative stress formation and prostate cancer. Significance of AR protein loss in inflammation-induced prostate cancer is studied *in vitro* acute and chronic inflammation models in LNCaP prostate cancer cells. CM treatments resulted in the degradation of AR in dose-dependent manner. Interestingly, LNAC treatment restored AR. Furthermore, we performed AR silencing together with CM treatment in LNCaP cells, and the results showed that reduced NKX3.1 level was a consequence of the synergetic effects of repression of AR transactivation due to AR depletion and CM-mediated proteasomal degradation. Moreover, the intracellular ROS level was examined using the DCFH assay following the treatment of LNCaP cells with synthetic androgens. Thus, significant reduction in the ROS level was observed. By the evaluation of all data, it is concluded that loss of AR signaling result in the effect on antioxidant response of AR activation.

Keywords: Prostate cancer, AR, Inflammation, ROS

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecim için beni laboratuvarına kabul ederek hayatımı farklı yönlendiren, tezimin aşamalarında bana yardımcı olan ve motive eden katkılarından dolayı, başarılı bir akademisyen olan değerli hocam ve tez danışmanım Prof, Dr. Kemal Sami Korkmaz'a değerli zamanını ayırdığı için teşekkür ederim.

Tezimin başlangıcından bitimine kadar olan deneysel ve rutin çalışmalarında zorlandığım her konuda hep destek olan, anlattıklarıyla bana yön veren ve başarılı olmam için emek harcayan, akademik olarak başarılı bir bilim insanı olan ve bu laboratuvarda onunla çalışma fırsatı bulduğum için kendimi şanslı saydığım, sevgili Dr. Bilge Debeleç Bütünler'e bana kattığı her şey için minnettarım.

Laboratuvar çalışmalarında, başım ne zaman sıkışırsa hep yanımda olan, deneysel çalışmalarında da yardımını esirgemeyen ve laboratuvarda aynı ortamı paylaşmaktan keyif aldığım, her zaman iyi ki tanışmışım diye düşündüğüm ve yıllarca arkadaşlığını kaybetmeyeceğim çalışma arkadaşım Bilge Esin Öztürk'e çok teşekkür ederim. Laboratuvarda çok güzel bir çalışma ortamı sunan, birbirlerine her zaman koşulsuz yardım eden, tüm iyi niyetli çalışma arkadaşlarım Mert Burak Öztürk, Gizem Gülevin Takır, Gencer Kaan Akyüz, Öznur Singin ve Aykut Bostancı' ya teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana destek olan, zor durumlarımda beni yalnız bırakmayan sevgili aileme beni bugünlere taşıdıkları için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Prostat Kanseri	3
2.1.1. Prostat kanserinin risk faktörleri	4
2.1.2. Prostatın yapısı ve gelişimi	5
2.1.3. Prostat kanserinin tarihi	7
2.1.4. Prostatta patolojik lezyonlar	8
2.1.5. Prostat kanserinin moleküler patogenezi	10
2.2. Androjen reseptörü (AR)	12
2.2.1. Androjenle regüle olan genler	14

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.2.2. Prostat kanserinde androjen reseptörü	15
2.2.3. Androjen-bağımlı prostat kanseri	16
2.2.4. Kastrasyon-bağımlı prostat kanseri	17
2.3. İnflamasyon	19
2.3.1. İnflamasyon ve prostat kanseri	20
2.4. ROS, Oksidatif stres, AR	24
2.4.1. ROS üretimi ve prostat kanseri	24
2.4.2. Oksidatif stres ve prostat kanseri	27
2.4.3. Transkripsiyon faktörleri ve sinyal yolları	29
2.4.4. Oksidatif stres ve AR sinyalizasyonu	32
3. MATERYAL VE METOD	35
3.1. Materyal	35
3.1.1. Cihaz	35
3.1.2. Sarf malzemeler	36
3.2. Metod	40

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.1. Hücre kültürü	40
3.2.2. Transfeksiyon	42
3.2.3. RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-PCR	43
3.2.4. İmmünoflöresan.....	44
3.2.5. İmmünoablota (western-blot)	45
3.2.6. İnflamatuar şartlandırılmış (CM) ortam üretimi.....	48
3.2.7. DCFH ile ROS ölçümü.....	49
3.2.8. Gerçek zamanlı hücre proliferasyon ölçümü.....	50
3.2.9. Aklides Nuk sistemi ile γ -H2AX odak sayımı	51
4. BULGULAR	52
4.1. AR, NKX3.1 ve p53 degradasyonlarının LNAC uygulaması ile inhibisyonu	52
4.2. Oksidatif stres regülatörü enzimlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde NKX3.1'in etkisi	53
4.3. Oksidatif stres ve inflammatuar koşullarda SIRT1 aracılıklı oksidatif stres gelişimi.....	56

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.4. Kronik oksidatif stres ve inflamasyon sonrasında antioksidan yanıt kaybı	60
4.5. Androjenler ve AR'ın hücre içi ROS seviyesine etkisi.....	61
4.6. Androjen reseptörü fonksiyon kaybının ROS oluşumu ve Oksidatif DNA hasarına etkisi	63
4.7. Androjenler ve AR'ın DNA hasarına etkisi	64
4.8. Androjenlerle regüle olan NKX3.1'in DNA hasarı oluşumu üzerindeki etkisinin araştırılması	65
4.9. Androjen yolağının Oksidatif stres ile DNA hasarı yanıtındaki etkisinin araştırılması	66
4.10. Kronik inflamasyon ve Oksidatif stres durumunda DNA hasarı yanıtı ..	68
5. TARTIŞMA	69
KAYNAKLAR DİZİNİ	73
ÖZGEÇMİŞ	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Amerika Birleşik Devletleri için tahmin edilen ölüm sayısı	3
2.2. Prostat kanserinin moleküler patogenezi	6
2.3. Prostatın anatomisi	7
2.4. Prostat kanseri gelişim yolağı	10
2.5. Prostat kanseri patogenezi	12
2.6. AR gen organizasyonu ve protein domain yapısı	13
2.7. Androjen reseptörü aktivasyon mekanizmaları	14
2.8. Prostat tümör büyümesinde AR'ın rolünün şematik taslağı	16
2.9. Androjen-bağımlı ve kastrasyon-dirençli prostat kanserinde AR'ın rolü	18
2.10. Kanserde kemokin akış diyagramı	21
2.11. ROS'un metabolik ve biyolojik etkileri	26
2.12. ROS'ın enzimatik eliminasyonu.	27
2.13. Androjen deprivasyonu terapisi, oksidatif stres, androjen reseptör sinyali ve kastrasyon-dirençli prostat kanseri arasındaki ilişkinin şematik gösterimi	28

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
2.14. Transkripsiyon faktörleri arasındaki ilişki ile AR ekspresyonunun indüklenmesi ve kastrasyon dirençli prostat kanserine gelişimin şematik gösterimi.....	29
2.15. NKX3.1 iki farklı mekanizma ile AR'ın transkripsiyonel ağını düzenler	32
2.16 Prostat kanserinde oksidatif stresle aktive olan sinyal yollarının şematik gösterimi.....	33
3.1 In vitro inflamasyon modeli basamaklarının şematik gösterimi.....	50
3.2 Aklides Nuk sisteminin çalışma prensibine ilişkin örnek analizler	52
4.1. Antioksidan LNAC uygulaması ile AR, NKX3.1 ve p53 protein düzeylerinin korunması	53
4.2 NKX3.1 susturulmasıyla oksidatif stres regülatörü genlerin ekspresyonunda bozulma	55
4.3 NKX3.1 ekspresyon artışı ile oksidatif stres düzeyinin baskılanması	56
4.4 İnflamatuar mikroçevrede artan DNA hasarına karşın oksidatif stres direnci gelişimi.....	59
4.5 LNCaP hücrelerinde NKX3.1 aşırı ifadesi ve SIRT1 ilişkisi	60
4.6 LNCaP hücrelerinde androjenlere bağlı olarak anlamlı değişen hücre içi ROS seviyeleri.....	62
4.7 LNCaP ve LNCaP 104r2 hücrelerinde H ₂ O ₂ uygulamasına bağlı olarak değişen hücre içi ROS seviyeleri karşılaştırılmıştır	63

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.8 LCaP hücrelerinde AR fonksiyon kaybının hücre içi ROS düzeyine etkisi	64
4.9 AR ekspresyonunun baskılanmasıyla değişmeyen ancak LNAC uygulaması ile artan DNA hasarı ve γ -H2AX odak bulunduran hücreler, gruplanarak gösterilmiştir	65
4.10 NKX3.1 ekspresyonu ile artan oksidatif stres düzeyinde artan DNA hasarı	66
4.11 LNCaP ve 104r2 hücre hatlarında AR susturulmasının ardından 3, 6, 24 saat, 50 μ M Menadion uygulamasına bağlı proteinlerin ekspresyon değişimi	67
4.12 LNCaP hücrelerinde iki hafta süreyle H2O2 ve CM (50 ve 100 pg/ml TNFa içeren inflamatuvar ortam/CM) uygulamasına bağlı γ -H2AX odak oluşumu değişimi	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Ayırma jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları	47
3.2 Depolama jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları.	47

1. GİRİŞ

Prostat kanseri, batılı ülkelerde karşılaşma sıklığı en yüksek kanserlerdendir. Androjen reseptör aktivitesi, prostat kanseri gelişmesinde, büyümesinde ve ilerleyişinde önemli role sahiptir (Abate-Shen and Shen, 2010; Atuğ, 2015). Prostat kanserinin tedavisinde uygulanan androjen ablasyonu tedavisi/anti-hormon tedavisi organ içi sınırlarda olan andenokarsinomun gerilemesine neden olmakta ancak, sonrasında sıklıkla hormon dirençli tümörlerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu evreye erişen tümörlerin tedavisi için ise etkin bir yöntem bulunmamaktadır.

Oksidatif stres, prostat karsinogenezinde başlama, gelişme ve ilerleme olarak tanımlanan 3 basamağın hepsine katkı sağlar. Birçok kanser tipinde artmış reaktif oksijen/nitrojen türleri (RONS) üretimi görülmektedir. Bu durum başlangıçta tümörlerin regresyonuna neden olurken, daha ileride artan ROS seviyesinin tolere edilmesi ile ROS dirençliliği yüksek hücre gruplarının ortaya çıkışını tetiklemektedir (Guyton and Kensler, 1993). Bu nedenlerle, androjenlerin oksidatif stres regülasyonundaki rolünün araştırılması, antiandrojen tedavi yaklaşımının, ROS ile tetiklenen tümörleşme mekanizmaları üzerindeki etkisinin aydınlatılması açısından önem taşımaktadır.

Son yıllarda yapılan araştırmalarda, ROS'un kronik inflamasyon ve kanser arasındaki bağlantıyı tamamladığı gösterilmektedir. Bu tez kapsamında, *in vitro* prostatik inflamasyon modeli ile LNCaP hücreleri, doz ve süre bağımlı mikroçevrede beslenmiştir. Normal/Tümör (androjen duyarlı ve androjene dirençli) prostat hücre hatlarında, oksidatif stres oluşumu ile prostat kanseri arasındaki ilişki ve androjenlerin ilgili yollara olan etkisinin çalışılması amaçlanmıştır. Hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) düzeyinin artışına bağlı olarak tetiklenen hücrenin proliferasyon (kronik enflamasyon gibi) ve kanserde baskılanan apoptoz yolları çalışılmıştır.

Ayrıca, AR, p53, SIRT1 ve NKX3.1 seviyeleri/ fosforilasyonları, işlev kazandırma (gain of function), baskılama (siRNA) yöntemleri ile araştırılmış,

ROS aracılıklı protein yıkımına bağılı değişimleri antioksidan L-NAC kullanılarak baskılanmıştır.

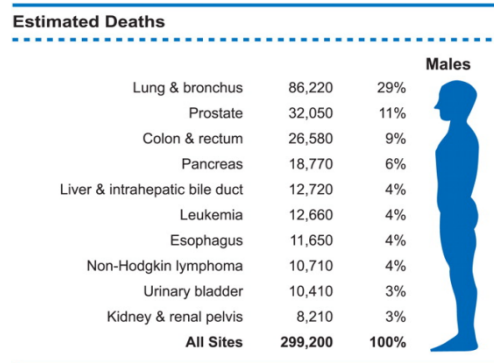
ROS artışına bağılı olarak gelişen atrofi oluşumunda AR kaybı, metabolik aktivitenin artışına bağılı gelişen SIRT1 aktivasyonu p53 ve AR asetilasyonları ile eşleşik olarak artan DNA hasarı dőzeyleri L-NAC yokluğunda/varlığında araştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat Kanseri

Prostat kanseri ileri yaş erkek popülasyonunda en sık görülen sağlık problemlerinden biridir (Görgel vd., 2011). Erkeklerde teşhis edilmiş en yaygın kanser türüdür ve dünyada ölüm sıralaması bakımından ikinci sıradadır (şekil 2.1) (Taverna et al., 2015).

Prostat kanseri, prostat bezindeki hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozularak, organ hacminin malin büyümesi olarak tanımlanabilir. İstatistiksel açıdan tüm kanserlerin %32'sini oluşturur. Avrupa'da en sık görülen solid tümör olup her 1000 erkekten 214'in de prostat kanseri gözlenmektedir. Prostat kanseri bir yaşlılık hastalığı olup 40 yaş altı erkeklerde nadiren oluşur. İnsidansı 40 yaşlarından 80'li yaşlara uzanana kadar giderek artar.



Şekil 2.1: Amerika Birleşik Devletleri için tahmin edilen ölüm sayısı, 2015

Prostat adenokarsinomunun derecelendirilmesinde gleason skoru en sık kullanılan sistemdir. Donald Gleason tarafından 1966 yılında prostat kanseri için geliştirilen derecelendirilme sistemi, 2005 yılında yapılan Uluslararası Ürolojik Patoloji Grubu Prostat Karsinomu Gleason Derecelendirilmesi (ISUP) Uzlaşma Toplantısı'nda kapsamlı olarak yenilenmiştir (Görgel vd., 2011). Prostat spesifik antijenin (PSA) serum seviyesinin miktarı en önemli tümör belirteçidir, ancak önemli zorluklara da sahiptir. PSA sıklıkla, prostat hiperplazisi, prostatit ya da prostat enfarktüsü gibi neoplastik olmayan durumlar da değerlendirilir. Bu değerlendirmeler birincil klinik karar için temel oluşturur çünkü bu durum dikkate

değer bir klinik sonuçtur. PSA taraması ile prostat kanserinden ölüm %20'ye kadar azaltılmıştır, ancak sık tanının artan riski ile ilişkilendirilmiştir.

2.1.1. Prostat Kanserinin Risk Faktörleri

Prostat kanserinde en önemli risk faktörü yaş'tır. 40 yaşından daha genç erkeklerde prostat kanserine yakalanma sıklığı 10.000' de 1 iken, bu risk 60 yaşa kadar 7'de 1'e yükselmektedir. İnflamasyon, oksidatif stres ve DNA hasarı, yaşlanma, genomik değişimler, genetik faktörler ve epigenetik değişiklikler gibi prosesler prostat karsinogenezi ile ilişkili bulunmuştur.

İlerlemiş yaşta prostat kanserinde, artan yaş ile birlikte en azından 3 etiyolojik faktörden söz edilmektedir. Bunlar, hormonal etkiler, genetik faktörler, diyet ve çevresel faktörler şeklinde gruplara ayrılabilir (Abate-Shen and Shen, 2010).

2.1.1.1. Hormonal etkiler

Androjenler

Androjenler prostatın gelişimini ve olgunlaşmasını etkilemektedirler, bunu prostat epitel hücrelerinin çoğalması ve farklılaşmasını sağlayarak yapmaktadırlar. Androjenler; testosteron, androstenedion, dihidrotestesteron (DHT), dehidroepiandrosteron (DHEA) gibi erkek cinsiyet hormon topluluğudur (İzmirli, 2010). Dihidrotestesteron normal prostat gelişimi için önemlidir, fakat prostatın fazlaca büyümesine sebep olur ve prostat kanseri gelişimine de katkıda bulunabilir (National Cancer Institute, 2013).

Bazı çalışmalarda, prostat kanseri insidansının yüksek olmasının, dolaşımdaki androjen seviyesi ile ilişkilendirilmesine rağmen, yapılan başka çalışmalarda testosteron seviyesindeki artış ile prostat kanseri arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Bu yüzden, androjen ve androjen metabolitlerinin prostat kanseri riskine etkisi halen tartışılmaktadır (İzmirli, 2010).

2.1.1.2. Genetik faktörler

Prostat kanserinin genetik yanı bulundduğuna dair çok sayıda çalışma vardır. Tek yumurta ikizlerinde genetik geçişin olduğu ve ailesinde prostat kanseri görülen kişilerde prostat kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda ailesinde prostat kanserine yakalanan kişi sayısı, yakınlık derecesi ve bu kişilerin prostat kanserine yakalandığı yaş ne kadar erken ise risk o kadar artmaktadır. Ailede birden fazla kişide prostat kanseri var ise bu risk daha da artmaktadır, ayrıca kansere yakalanan kişilerin yaşı ne kadar genç ise risk daha da fazla artmaktadır (Atuğ, 2015).

2.1.1.3. Diyet ve çevresel faktörler

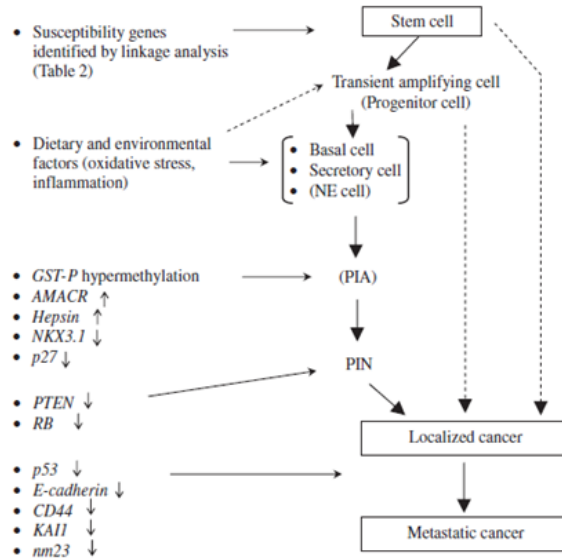
Diyet ile yüksek oranda yağ alınımının prostat kanseri riskini artırdığı düşünülmektedir. Fazla yağ tüketimi hem in vitro hem de in vivo olarak prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu uyarabilmektedir. Bazı çalışmalarda yüksek kalsiyum tüketiminin prostat kanseri riskinde artışa sebep olduğu bulunmuştur. Likopen, selenyum ve E vitamininin antioksidan etkileriyle kanserde potansiyel bir negatif faktör oldukları ile ilgili çalışmalar vardır (İzmirli, 2010).

2.1.2. Prostatın Yapısı ve Gelişimi

Prostat, erkekelerde mesanenin hemen alt bölümünde glandüler ve fibromüsküler dokulardan oluşan sıkı kıvrımlı bir organdır. Büyüklüğü kişiye göre değişiklik göstermekle birlikte orta boy kestane büyüklüğü ve şeklindedir. Ağırlığı yaklaşık 20 gramdır. Yüksekliği 2,5-3 cm, genişliği “sağ-sol” 4 cm, kalınlığı “ön-arka” 2,5 cm kadardır. Yaklaşık 1mm kalınlığında bir kapsül ile çevrilidir (Kuran, 1983; Sezer, 1980).

Normal prostat bezi 3 farklı hücre tipinden oluşur. Bunlar, lüminal salgı hücreler, bazal hücreler ve nöroendokrin hücrelerdir. lüminal salgı hücreler, CD57, androjen spesifik antijen (PSA) ve androjen reseptörünün (AR) ekspresyonu ile karakterizedir. Bazal hücreler, sitokeratin 5 ve 14, CD44 ve androjen reseptörünün düşük seviyesini içerir. Nöroendokrin hücreler ise,

androjen-bağımsızdır ve kromogranin A ve çeşitli peptid hormonların ifadesini sağlar. İlginç olarak, prostat kanseri hücreleri hem bazal hemde salgı fenotipinde olduğu gösterilmiştir. Bunun üzerine bir hipotez kurulmuştur ve hipoteze göre; androjen-bağımsız bazal hücreler ile ilişkilendirilmiş prostat içerisinde kök hücrelerin varlığıdır. Prostat kök hücre antijeni (PSCA), bazal hücrelerde eksprese olur ve prostat kanserinde up-regüle edilirler. Yeni çalışmalarla, kök hücrelerin, geçici çoğalan hücrelerin (transient amplifying cells) oluşmasına sebep olduğu gösterilmiştir. Bu hücreler, hem bazal hemde salgı hücrelerini ve hatta nöroendokrin hücreler için bir çok ortak markerları eksprese etmektedir (şekil 2.2) (Konishi, 2005).

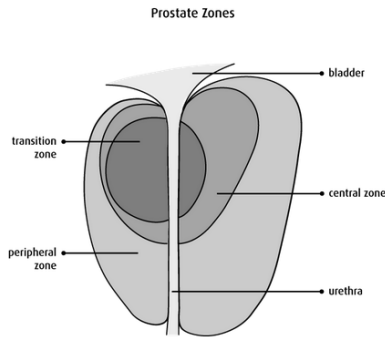


Şekil 2.2: Prostat kanserinin moleküler patojenizi. Kromozomal kayıplar ve telomer uzunluğunun kısalması prostat tümör oluşumuna katkı sağlar. Androjen reseptörü (AR) gen mutasyonları ve amplifikasyonları, androjen-bağımsız prostat kanseri ile ilişkilendirilmiştir. NE cell, nöroendokrin hücreler (Konishi, 2005).

Erkek üreme yolunun gelişimi mezankimal-epitelyal etkileşimleri ve fetal androjenlere bağlıdır. Testesteron, ürogenital boşluktan prostat epitelinin uyarılmasından sorumludur. Epitel-mezankimal etkileşimin temeli doku rekombinasyon çalışmaları ile tanımlanmıştır ve başlangıçta AR, prostat oluşumu için ürogenital epitelyumdan gerekli değil iken, ürogenital mezankimaldan AR bağımlı sinyal, gereklidir (Cunha et al., 1994, 2008). Ürogenital mezankima AR'nın yüksek seviyede ekspresyonunu sağlar. Mezankimaldeki parakrin büyüme

faktörleri prostatın gelişiminde, glandular morfolojisi ve epitelyal hücre büyümesinden sorumludur. Kesenin olgunlaşması boyunca AR, salgı hücre hattında ortaya çıkar. Gelişmiş prostatta androjenler stromal ve salgı hücre hattı üzerinde rol alırlar.

Normal yetişkin prostatı fibromusküler stroma ve bunlarla iç içe geçmiş glandular epitelyal hücrelerden oluşmaktadır. Bu iki bölge, dengelenmiş proliferasyon ve hücre ölümü seviyesini korur. 1980’de McNeal prostatta neoplastik sürecin lokasyonunu tanımlamak için bölgesel anatomi konseptini geliştirmiştir. Buna göre normal prostat içinde gelişimsel olarak farklı dört önemli zon bulunmaktadır (şekil 2.3). Bu konsepte göre, bezenin glandular bölgesinin büyük bölümü periferik zon’dan, küçük bölümü de merkez zon’dan oluşmaktadır. Bu iki bölge bezenin %95 ‘ni oluşturur. Geriye kalan bölgeler transizyonel zon ve fibromusküler stroma’dan oluşur. Prostat kanserlerinin % 60-70 ‘i periferik zon, %10-20’si transizyon zonda oluşur. Kanserinin %5-10 merkezi zondan köken alır. Benin Prostat Hiperplazi (BPH) daha çok peri-üretral stroma ve transizyon zondan gelişir (Schulz et al., 2003).



Şekil 2.3: Prostatın bölgesel anatomisi; prostatın üç glandular zonu ve anterior fibromusküler stroma (Canadian cancer society, 2015)

2.1.3. Prostat Kanserinin Tarihi

Bir çok prostat kanseri periferik bölgede başlar. Tarihsel olarak ilk saptama, epitelyal tabakanın kalınlaşması ve bazal ve salgı tabakanın arasındaki mesafenin

kaybolması ile karakterize olan prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN)'dır. Bu bazal tabakanın kaybolması olarak yorumlanır ama prostat karsinoma hücreleri aslında spesifik salgı hücreleri (örneğin, AR) gibi bazal hücrelerin hepsini belirteç olarak taşır. Yüksek seviyeli PIN lezyonları, karsinomun öncülü olarak kabul edilir. Prostat karsinomu çok odaklı olarak kabul edilir. Çünkü birincil tümörler sıklıkla genetik olarak farklı, bir çok bağımsız odaklar içerir. Bu çok odaklılık, kanserli dokunun, herhangi bir bölgesindeki neoplastik lezyonların, genetik olarak farklı özellikler taşıması ile tanımlanır. Aslında, eş zamanlarda fakat bağımsız olarak ortaya çıkıp gelişirler. Dahası, bitişik karsinomalar heterojenite (genetik kararsızlık) yaratırlar. Yani, BPH, PIN ve adenokarsinom odaklarının birbirlerine yakın konumlarda olabileceğidir. Proses boyunca, prostat karsinomu androjen reseptörünü eksprese eder ve androjen deprivasyonu tümör yığınını azaltır, ki bu durum muhtemelen büyümenin durdurulması ve apoptozun indüklenmesi ile ilişkilidir. Ama, karsinomada kaçınılmaz olarak hücreler gelişir, yani bu hücreler hormon depleksyonu boyunca büyümeye devam eder (Abate-Shen and Shen, 2010; Schulz et al., 2003).

2.1.4 Prostatta Patolojik Lezyonlar

2.1.4.1. Benin Prostat Hiperplazi (BPH)

Benin prostat hiperplazisi (BPH), DNA sentezi artması sonucu, prostat hücre sayısının çoğalmasıyla belirlidir. Elli yaş üzerinde görülmekte ve sıklığı yaş ile birlikte artmaktadır. BPH 'de prostat dokusu üretraya baskı yapar ve ürine geçişte problemlere sebep olur (American cancer society, 2015).

Prostatta hücre büyümesi, hücre ölümü ile hücre proliferasyonu arasındaki dengeye bağlıdır. Bu dengenin bozulması durumunda, benin prostat hiperplazisi olarak adlandırılan lezyon oluşur ve hücrelerin aşırı çoğalmasına neden olur (Polat, 1997).

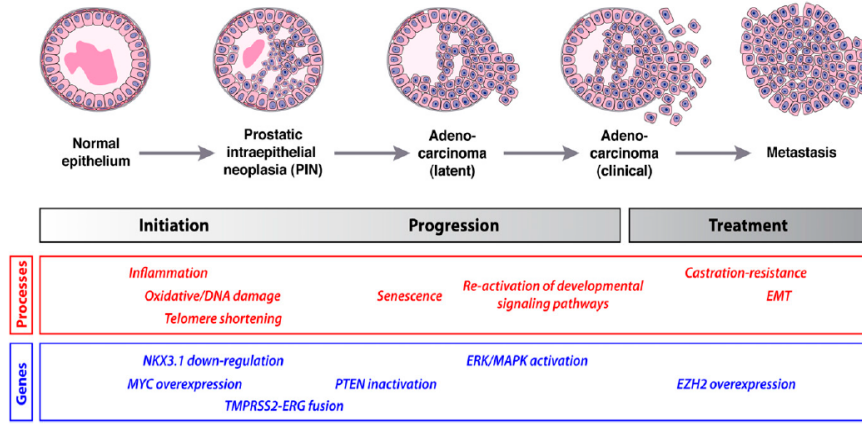
2.1.4.2. Proliferatif İnflamatuvar Atrofi (PIA)

Prostat dokusundaki enflamasyon genellikle atrofik epitelyum ya da fokal epitelyal atrofiyle beraberdir. Epitelyal atrofi, düşük apoptotik indeks, yüksek proliferatif indeks ve enflamatuvar infiltrasyonla karakterize olan bu lezyonlar proliferatif inflamatuvar atrofi (PIA) olarak adlandırılmaktadır. PIA'nin genellikle oksidatif stres, hipoksi, otoimmünite veya enfeksiyon gibi travmalara bağlı hücresel hasarı onarmak için ortaya çıktığı düşünülmektedir. Morfolojik çalışmalar PIA'nin sıklıkla yüksek dereceli PIN'ye komşu alanlarda gözlendiğini ve prostat kanseri için prekürsor lezyon olabileceğini göstermektedir (Ergun ve Koşar, 2010).

2.1.4.3. Prostatik İntraepitelyal Neoplazi (PIN)

PIN, prostat kanseri öncülü olarak kabul edilmiştir. Çünkü, prostatik adenokarsinomanın sitolojik ve yapısal özelliklerinin bir çoğuna sahiptir. PIN, histolojik olarak lüminal epitelyal hiperplazinin oluşumu, çekirdek ve çekirdekçiğin genişlemesi ve atipik adenomatöz hiperplazi ile karakterizedir. Ayrıca, yüksek seviyeli PIN lezyonları genellikle hücresel proliferasyonu seviyesini belirgin olarak sergiler, çok odaklı kanserleşme şeklinde görülür (şekil 2.4).

PIN, benin prostat hiperplazide %20-72 arasında saptanmıştır ve görülme yaşının karsinomlardan daha erken olduğu bildirilmiştir. Prostat kanserinin aksine, PIN' de bazal hücreler azaldığı, tamamen yok olmadığı ve sıklıkla invaziv karsinoma ile yakın komşuluk gösterdiği bilinmektedir (Abate-Shen and Shen, 2010).



Şekil 2.4: İnsan prostat kanseri gelişim yolağı. Gelişim evreleri moleküler süreci ve her bir evrede önemli olan genleri göstermektedir (Abate-Shen and Shen, 2010).

2.1.5. Prostat Kanserin Moleküler Patogenezi

Sitogenik (floresan in situ hibridizasyon (FISH)) ve karşılaştırmalı genomik çalışmalar (CGH), prostat kanserinin bir bölümünde kromozomal anomalileri açığa çıkarmıştır. Bu kromozom anomali bölgelerinin bir çoğu tümör gelişimi ve ilerleyişini içeren önemli bir çok geni korumaktadır. Prostat kanserinde, kromozomal kazanç yerine kromozomal kayıplar yaygındır. 6q, 7q, 8p, 10q, 13q, 16q, 17, ve 18q kromozom kayıpları en yaygın olanlarıdır. Kromozom 8q, 10q, 13q ve 17q heterozigotluğun kaybı, 6q, 7q, 16q ve 18q bölgelerinin delesyonları görülür. Tümör baskılayıcı genlerin sebep olduğu; mutasyonlar, delesyonlar, yeniden düzenlemeler, hipermetilasyonlar gibi değişimler sıklıkla onkogenik sonuçlar ile ilişkilendirilirler. 6q bölgesinde yer alan prostat kanseri ile ilişki genlerdeki değişimler, prostat kanserinde %48'e kadar ortaya çıktığı gösterilmiştir. En az iki yaygın bölgenin delesyona uğradığı bulunmuştur (Konishi, 2005).

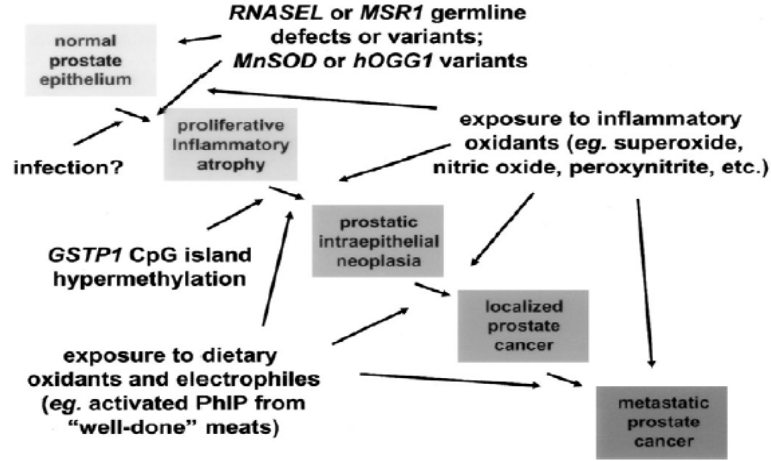
8p12-22 kromozom bölgesinin heterozigotluğunun (Loss of heterozygosity) kaybı, prostat kanserinde en yaygın kromozom bozukluklarından biridir. Bu bölgedeki kayıp, PIN lezyonlarının %63'de ve prostat karsinomunda erken invazivde görülür. Androjen ile regüle olan NKX3.1 homeobox geni, özellikle prostat salgı epitel hücrelerinde eksprese olur, bu bölge üzerinde yer alan tümör baskılayıcı gendir (Hallström, 2007). PTEN ile birlikte NKX3.1 ekspresyonunun

kaybı, prostat kanserinde yüksek sıklıkta bulunmuştur. NKX3.1 prostatik tümör oluşumu başlamasında rol aldığı kabul edilmiştir (Konishi, 2005)

PTEN, tümör baskılayıcı gendir. Normal prostat epitelinde ve PIN'de bulunur ancak prostat kanseri hücrelerinde özellikle geç evrede eksprese edilmez. PTEN, tek allel kaybı proliferasyon için yeterlidir. PTEN, birincil tümörlerin yaklaşık %10'da, metastatik prostat kanserinin %30'dan fazlasında görülür. PTEN kaybı, epigenetik gen susturma ya da mutasyonlardan meydana gelir. Bu gen fosfatidilinositol 3,4,5 (PIP-3) ve lipid fosfotazları kodlar. PTEN kaybı durumunda PIP3 birikir ve sonucunda AKT/PKB(protein kinaz B) yolağının aktivitesi azalır. PTEN'in tümör baskılayıcı aktivitesi, hücre döngüsü tutulması, apoptozis ve migrasyonun düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir (Hallstrom, 2007).

Glutasyon S-transferaz p sınıfı geni (GSTP1), prostat kanserinde en sık değişime uğramış gendir. Promotör bölgesinin hipermetilasyonu prostat kanserinin %95'inde ve PIN'ların %70'inde bulunur. GSTP1 oksidatif hasardan hücresel DNA'yı korur. GSTP1'in kaybı prostat tümörjenezin erken evresinde rol aldığı gösterilmiştir. GSTP1 hipermetilasyonu prostat kanseri teşhisinde marker olarak kullanılmaktadır.

17p13 üzerinde haritalanan P53, insan kanserlerinde en çok rastlanan tümör baskılayıcı gen mutasyonudur. P53 mutasyonları tümörün yeniden oluşması ve metastaz dahil hastalığın ilerlemiş evresinde oluşur (Konishi, 2005). P53 hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Genomda mutasyon oluşumunu önleyerek genom stabilitesini korur. DNA zarar gördüğünde DNA tamir proteinlerini harekete geçirir. DNA tamir edilemeyecek kadar zarar gördüyse apoptozu uyarır (Xu et al., 2014). Prostat kanseri teşhisinde agresif tümör davranışlarının belirteci eksik olmasına rağmen, prostat tümörlerinde lokalize p53 mutasyonları bağımsız prognostik marker olarak kullanılmaktadır (Hallstrom, 2007).

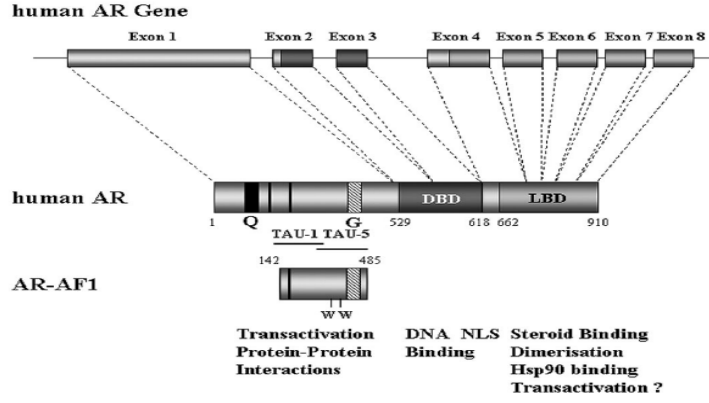


Şekil 2.5: Prostat kanseri patogenezi. Genetik, epidemiyolojik ve somatik genom değişikliklerin katkısı ile neoplastik transformasyon ve metastaik kansere ilerleyiş (Nelson et al., 2004)

2.2. Androjen Reseptörü (AR)

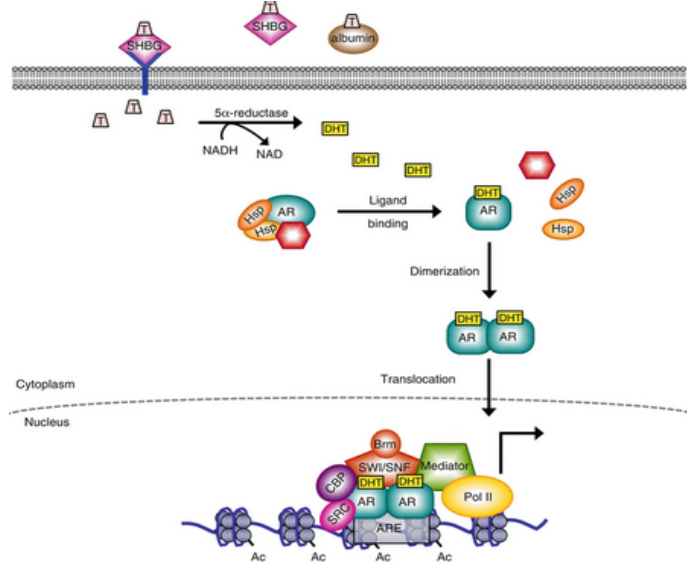
Prostat hücreleri büyüme, fonksiyon ve çoğalmayı teşvik etmek için androjenlere bağımlıdır (Poelaert et al., 2015). Androjenler prostat ve epididim gibi erkek üreme organlarının oluşumundan, gelişimine kadar gereklidir ve normal fizyolojik süreçteki rolü ile beraber, prostat kanserinin başlamasında, gelişmesinde ve büyümesinde rol alırlar. Androjenler, nükleer reseptör süper ailesine ait AR aracılığıyla fonksiyon gösterirler.

Testesteron ve dihidrotestesteron aktivasyonuna aracılık eden AR, transkripsiyon faktörü olarak fonksiyon gösteren fosfoproteindir (Grossmann et al., 2001). AR geni, x kromozomun uzun kolu (q11-12) üzerine lokalizedir ve 8 ekzon içerir (McEwan, 2004). AR, steroid reseptör gen ailesinin bir üyesidir ve 3 ana bölgeden oluşur. Bunlar N-terminal transkripsiyonel aktivasyon, DNA bağlama bölgesi ve C-terminal steroid bağlama bölgesidir (şekil 2.6). N-terminal transkripsiyon aktivasyon bölgesi ekzon 1'de bulunur ve transkripsiyon düzenlemeleri içerir. C-terminal steroid bağlama bölgesi, ligand bağlama ve reseptör dimerizasyonunu içeren sinyal iletiminden oluşur. Ligand bağlama bölgesi ekzon 4-8 tarafından kodlanır. Ekzon 2 ve 3 tarafından kodlanan merkezdeki 60-100 aminoasit DNA bağlama bölgesini temsil eder (Görgel vd., 2011).



Şekil 2.6: Androjen reseptörü(AR) gen organizasyonu ve proteinin domain yapısı. LBD, ligand-bağlanma bölgesi; DBD, DNA-bağlanma bölgesi; TAU, transaktivasyon unit (McEwan, 2004)

Testesteron hücreye girer girmez, genellikle 5- α redüktaz enzimi aracılığıyla dihidrotestesterona dönüşür. AR testesteron ve dihidrotestesteronun ikisinede bağlanabiliyor olmasına rağmen dihidrotestesteronun AR'a affinitesi testesteronunkinden 10 kat daha fazladır. Liganda bağlanmadan önce AR inaktif durumdadır. Yani AR, diğer nükleer reseptörler gibi DNA'ya bağlanmaya uygun olmayan bir konformasyonda, ısı şok proteinlerinden birine (Heat shock protein HSP90, HSP70, HSP56) bağlı durumdadır. AR dihidrotestesterona bağlanır bağlanmaz, sitoplazmadaki ısı şok proteinlerinden ayrılır, ve AR konformasyonel değişim gösterir. Sitoplazmadan çekirdeğe transloke olur ve burada ARE (palindromic androgen response element) dizilerine bağlanır. AR homodimer kompleksinin DNA'ya bağlanması sonucunda, koaktivatör proteinler (AR-ilişkili 160 kDa protein, ARA70, ARA55, ARA54), AR homodimerleriyle birlikte bir araya toplanarak kompleks oluştururlar (şekil 2.7) (Grossmann et al., 2001).



Şekil 2.7: Androjen reseptörü aktivasyon yolu.

Sonuçta AR, transkripsiyonel düzenleme, kromatinlerin yeniden düzenlenmesi, hedef genlerin aktivasyonu, prostat hücrelerinin hayatta kalması ve proliferasyonu gibi biyolojik yanıtların oluşturulmasında önemli roller üstlenir (Tan et al., 2011).

2.2.1. Androjenle Regüle Olan Genler

Androjenlerin, çok uzun bir süre erkek üreme dokularında önemi ve fonksiyonu bilinmemektedir. DNA mikroarray ve proteomik analiz çalışmaları doğrultusunda, androjenlerin, protein katlanmasında, trafik ve sekresyonunda, metabolizmasında, hücre döğüsü düzenlemesinde ve sinyal iletiminde görev alan proteinler için gen kodlamasına neden olduğu gösterilmiştir. Prostat spesifik antijen (PSA), probazin, kerotinosit büyüme faktörü ve antiapoptotik faktör p21 gibi genler androjenler ile indüklenmektedir. Bu genlerin en önemli özelliği, doku spesifik transkripsiyon faktörleri, indükleyici (NF- κ B, Ets ve AP-1) ve housekeeping (Sp1, CCAAT ve NF-1) için bağlanma bölgeleri ile birlikte bir ya da daha fazla AR bağlayıcı sekanslara (ARE, ARR ya da HRE) sahip olmalarıdır. Bu yüzden, androjenle düzenlenen genlerin ifadesi transkripsiyon faktörlerinin ve protein-protein etkileşimlerinin oluşturulmasını/düzenlenmesini içerirler (McEwan, 2004).

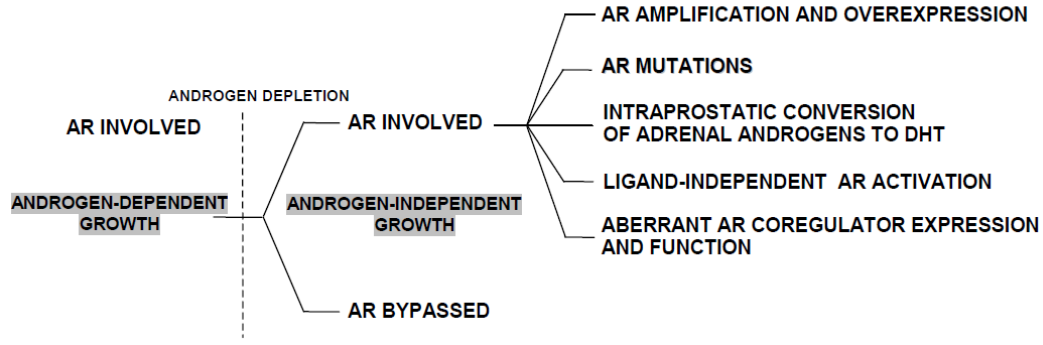
2.2.2. Prostat Kanserinde Androjen Reseptörü

AR prostat gelişimi ve fizyolojisinde en önemli düzenleyicilerden biridir. Androjen reseptör aracılıklı sinyal yolağı, normal prostat epitelinin farklılaşması ve gelişmesine yön verir. AR yolağının öneminden dolayı, bu yolağın sinyalindeki değişimler PCa gelişimine/ilerleyişine potansiyel olarak katkı sağlar (Poelaert et al., 2015).

Prostatta ki lüminal epitel hücreleri, sitokeratin 8 ve 18, AR, PAP, PSA eksprese eder ve prostat kanserinde ağırlıklı olarak, en çok AR'ın ifadesinin gerçekleştiği lüminal fenotipe sahiptir.

Prostatın normal gelişimi ve sürdürülmesi gibi, prostat tümör büyümesi androjenlerin sürekli uyarımına bağlıdır. Androjen bağımlılığından dolayı, genellikle prostat kanseri terapisi, anti-androjenler ile AR aktivasyonunun bloke edilmesine dayanır. İlk regresyondan sonra, temelde tüm prostat tümörleri büyümeye devam eder ve androjen bağımsız hale gelirler. Yani artık androjen uyarımı olmaksızın, tümör büyümeye devam eder. AR ekspresyonunun kaybı bazı tümör hücrelerinde bulunmasına rağmen, çeşitli klinik çalışmalar androjen bağımsız prostat kanserleri, AR ekspresyonunu devam ettirdiğini göstermiştir. Androjen-ablasyon prostat kanserinde, AR hala nukleusda lokalizedir ve androjenle düzenlenen genleri eksprese eder. Yani, aslında AR hala androjen bağımsız prostat kanserinde önemli rol oynar, dahası bu durum androjen bağımsız prostat hücre hatlarında, AR'ın baskılanması (azalan PSA ekspresyonu, hücre çoğalması ve canlılığı) ile doğrulanmıştır.

Prostat kanseri araştırmalarında önemli ve zor olan sorular; prostat tümörlerinin gelişiminin nasıl olduğu, prostat kanserinin androjen-bağımlıdan androjen-bağımsız'a nasıl geçtiği ve bu proseslerde AR'ın nasıl bir rol oynadığıdır (şekil 2.8) (Steketee, 2007).



Şekil 2.8: Prostat tümör büyümesinde Androjen reseptörünün rolünün şematik taslağı. İlk G.Jenster tarafından önerilmiştir.

2.2.3. Androjen-Bağımlı Prostat Kanseri

AR'ın, prostat kanseri gelişimi ve ilerleyişi için anahtar göreve sahip olduğu tanımlanmıştır. Prostat tümör büyümesinin erken evresi androjen bağımlıdır çünkü bu mekanizmanın temeli, AR fonksiyonunu içerir. Metastatik PCa için birincil tedavi, androjen deprivasyon terapisi (ADT). Orşiektomi (testisin cerrahi yolla çıkarılması), androjen deprivasyonunda en efektif yol olmasına rağmen, farmakolojik yöntemler de vardır. Totalde androjen deprivasyonu, flutamid, bicalutamid gibi androjen antagonisti farmasötik ajanlar ile inhibe edilmesidir.

AR amplifikasyonu ya da AR'ın somatik mutasyonlarını içeren bir çok faktör prostat kanseri gelişimine katkı sağlar. AR'ın overekpresyonu ile beraber AR amplifikasyonu en sonunda androjen bağımsız prostat kanseri gelişimi ile sonuçlanır. PCa çoğu, androjen deprivasyon tedavisinde dirençli hale gelir ve artık tümör hücrelerinin proliferasyon yollarının kontrolü ve aktivasyonu için androjene bağımlılığı ortadan kalkar. Prostat kanseri, androjen bağımsız evreye geçmiş olur. Bu evrede tümör hücrelerin proliferasyonu androjen uyarımından bağımsızdır ve kastrasyon-dirençli prostat kanseri olarak adlandırılır (Cohen and Rohklin, 2009; Shiota et al., 2012).

2.2.4. Kastrasyon-Dirençli Prostat Kanseri

Androjen deprivasyonunu takiben, prostat dokularında androjen bağımlılığı hızlı şekilde hücresel apoptoz ve gerileme evresinde de involüsyon gösterir. Hücre kültüründe androjenler kaldırıldığında, androjen bağımlı prostat hücre hatlarının çoğalması durur, fakat apoptoza gitmezler. Bunun tam zıttı olarak doku deneylerinde, aynı hücreler androjen deprivasyonunda apoptoza giderler. Çünkü burada, stromal hücreler tarafından apoptotik cevap indüklenir. Böylece, in vivo prostat epitelyumun androjen bağımlılığı, stromal AR'ın parakrin aktivitesine ihtiyaç duyar. Prostat kanserinde, AR bazal hücrelerin çoğalmasını baskılar, lüminal hücrelerin canlılığını destekler ve metastazı uyarır. Genel olarak AR, normal ve prostat kanser hücrelerinde farklı hücre tiplerinde spesifik role sahiptir (şekil 2.9) (Abate-Shen and Shen, 2010)

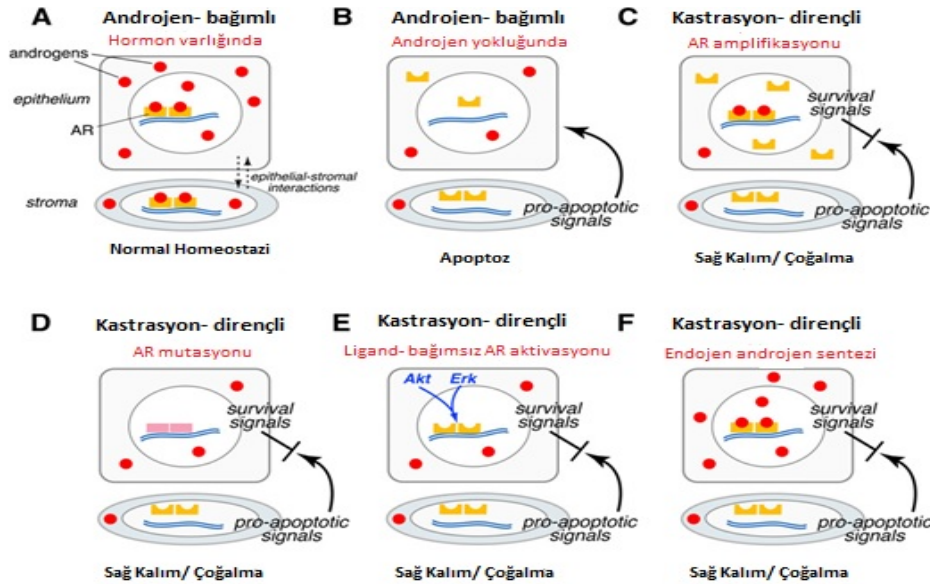
Bir çok çalışma, birincil prostat kanserinde sadece birkaç AR mutasyonu bulunmuş olmasına rağmen, metastatik prostat kanseri daha yüksek oranda AR mutasyonu içerir. Yapılan çalışmalar ile bu hipotez desteklenmiştir. Şöyleki, androjen ablasyon terapisi, androjen sinyal yolağını hedeflemek için seçici baskı sağlar. Örneğin, antiandrojen flutamid ile terapi, AR mutantları için seçici olabilir. Çünkü flutamid, antagonistten ziyade agonist olarak fonksiyon gösterir. Hatta transgenik adenokarsinoma fare prostat modelinde (TRAMP), AR mutasyonları sıklıkla gelişir ve mutasyonun farklı tipleri kastrasyonlu farelerde de bulunmuştur. İşte bu yüzden mutasyon gelişiminin zamanı belirsizdir. Mutasyonların bir çok türü kastrasyon dirençli prostat kanserine sebep olur.

Prostat kanserinin ikinci evresi olarak kabul edilen kastrasyon-dirençli prostat tümör büyümesinde, bir çok mekanizma önerilmiştir. Çünkü AR hala tümör büyümesini uyarmaktadır. Prostat tümörlerinin androjene dirençli hale geldiği 5 mekanizma;

İlk olarak, AR hormon-bağlanma bölge ya da AR geninin amplifikasyonundaki mutasyonlar ile düşük doz androjenlere duyarlılık artar ve sinyal yolağı etkinleşir. İkinci olarak, Androjen reseptörünün ligand bağlanma bölgesindeki mutasyonlar steroid ya da antiandrojenlere cevap verir. Üçüncü

olarak, peptid büyüme faktörü yada sitokinleri içeren düzenleyici yollardaki genlerin fonksiyonunda yada ekspresyonundaki değişimler, AR'ın uygun olmayan aktivasyonuna neden olur. Dördüncü olarak, AR ve AR'ın bazı ko-aktivatörleri etkileşimlerdeki değişimler, androjenleri, steroidleri yada antiandrojenleri aktive etmek için AR'ın mutasyonuna izin verir. Yani, kastrasyon direnci artan inflamatuvar cevap ile sağlanabilir. Örneğin, infiltratif makrofajlar tarafından interlökin-1 β üretimi, prostat tümör hücrelerinde AR ko-baskılayıcı kompleksin serbest kalmasına neden olabilir. Yani, AR antagonistleri agonistlere çevrilmektedir. Beşinci olarak, bypass yolağı olarak adlandırılır. Prostat hücrelerinde AR'ın varlığında proliferasyonun arttığı, yokluğunda apoptozisin gerçekleştiği sürekli çalışılan ve tartışılan bir konudur. İşte bu noktada genlerin p53 mutasyonu, PTEN inaktivasyonu, BCL2 aktivasyonu gibi hücrede proliferasyon ve apoptozis dengesini sağlayan genlerin androjen resptörü bağıllığının ortadan kalkmasıdır.

Tüm bu mekanizmaların AR sinyal yolağının aktivasyonunu değiştirmesi sonucu androjen ablasyon terapisi başarılı olamamaktadır (Abate-Shen and Shen, 2010; Feldman and Feldman, 2001; Grossmann et al., 2001; Steketee, 2007).



Şekil 2.9: Androjen-bağımlı ve kastrasyon-dirençli prostat kanserinde AR'ın rolü (Abate-Shen and Shen, 2010).

2.3. İnflamasyon

İnflamasyon, hasarlı dokunun tedavisini sağlamak için hasar sonrasında koordine kimyal sinyalleri ve ilişkili fizyolojik süreçlerin başlatılmasını içerir. İnflamatuvar hücreler epitel hücre çoğalması ve anjiyogenezi uyarmak için sitokinleri salgılar. Erken cevaplar, hasarlı bölgeye lökositlerin (nötrofil, monosit, eozinofil) göç etmesini yönlendirir, ki bu yerde yeni ekstraselüler matris oluşumu için zemin sağlanır, ki bu zemin damar geçirgenliğinde artış ve etkinleştirmeyi içerir. Bu göçün yönü, salgılanmış kemokinler tarafından gerçekleşir. Ekstraselüler matris, hücrelerin (fibroblast ve endotelial hücreleri) göç etmesini, çoğalmasını ve yeni doku oluşumunu bu yapı üzerinden sağlar. İnflamasyon cevabın sonra ki evresinde, makrofajlar baskın hücre tipidir ve tedavi sürecini yönlendirir. Normalde inflmasyon, pro-inflamatuvar sitokinlerin etkilerini koruyan anti-inflamatuvar sitokin ürünlerinden dolayı kendini kısıtlayan bir prosedir. İnflamatuvar bölgede ki sitokinler/kemokinler, kronik hastalıkların gelişiminde önemlidirler. İlişkilendirilmiş faktörlerden herhangi birinin deregülasyonu (düzenlenmenin azaltılması), sitotoksik araçlara kronik etki ile inflamasyona neden olur. Prostatik inflamasyon kaynakları; bakteri, viral ve parazitik enfeksiyon, kimyasal ajanlar ve sindirimi kolay olmayan parçacıklar kronik inflamasyona sebep olur, fakat sıklıkla bu sebeplerin temeli bilinmemektedir.

Yaralanma yada enfeksiyondan herhangi birinin neden olduğu inflamasyonda, fagositik hücreler (örneğin; nötrofil, makrofaj) reaktif oksijen ve nitrojen maddeler üretirler, ama ayrıca bu hücreler doku yenilenmesinde önemli araçlar olan; anjiyogenik faktörler, proteazlar, sitokinler ve büyüme faktörlerin salgılanmasını ve sentezlenmesini sağlarlar, fakat aynı zamanda da potansiyel neoplastik tümörjendirler. Enfeksiyon ajanlara maruziyet, prostat epiteline doğrudan zarar veren olarak kabul edilmiştir ve proliferatif inflamatuvar atrofi (PIA) olarak bilinen lezyon ile sonuçlanmıştır. Prostoglandinler, sitokinler, nükleer faktör NFkB, kemokinler ve anjiyogenik faktörler gibi inflamasyon araçlarının ortak aktivitesi sonucu hücre proliferasyonu, hücre ölümü, hücresel yaşlanma, DNA mutasyon oranları ve DNA metilasyonunda genetik değişikliklere sebep olan inflmasyona bağlı önemli anahtar moleküllerdir. Dünya genelinde

tümörlerin %15'inden fazlası enfeksiyon ajanlara dayandırılabilir ve inflamasyon bu kronik enfeksiyonların major bileşenleridir (Crosh et al., 2013).

2.3.1. İnflamasyon Ve Prostat Kanseri

İnflamasyon ilişkili kanser mekanizmalarının temeli karışıktır ve doğal ve adaptif immün sistemi içerir. Bioyoaktif besin bileşenleri potansiyel prostat kemopreventif ajanlar olarak gitgide artan oranda değerlendirilmektedir. Bu ajanlardan biri resveratroidir, fitokimyasaldir bileşendir ve insan prostat kanserinde kemopreventif olarak dikkate alınır.

Kronik prostatik inflamasyon ve prostat kanseri arasındaki ilişki artmaktadır. Proliferatif inflamatuvar atrofi (PIA) lezyonları, kronik inflamasyon ve prostat ile ilişkilendirilmiştir ve histolojik geçişler PIA ve yüksek dereceli prostat intraepitel neoplazi (HGPIN) bölgeleri arasında rapor edilmiştir. Bu lezyonlar yaşlı erkeklerde yaygındır ve prostat kanseri ve PIN öncülü olarak kabul edilmektedir.

İnflamasyon prostat etiyolojisi için yaşamsaldır ve PCa patojenizi, kalıtsal ve çevresel bileşenlerin her ikisinde yansıtır. Epidemiyolojik, patolojik ve moleküler çalışmalar, kronik inflamasyonun prostat karsinogenez ile ilişkisini göstermiştir.

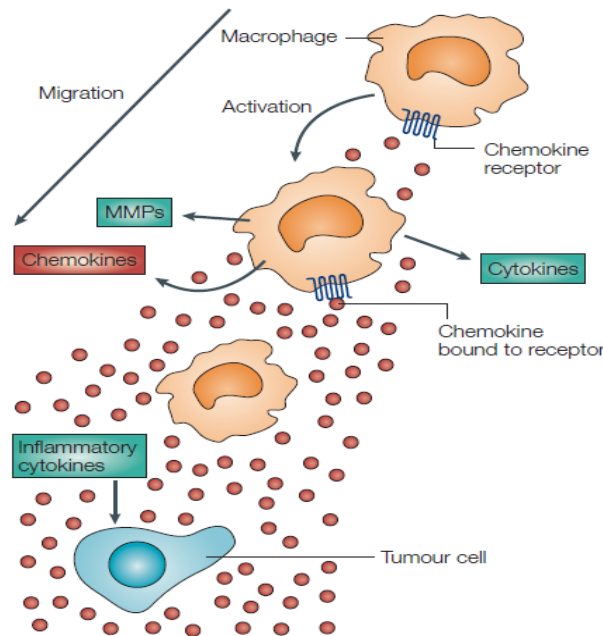
İnflamasyon ve prostat kanseri arasındaki bir çok kanıt, prostat kanseri insidansını azaltması ile ilişkili steroid olmayan anti inflamatuvar ajanların (NSAIDs) günlük kullanımını rapor edilmesiyle açığa çıkarılmıştır. İnflamasyon aracılıklı mekanizmalar, tümör gelişiminde ve ilerleyişinde rol alabilirler, fakat bu proses oldukça karışıktır.

Kronik İnflamasyon; hücre ve genom hasarı, yeni hücrelerin oluşumuna teşvik ve doku mikroçevresini (hücre replikasyonunu, anjiyojenezi ve doku tamirini uyaran bir ortam) oluşturarak karsinogenez teşvik eden bir mekanizma olarak düşünülebilir (Crosh et al., 2013).

2.3.1.1. Sitokinler

Doğal ve adaptif immünette rol alan ve hücrelerin immün fonksiyonlarını sağlayan proteinlerdir. Sitokinler kökenlerine göre, mononükleer fagositler, lenfositler ve lökositler olarak ayrılırlar ve genel anlamda biyolojik yanıtı değiştirirler. Sitokinler antijen ile uyarılmış lenfositlerin farklılaşmasını ve çoğalmasını uyarırlar ve makrofajlar gibi özel efektör hücreleri aktive ederler (şekil 2.10).

Sitokinler, aktive ettikleri sinyal iletim yollarına göre farklı şekilde sınıflandırılabilir, ancak pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar olarak 2'ye ayrılırlar. Anti-inflamatuar sitokin $\text{TNF}\alpha$ gram (-) bakterilere ve diğer infeksiyöz mikroplara karşı gelişen akut inflammatuar yanıtın ana mediyatörüdür. $\text{TNF}\alpha$ 'nın biyolojik etkileri; düşük konsantrasyonda TNF, lökositler ve endotelde akut inflamasyonu indükler. Orta konsantrasyonda TNF, inflamasyonun sistemik etkilerini düzenler. Yüksek konsantrasyonda TNF, septik şokun patolojik anormalliklerine neden olur.



Şekil 2.10: Kanserde kemokin akış diyagramı (Balkwill, 2004).

2.3.1.2. ROS ve Kronik İnflamasyon

ROS, kronik inflamasyon boyunca aşırı miktarda üretilmektedir ve kronik inflamasyon ve kanser başlangıcı arasında önemli bir bağlantı olarak bilinmektedir. Oksidatif stres kronik inflamasyonun başlamasına ve ilerlemesine katkı sağlar. Bunu hücre proliferasyonunu, adhezyon molekül ekspresyonu, sitokin ve kemokin üretimi teşvik ederek yapar. Doğrudan hasarlı dokuda, ROS pro-inflamatuar sitokinlere, büyüme faktörlerine, kimyasallara maruziyet ve diğer stres etkenlerine cevap olarak üretilirler. Oksidatif sinyaller çeşitli sitokin ve kemokinlerin (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8) ifadesini düzenleyebilirler. İnflamatuar mikroçevre durumlarında, inflammatuar hücrelerin toplanması ve ardından ROS üretiminin uyarımı uzun süre devam ettiğinde DNA hasarına ve mutasyon oranının artmasına sebep olur. Bu durum kanser ilişkili genlerde onkojenik dönüşüme teşvik edebilir ve DNA hasarı, apoptozis ve hücre döngüsünü düzenleyen esansiyel hücresel proteinlerin genetik değişimleri ile sonuçlanabilir (Ma, 2010).

2.3.1.3. İnflamasyon Varlığında AR

İnflamatuar sitokinlerin salgılanması ve NF- κ B ekspresyonu ROS ile ilişkilendirilmiş etkiler inflamasyon aracılıklı kanserine katkı sağladığı gösterilmiştir. Birçok sitokin ve büyüme faktörleri bölgesel olarak NADPH oksidazların aktivasyonu aracılığıyla reaktif oksijen türlerini üretir. ROS, çoklu sinyal iletimi yollarında, Tnf α yolağı gibi, önemli role sahiptir ve kronik inflamasyon boyunca fazla miktarda üretilirler.

Androjenlerin varlığında, AR aracılıklı transkripsiyon prostat savunma faktörlerini ve oksidatif stres düzenleyicilerini düzenler. AR'ın kaybı, hücre canlılığına iki şekilde katkı sağlar. İlk olarak, AR kaybı artan kiaz aktivitesi ile sonuçlanır ve CaMKII genlerin ekspresyonu artar, sonuçta anti-apoptotik PI3/Akt yolağı aktive olur ve androjen bağımsız hücre büyümesine sebep olur. İkinci olarak, prostat hücreleri genotoksik ajanlara mazruz kaldığında, hücreler AR varlığında p53 aracılığıyla apoptozise tetiklenirler (Debeleç-Bütüner et al., 2012).

Prostat yapısının korunması için, androjen hormonları aracılığıyla androjen reseptörü sinyalinin sürekliliği gerekmektedir, prostat gerilemesi hariç. Agresif prostat kanseri, androjen sentezin blokajı ve AR aktivasyonun inhibisyonuna neden olacak ajanlar ile tedavi edilme durumudur. Buna rağmen, androjen-bağımlı terapiden sonra gerileme başlar ve kaçınılmaz son olarak kastrasyon dirençli olarak adlandırılan androjen bağımsız evreye geçiş olur. Tedaviyi anlamadaki ilerleme, prostat kanserli hücreler AR yolağına bağımlı hale geliyorlar ve AR ekspresyonunun up-regulasyonu, kastrasyon dirençli prostat kanserinde ana belirleyicidir. Birçok mekanizma, kastrasyon dirençli prostat kanserinde AR fonksiyonunun değişiminde rol alır, örneğin lokal sitokin üretimi ve immün hücre filtrasyonun sonucu olarak hücre sinyalinin değişmesi gibi. Buna rağmen, kronik inflamasyonun kastrasyon dirençli prostat kanserini indüklemesindeki rolü tam olarak bilinmemektedir.

Kronik inflamasyon AR sinyalizasyonunu değiştirmektedir. Bir çok tümör, solid tümör yığınının %50'ye kadar katkı sağlayan makrofaj filtrasyonu ile salgılanan sitokinlerin çevresinde var olurlar. Bu makrofajlar aralarında interlekin 1 β (IL-1 β) ve Tnf α içeren sitokinleri salgılar. Bu inflamasyon hücreleri NF- κ B yolağını aktive eder ve sitokin salgılamak için çevresindeki epitel hücreleri indüklerler. Prostat kanserinde, proliferatif atrofik lezyonlarda inflamatuvar markerlar artar. Bunun sebebi, inflamasyon prostat kanseri gelişiminde erken evrede rol alır. Prostat kanserinin inflamasyon kaynakları karışıktır bunlar, infeksiyöz ajanlar, ürin reflü, kimyasal ve fiziksel travma ve diyetdir. İnflamatuvar markerlar, IL-1R1, IL-1 α , IL-6, CXCL16 ve MIC-1 'dir. Prostat kanseri örnekleri ile normal prostat karşılaştırıldığında artmış olduğu gözlemlenmiştir.

Başta androjen blokajı deneyleri, bir çok sitokinlerin çevresindeki kanser dokulara salınmış olan yerde, androjen-bağımlı kanser hücre ölümüne neden olur, kitlesel inflamasyon filtreleme ile sonuçlanır. İnflamasyon ilişkili prostat kanseri, kastrasyon dirençli prostat kanseri gelişimi için ana sebeptir. Bu yüzden, prostat kanseri gelişiminde ve kısmende kastrasyon dirençli prostat kanserinde önemli role sahiptir (Staverosky et al., 2013).

Prostat kanseri büyümesinin uyarımı ve metastatik potansiyel kazanmasının ardında, prostat kanserinin proinflatuar sitokin IL-6 desteği, AR'ın düzenlemelerini içerir. Daha önce çalışılıp tanımlanmış olan IL-6, parakrin büyüme inhibitöründen otokrin büyüme uyarımına fonksiyonel geçişe prostat kanseri ilerleyişinde maruz kalır. Kastrasyon dirençli prostat kanserinde hücre değişimleri AR amplifikasyonunu, AR mutasyonunu, AR ko-düzenleyici proteinlerinin bozukluğu ve büyüme faktörlerini içerir.

Proinflatuar IL-6, AR aktivitesini AR'ın ligan-bağımsız aktivitesi boyunca ve artan AR'ın gen ekspresyonu aracılığıyla artırır. Yapılan çalışmalar doğrultusunda da, proinflatuar sitokinlerin hormon-bağımlıdan hormon-bağımsız prostat kanseri geçişinde önemli rol alır. Bunuda, düşük seviyede androjen ve aynı zamanda PSA gen ekspresyonu eşliğinde, hormon-bağımlı prostat kanseri hücrelerini büyümeyi teşvik ederek gerçekleştirir (Nguyen et al., 2013).

2.4. ROS, Oksidatif Stres Ve DNA Hasarı

2.4.1. ROS Üretimi Ve Prostat Kanseri

Serbest radikaller, besinlerin oksijen kullanılarak enerjiye dönüşümü sırasında meydana gelen reaktif moleküllerdir. Oksijen molekülleri yaşam için vazgeçilmez olmakla birlikte, metabolizma sırasında serbest radikal kaynağı olarak bilinen ve son derece reaktif olan ara ürünler oluşur. Reaktif oksijen türleri/metabolitleri olarak bilinen bu moleküller lipid, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verir (Ma, 2010).

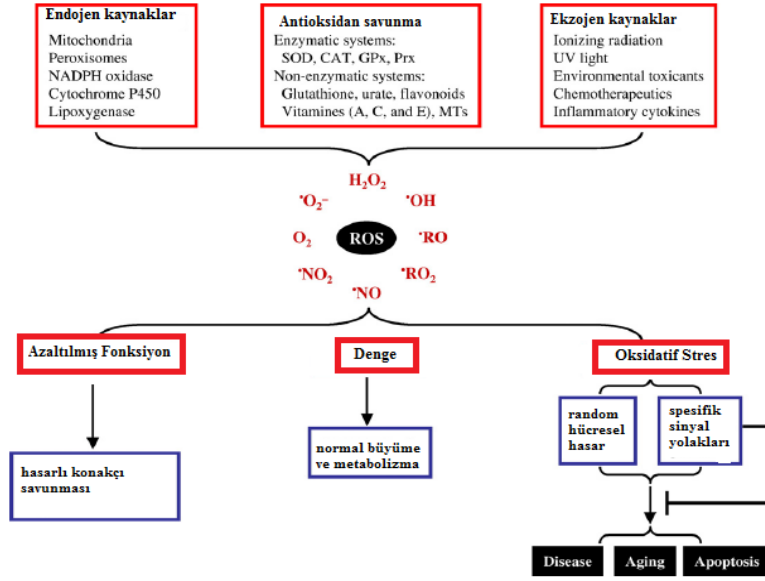
Aerobik (oksijen soluyan) organizmalarda serbest radikal oluşumunu kontrol altında tutmak ve bu moleküllerin zararlı etkilerine engel olmak üzere antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Ancak bazı durumlarda mevcut antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemez ve oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkar (Ma, 2010).

ROS endojenik proses olarak üretilir ya da ekzojenik ajanlar tarafından indüklenir. Bazı sınırlar ile birlikte ROS üretimi, dengenin sürdürülmesi için gereklidir. İşte bu açıdan, fagositik hücrelerde ROS-üreten NADPH-oksidazlar, mikrop istilasına karşı konukçu savunmasında kritiktir. Ayrıca ROS, bazı sinyal yollarının aktivasyonunu tetiklemek için spesifik sinyal moleküller olarak fonksiyon gösterir. Bu yollardan bazılarında, hücresel fonksiyon üzerinde ROS'ın etkisini aktarır, örneğin; oksidatif stresin düşük seviyesindeki proliferatif cevapların düzenlenmesi gibi, oysaki diğer yollarda da ROS'ın detoksifikasyonu için hücresel stratejileri sunar ve sonuçta, ROS'ın yüksek seviyesine maruz kalarak yaşayan organizmanın hayatı için esansiyeldir (şekil 2.11).

ROS'ın kökenine bakmaksızın, artan ROS üretimi yada oksidatif stres 2 sonuca sahiptir: spesifik sinyal iletim yollarının aktivasyonu ve hücresel bileşenlerde hasar. Bu iki sonuçta, hastalıkların gelişimi ve fizyolojisi üzerinde önemli etkiye sahiptir (Ma, 2010).

Kanser hücrelerinde redoks dengebisliği, oksidan ve antioksidan arasındaki denge değişimleri, sonuç olarak hücre iğerisindeki oksidanları arttırır. ROS kaynaklı oksidatif stres yaşlanma, dejeneratif hastalıklar ve kanser gibi bir çok sürece katkı sağladığı düşünölmektedir (Acharya et al., 2010).

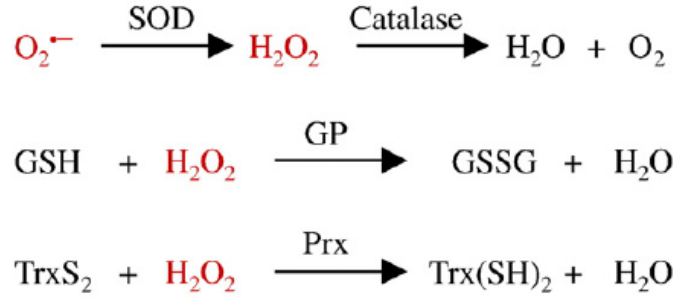
Son yıllarda prostat kanserinde, ROS spesifik sinyal yolları örneğin, düzenleyiciler, hücresel çoğalma, anjiyogenez ve metastaz ile karsinogeneze katkı sağladığı gösterilmiştir. ROS birikimi tümör oluşumunu tetiklemesine rağmen, konsantrasyon ve hücre tipine bağlı olarak apoptozu tetikleyebilir ve anti-tümörejenik etkiye dönüşebilir. Bu yüzden, ROS üretiminde uygun hücresel yanıt, hücre canlılığı ve oksidatif hasarı önlemek için kritiktir. ROS oksidatif hasarın şiddetine göre apoptozisi ya da nekrozisi başlatabilir.



Şekil 2.11: ROS'ın metabolik ve biyolojik etkileri (Ma, 2010).

ROS fizyolojik sürecin normal işleyişinde, ikincil mesajcı gibi esansiyel göreve sahiptir. Bu yüzden, ROS TNF α yolağını içeren çoklu sinyal iletim yollarında rol alabilir ve bu hasar doğrultusunda, apoptozis aracılı aktivatör olarak p53 sinyalini başlatabilir (Debeleç-Bütüner et al., 2015).

ROS kaynaklı oksidatif hasarı dengelemek için, aerobik organizmalar genomik kararlılıklarını koruyabilmek adına çeşitli antioksidant mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimatik süpürücüler, hücre savunmasında rol alan antioksidan enzimleri, DNA tamir enzimleri ve genomik denetimin hücresel mekanizmaları içerirler. SOD, süperoksit anyonları hidrojen peroksit'e katalizliyor iken, katalaz ve glutatyon peroksidaz hidrojen peroksit'i suya dönüştürür. Böylece peroksitlerin birimi engellenmiş olur (şekil 2.12). Karsinogenezise karşı koruma ile ilgili en iyi çalışılmış genlerden biri GSTP1'dir. GSTP1, reaktif türlerin detoksifikasyonundan sorumludur ve epigenetik olarak DNA metilasyonu ile baskılanmıştır.



Şekil 2.12: ROS'ın enzimatik eliminasyonu. SOD, süperoksit dismutaz; Prx, peroksiredoksin; GP, glutatyon peroksidaz (Ma, 2010).

2.4.2. Oksidatif Stres Ve Prostat Kanseri

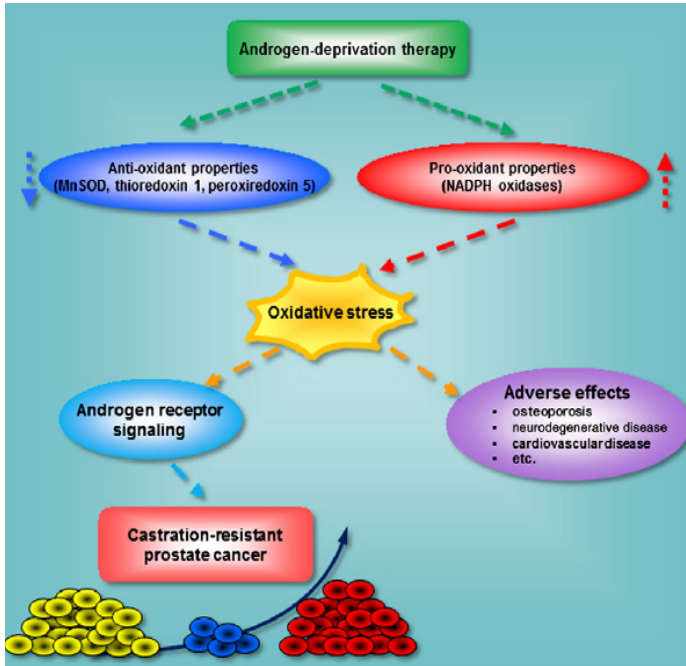
Antioksidan ve oksidanlar arasında ki dengesizlik, stres durumundaki hücrede antioksidan miktarının azalması yada oksidan miktarının artması ile oluşur. Temel olarak, oksidatif stres, endojen ve ekzojen proseslerin bir çoğuna direk yada indirek yolla oksidan/antioksidan dengesine etki etmesini kapsar (Ma, 2010). Mitokondriyal elektron taşıyıcı zincir ve diğer oksitleyicilerin invivo da aşırı ROS üretiminin birincil yolaklarıdır, pürin ve pirimidin bazlarının bozulmasına, tek ve çift zincir DNA kırıklarına, baz ve şeker modifikasyonlarına ve DNA-protein çapraz bağları gibi DNA hasarının bir çok tipine sebep olur (Acharya et al., 2010).

Oksidatif hasar sonucu oluşan genetik modifikasyonlar karsinogenezise sebep olan mutagenizde en önemli yaşamsal adımlardan biridir. DNA hasarı uyarımı, karsinogenez ile ilişkilendirilmiş; transkripsiyon, sinyal iletim yolları, replikasyon hataları ve genomik kararsızlıkları ya başlatabilir ya da durdurabilir (Acharya et al., 2010).

Oksidatif stres prostat karsinogenezisde başlama, gelişme ve ilerleme olarak tanımlanan 3 basamağın hepsine katkı sağlar. Bu etki, başlangıç aşamasında reaktif oksijen türleri tarafından DNA hasarı olarak başlar, gelişme aşamasında anormal gen ifadesi ve sinyal iletimi, ilerleme aşamasında DNA hasarının sürekli tetiklenmesi ile genomik kararsızlık olarak göstermektedir.

Oksidatif stres, hücresel çoğalma ya da aktifleştirme gibi pozitif cevapları aynı zamanda büyümeyi baskılama ve hücre ölümü gibi negatif cevapları da başlatabilir. Hücresel redoks durumları bir çok hücre içi redoks düzenleyici moleküller ile sürdürülmektedir, örneğin; tiyoredoksin redüktaz. Tiyoredoksin çeşitli stres durumlarına karşı hücresel cevaplarda önemli sinyal düzenleyicilerden biridir. Tiyoredoksin otokrin büyüme faktörleri gibi büyüme-destekleyici etkiyi başlatabilir aynı zamanda oksidatif strese karşı sitoprotektif etki (bir hücrenin zedeleyici ve öldürücü etkenlere karşı direncini artıran hücre koruyucu etki) yi başlatabilir. Ayrıca, Glutasyon sistem (GSH) hücrede redoks dengesini sürdürür ama glutasyon tiyoredoksin düzenleyicisine bağlıdır. Glutasyonun aşırı ifadesi, hidrojen peroksit'ten (H_2O_2) hücreleri korur. Bazı tümör hücrelerinde stres seviyeleri antioksidanların etkisi ile gizlenebilir. Eğer moleküler savunma kanser hücrelerinde uzaklaştırılırsa, ölüm sinyalleri başlar ve hücreler apoptozise maruz kalmak için zorlanabilirler (şekil 2.13).

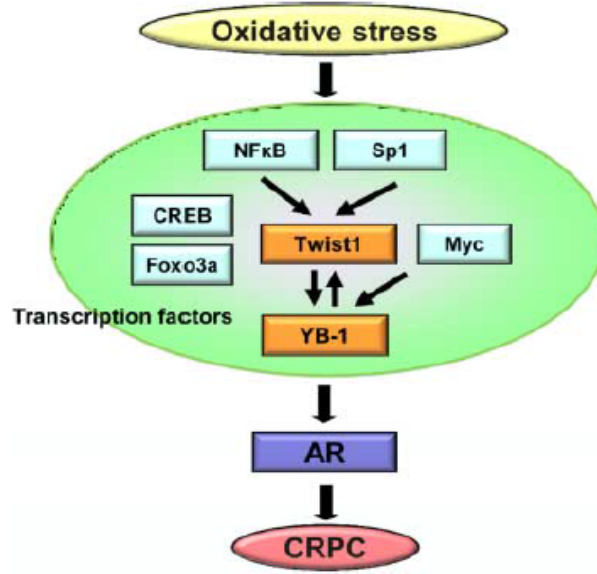
Stres sinyali çalışmaları kanser tedavilerinin gelişmesi için öğretici olduğu kanıtlanmıştır ve antikanser stratejilerin gelişmesinde faydalı olmaktadır (Acharya et al., 2010).



Şekil 2.13: Androgen deprivasyonu terapisi, oksidatif stres, androgen reseptör sinyali ve prostat kanseri arasındaki ilişkinin şematik gösterimi (shiota et al., 2011).

2.4.3. Transkripsiyon Faktörleri Ve Sinyal Yolakları

Oksidatif stres, hücrede ya spesifik sinyal moleküller aracılığıyla ya da hücresel hasar sonucunda fizyolojik, patolojik ve adaptif cevapları tetikler. Bu cevaplar, hastalık süreci ve hücrenin geleceğini etkilemek için transkripsiyon ürünlerini ayarlar. Son yıllarda, bu sinyal yolakların oksidatif streste kritik transkripsiyon cevapları tanımlanmıştır (şekil 2.14).



Şekil 2.14: Transkripsiyon faktörleri arasındaki ilişki ile AR ekspresyonunun indüklenmesi ve kastrasyon dirençli prostat kanserine geçişin şematik gösterimi (Shiota et al., 2012).

2.4.3.1. PI3K/Akt

Akt serin/treonin kinaz proteindir ve büyüme faktörleri ve ekstraselüler sinyallerin bütün hücresel cevaplarında önemli rol alır. Ayrıca, anti-apoptotik proteindir ve hücrede oksidatif stres durumunda aktive edilirler. PI3K/Akt yolağı, NF-κB ve büyüme faktörlerini içeren apoptotik faktörlerin fosforilasyon bağımlı baskılanması aracılığıyla yaşamsal sinyallere uyum sağlar (Ma, 2010).

2.4.3.2. p53

p53 (protein 53) hücre büyümesi ve apoptozu içeren genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde kritiktir. Tümör baskılayıcı p53, hücrel ROS üretiminin düzenlenmesinde önemli rol alır. Orta dereceli stres durumlarında oksidatif stresi azaltır ya da yüksek stres durumunda oksidatif strese teşvik eder.

Mutasyon ile birlikte yada p53 eksikliğinde, genomik kararsızlığı arttırdığı tanımlanmıştır. Çünkü p53 bir çok sinyal yolakda genomik bütünlüğün sürdürülmesine katkı sağlar (Xu et al., 2014).

P53 aktivasyonu, DNA tamir proteinlerin aktivasyonunu yada apoptozisi başlatır. Hasar oluştuğunda hücre bu uyarıya p53 düzeyini arttırarak cevap verir ve p53'de p21'in (G1/S büyüme durdurulmasında önemlidir) ekspresyonunu aktiveleştirir (Ma, 2010).

2.4.3.3. Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2)

Nrf2, oksidantlara karşı savunmada kritik rol alan transkripsiyon faktördür. Nrf2'nin bazal ekspresyonunu yanı sıra faz II enzimlerini kodlayan genlerin indüksiyonu androjen yanıt eleman dizileri (ARE) aracılığıyla sağlanmış olur. Nrf2, hücrel dengenin korumasında esansiyel role sahiptir ve böylece oksidatif stres yada inflamasyon aracılı karsinogenezi önlemek için kritik hedefleri temsil eder. Nrf2'nin kaybı, oksidatif stres gibi kimyasal toksisite ve hastalıklara hassasiyetin artışı ile ilişkilendirilmiştir. Öte yandan, artmış Nrf2 fonksiyonu, kanser ve bir çok toksisiteden vücudu koruduğu yönündedir.

Nrf2 ve GST ailesi kapsamlı olarak insan prostat kanserinde azalmıştır. Nrf2 kaybı, prostat bezinde azalmış GST ekspresyonu, artmış ROS seviyesinin zararlı kaskadını, ve en sonunda DNA hasarını başlatır (Acharya et al., 2010; Ma, 2010)

2.4.3.4. Sirt1

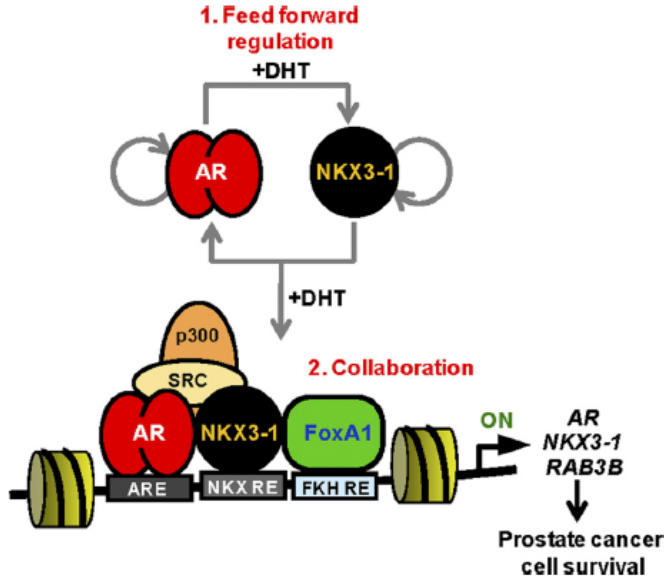
SIRT1, NAD-bağımlı deasetilazdır. Oksidatif strese cevap ve yaşam süresinin (dayanıklık) hücrel düzenlenmesine katkı sağlar. Kromatin yapılarının

ayarlanmasına ek olarak, SIRT1 oksidatif stres altında bir çok transkripsiyon faktörlerini ve hücre proliferasyonunu düzenler. Sirt1 birçok transkripsiyon faktörünü örneğin p53, NBS1, FOXO deasetile eder ve sonrasında hücre döngüsü düzenlenmesi ve DNA hasarı gibi hücre metabolik cevaplara katkı sağlar. Bu yüzden, Sirt1, yaşlanmayı teşvik etme ve apoptozun kontrolünü kaldırması ile tümör hücrelerin canlılığı ile ilişkilendirilmiştir. Prostat kanserinde, Sirt1 ile AR'ın deasetilasyonu, androjen-indükleyici AR transkripsiyonunu baskılar ve AR-indükleyici tümörjenezze katkı sağlar (debeleç-Bütüner et al., 2015; Ma, 2010).

2.4.3.5. NKX3.1

NKX ailesi transkripsiyon faktörlerin homeobox sınıfına aittir. İnsan homeobox ailesinin 12 üyesi vardır ve bunlardan biri NKX3.1'dir. LNCaP hücrelerinde eksprese olur ve androjen uyarımı ile regüle olmaktadır. Prostat biyolojisinde çok önemlidir. Prostat kanserli hücrelerde androjen düzenleyici gen olarak bilinmektedir. Ayrıca, NKX3.1 prostat epitelinin farklılaşmasında ve gelişmesinde önemlidir. Prostat kanserinde ki rolü hala tam olarak bilinmemektedir. Bazı çalışmalarda, NKX3.1 tümör baskılayıcı olarak gösterilmiştir çünkü onun allelik lokusu, prostat kanseri başlangıcında oluşan ve genetik değişikliğe uğrayarak 8p-21 bölgesindeki heterozigotluğun kaybolduğu bölgedir, ama yeni çalışmalarda NKX3.1 ileri düzey prostat kanserinde yüksek derecede eksprese olduğu da gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalar ile NKX3.1 ya prostat kanser hücre canlılığını ya da çoğalmasını teşvik etmek için AR ile birlikte fonksiyon gösterdiği belirtilmiştir (Şekil 2.15) (Tan et al., 2011).

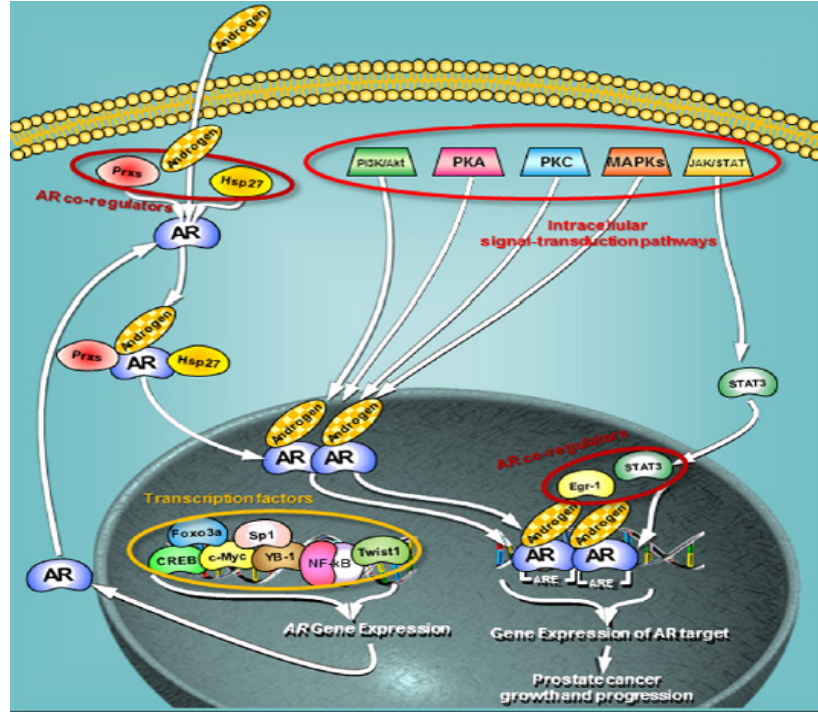


Şekil 2.15: NKX3.1, iki farklı mekanizma ile AR'ın transkripsiyonel ağını düzenler (Tan et al., 2011).

2.4.4. Oksidatif Stres ve AR Sinyalizasyonu

2008 yılı prostat kanseri çalışmalarında, oksidatif stres AR sinyalizasyonu ile ilişkilendirilmiştir. SOD2 (ROS seviyesini düzenler), androjen deprivasyonu ile azalır ve kastrasyon dirençli prostat kanserinde azalarak düzenlenirler. SOD2'nin baskılanması, ROS üretimi ile AR sinyalinin aktivasyonunu indükler. Bu durum bazı yollar ile gerçekleşir, bunlardan birincisi; steroid mekanizmasıyla ilişkili bir çok gen, SOD2 knockdown ile indüklenir ve genlerin ekspresyonundaki değişiklikler, kastrasyon dirençli prostat kanserinde androjen sentezinin artmasına sebep olabilir. İkincisi, 5 nükleer reseptör ko-düzenleyici (ARA70), ROS-bağımlı durumda baskılanmış SOD2 ile indüklenir. AR'ın yeniden aktivasyonu, bazı steroid reseptörlerin dengesinin değişimi ile indüklenir. Sonuncusu, interlökin 6 reseptörü (IL6R), SOD2'in azaltılması ile indüklenir ve AR'ı aktive eder (şekil 2.16).

Böylece SOD2 baskılanması, bir çok mekanizma ile AR'ın yeniden aktivasyonu aracılığıyla kastrasyon direncine katkı sağladığı bulunmuştur. Bu sonuçlar, antioksidan terapi için uygundur ve kastrasyon dirençli prostat kanseri için ümit vericidir.



Şekil 2.16: Prostat kanserinde oksidatif stresle aktive olan sinyal yollarının şematik gösterimi. Oksidatif stres sinyal yollarını aktive eder ve AR sinyalizasyonu ile sonuçlanır (Shiota et al., 2011).

Oksidatif stres, AR sinyalizasyonunda kritik rol oynar. AR sinyali üzerine oksidatif stres etkileri çeşitli mekanizmalara sahiptir. Bunlar, AR'ın aşırı ekspresyonu, intraselüler sinyal iletim yolları aracılığıyla AR aktivasyonu, AR mutasyonu ve de novo androjen sentezi (Shiota et al., 2012).

2.4.4.1. AR'ın Aşırı Ekspresyonu

Kastrasyon dirençli prostat kanseri, artmış AR ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir. Oksidatif stres ile aktifleşmiş çeşitli transkripsiyon faktörleri bunlar; Twist1, YB-1, NF-κB, CREB, Foxo3a ve Sp1 AR ekspresyonunu düzenlerler. Twist1 ve YB-1 ekspresyonu androjen deprivasyon terapisi ile up-regüle olur, AR'ın aşırı ekspresyonu ile sonuçlanır. Ayrıca, Twist1'in aşırı ekspresyonu metastatik karsinomada yaygındır (Shiota et al., 2012).

2.4.4.2. İntraselüler Sinyal İletim Yolakları Aracılığıla AR Aktivasyonu

Bir çok AR ko-regulatorler (Hsp27, and EGR-1), oksidatif stres ile aktive olurlar ve böylece AR'ın transaktivasyonuna katkı sağlar. İntraselüler sinyal yolakları AR transaktivasyonunda rol alır. Sitokinler (epidermal büyüme faktörleri, IL6) ve sinyal iletim yolakları (protein kinaz A, JAK/STAT) oksidatif stres ile aktive olur, AR fonksiyonunu azaltabilir. Böylece, oksidatif stres, Ar sinyalini intraselüler sinyal yolakları aracılığıyla aktive edebilir. Bunu, çeşitli transkripsiyon faktörler ve onların ko-regulator etkileşimleri ile gerçekleştirirler (Shiota et al., 2012).

2.4.4.3. AR Mutasyonları

Oksidatif stres, DNA mutasyonlarına sebep olarak bilinmesine rağmen, AR geninin mutasyonları oksidatif stres indükleyici belirtileri bilinmemektedir. AR genindeki mutasyonlar, onun ligand bağımlı özelliklerini değiştirebilir ve hedef genin ekspresyonunun değişmesi ile sonuçlanabilir.

AR mutasyonlarına ek olarak, AR splay's değişkenleri androjen yokluğunda transkripsiyonel aktivite sergiler ve hatta kastrasyon dirençli prostat kansere geçişe katkı sağlayabilir (Shiota et al., 2012).

2.4.4.4. De Novo Androjen Sentezi

Adrenal bezi ve tümörde androjenin *de novo* sentezi, kastrasyon dirençli prostat kanserine potansiyel sebep olarak yeni tanımlanmıştır. Şimdiye kadar, oksidatif stresin, prostat kanserinde androjen sentezine teşvik etmesi ile ilgili kanıt olmamasına rağmen, bir çok çalışma oksidatif stres ve steroidojenez arasındaki ilişki belirtilmiştir. Örneğin, henüz gösterilen bir çalışma ile H₂O₂, androjen sentezini düzenler. Bunu, oksidatif stresin fizyolojik seviyesi ile steroidojenezi teşvik etmesiyle gerçekleştirir. Bu sonuçlar doğrultusunda, oksidatif stres prostat kanser hücrelerinde *de novo* androjen sentezini teşvik edebilir (Shiota et al., 2012).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Cihaz

- Sınıf II güvenlik kabini (Esco)
- CO₂'li inkübatör (Sanyo, MCO-18AIC)
- Floresan ekli invörted ışık mikroskobu (Leica DMIL)
- Soğutmalı Santrifüj (Sigma, B6916)
- pH metre (Hanna, HI221)
- Manyetik Karıştırıcı (Wisd, MSH-20A)
- Blok ısıtıcı (Grant, QBA2)
- Agaroz jel elektroforez sistemi (VWR, 730-1692)
- Spektrofotometre (Amersham Biosciences, Ultraspec 100 Pro)
- PCR cihazı (TECHNE TC-3000X)
- LC-480 RT-PCR (Roche, Almanya)
- Santrifüj (Eppendorf 5415D ve 5415R)
- Soğutmalı santrifüj (SIGMA, B6916)
- Poliakrilamid jel yürütme aparatı (C.B.S. Scientific, MGV-202)
- Western blot transfer aparatı (C.B.S. Scientific, EBX-700)
- Çalkalayıcı (Heidolph, ROTAMAX 120)
- Çalkalayıcı (Heidolph, DUOMAX 1030)
- Karıştırıcı (Grant-Bio, PTR-30)
- Affymetrix Microarray station
- FACS Canto (BD Biosciences)
- FACS Aria (BD Biosciences)
- Xcelligence (RTCA MP)
- Vorteks (YellowLine, TTS2)
- Sygene Agaroz jel görüntüleme sistemi
- Soğutmalı santrifüj (Sigma 4K15)
- Spektrofotometre (Thermo Nanodrop 1000)
- Su banyosu (GFL Model: 1008)

- Buzdolabı

3.1.2.Sarf malzemeler

- RT2 Real time SYBR green PCR master mix (SaBiosciences, PA-010)
- Cell proliferation reagent WST-1 (Roche, 0 015 944 001)
- RNeasy RNA izolasyon mini kiti (Qiagen, 74104)
- Omniscript cDNA çevirim kiti (Qiagen, 205111)
- Light Cycler Probe Design Software 2 (Roche, Almanya)
- Hemositometre (Neubauer)
- pcDNA4/HisMax Topo TA klonlama kiti (Invitrogen, 45-0067)
- % 0,4 Tripan mavisi solüsyonu (Sigma, T-6146)
- Kuars küvet (Hellma, 105.202-QS)
- Hücre ortamı; RPMI 1640 (Gibco, 52400)
- Fötal dana serumu (FBS) (Gibco, 10270)
- Tripsin-EDTA (Gibco, 3103382)
- Pensilin/Streptomisin (Gibco 15140)
- L-Glutamin (Gibco, 25030)
- R1881 (Sigma, R0908)
- 2'7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate DCFH (Sigma, D6883)
- N-acetyl-l-cysteine LNAC (Sigma, A9165)
- Phorbol 12-myristate 13-acetate PMA (Sigma, P1585)
- Lipopolisakkarit LPS (Sigma, L3024)
- DMSO (Merck K 33960212-504)
- Gliserol (Sigma, G5150)
- Jel elektroforesi için Agaroz (Sigma, A5093)
- Formaldehit (Sigma, F8775)
- 22X22 mm No: 1 lamel (Marienfeld, 0101050)
- Hücre ortamı; RPMI 1640 (Gibco, 52400)
- 1X PBS
- Beta-merkaptoetanol (Sigma, M3148)
- Proteaz inhibitör kokteyli (Roche, 04693159001)
- Fosfataz inhibitör kokteyli (Roche, 04906837001)

- NaF 100X (100mM), (Merck, B815549 606)
- NaVO₃ 100X (200mM) (Fluka, 72060)
- PMSF 100X (100 mM) (Fluka, 93482)
- 15 ml ve 50 ml'lik falkon tüpleri (Jet Biofil, CFT-011-150)
- 10 cm'lik hücre kültürü kapları (Greiner Bio-one CELLSTAR),
- 6 cm'lik hücre kültürü kapları (Greiner Bio-one CELLSTAR),
- 6 kuyucuklu hücre kültürü kapları (Biofil)
- 2,5- 5- 10 ve 25 ml hacimli steril pipetler (Orange),
- Pastör pipeti
- 1-10, 20-200 ve 100-1000 µl otomatik pipetler (Brand, Transferpette-S)
- Pipet uçları (VWR)
- Eppendorf tüpler (Greiner, 616 201)
- E Plate (Roche, 06 472 451 001)
- ECL PLUS kiti (GE Healthcare Amersham Western Blot detection system, RPN2132)
- Hücre kazıyıcı (Cell Scraper, TPP 9903)
- Whatman kağıtları
- Polyvinylidene fluoride (PVDF) transfer membranı (Roche, 03010040001)
- Western blot pozlama kaseti (Amersham Hypercassette, RPN 11643)
- Film (Kodak, 8143059)
- Asetat kağıtları
- Developer (Kimetsan, Fast X-Ray Developer Sol.)
- Fikser (Kimetsan, Fast X-Ray Fikser Sol.)
- 5 ml steril enjektör (Ayset)
- Etanol (Merck, K41414186 038)
- TAE tamponu (4,84 g Trizma baz, 1,41 ml glasiyal asetik asit, 3,72 g Na₂EDTA, 1 lt'ye kadar dH₂O) pH: 8,0
- % 4 Paraformaldehit (AppliChem, A3813) pH:7.8 / %100 soğuk Methanol (Merck, 1552608 034)
- 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solüsyonu
- 0.25 µg/ml DAPI dilactate (Sigma, D9564)
- % 30 gliserol

%70 PBS

- 1-10, 20-200 ve 100-1000 µl otomatik pipetler (Brand, Transferpette-S)

- Modifiye RIPA tamponu:

10 mM Tris.Cl pH=8,0 (Sigma, T5941)

% 0.1 SDS (Sigma, L4390)

% 1 Triton X-100 (Sigma, T8787)

% 0.1 Sodyum Deoksikolat (Sigma, D6750)

1 mM EDTA (Sigma K5134)

1 mM EGTA (Sigma, E3889)

140 mM NaCl (Sigma, S3014)

- BCA kiti (Sigma, 088K6138)

- İzopropanol (Merck, K35707095 607)

- % 30 akrilamid karışımı için

% 29 akrilamid (Sigma, A9099)

% 1 N, N- metilenbisakrilamid (Sigma, M2022) karışımı hazırlanarak

filtrelendi ve gazı alınarak kullanıldı.

- 4X SDS-PAGE ayırma jel tamponu

1.5 M Tris/HCl (Sigma, T5941)

% 0.4 SDS (Sigma, L4390), pH 8.8

- 4X SDS-PAGE depolama jel tamponu

0.5 M Tris/HCl (Sigma, T5941)

% 0.4 SDS (Sigma, L4390), pH 6.8

- % 10'luk Amonyum Persülfat (APS) (Sigma, A9164)

- TEMED (Sigma, T9281)

- 1L hacim için SDS-PAGE jel 10X yürütme tamponu (1X olarak kullanılır)

30 g Trizma baz (Sigma, T6066)

144 g Glisin (Biochemika/FLUKA, 50046)

10.0 g SDS (Sigma, L4390)

- 4X Yükleme tamponu

40 mM Tris HCl (pH 8,0)

0.4 mM EDTA (Sigma, K5134)

% 4 SDS (SIGMA L4390)

% 20 Gliserol (Sigma, G5150)

Brom fenol mavisi 200 ul (Merck, L54971322-525)

- SDS-PAGE jel 10X transfer tamponu, toplam hacim 1L

%20 metanol (Merck, K34212908503)

30.0 g Tris baz (Sigma, T6066)

144.0 g Glisin (Biochemika/FLUKA, 50046)

- Beta-mercaptoetanol (Sigma, M3148)

- 10 X TBS (pH 7.6), toplam hacim 1L

2,1 g Tris baz (Sigma, T6066)

80.0 NaCl (Sigma, S3014)

TBS-T için 1X TBS içine % 0.1 Tween 20 (Sigma, E1383) ilave edildi.

- Fosfat Tamponu (Phosphate Buffered Saline / PBS)

8 g NaCl (Sigma, S3014)

0.2 g KCl (Merck,)

1,57 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, K22287176) ile dH_2O içerisinde

hazırlanarak 1M HCl (Merck,) ile pH 7.4'e ayarlandı.

- Yağsız süt tozu (Meier)

- Anti-rabbit IgG horse radish peroxidase (HRP) (Amersham, NA934)

- Anti-mouse IgG horse radish peroxidase (HRP) (Amersham, NA931)

- Anti-mouse IgG (Invitrogen Molecular Probes, Alexa Fluor 594)

(Invitrogen, A11005)

- Anti-rabbit IgG (Invitrogen Molecular Probes Alexa Fluor 594)

(Invitrogen, A11012)

- NKX3.1 antikoru (sc-T19x, Dr. F. Saatçioğlu Lab Oslo Üniversitesi)

- Anti- γH2AX antikoru (Millipore, 05-636)

- GAPDH antikoru (Ambion, AM4300)

- α -Tübülin antikoru (Santa cruz biotechnology, sc-8035, ABD)

- β -aktin antikoru (Sigma, A5316)

- AR antikoru (Millipore, 06-680)

- p53 antikoru (Abcam, ab2433)

- p- ATM(S1981) antikoru (Abcam, ab81292, İngiltere)

- p-H2AX (Ser139) antikoru (Millipore)

- Kaspaz 3 antikoru (Cell signaling, #9662)

- Anti-pAKT (Ser473) antikoru (Santa Cruz, sc-7985-R)

- Anti-p21 antikoru (Santa Cruz, sc-817)
- Anti E-kaderin antikoru (Santa Cruz, sc-8426)

Deneyler sırasında 3 farklı hücre hattı kullanıldı. Hücre hatları ATCC'den temin edildi.

1. LNCaP (insan prostat karsinomu lenf nodu metastazı hücre hattı-yüzeye bağlı)
2. U937 (monosit hücre hattı- süspande)
3. LNCaP abl/104r2 (androjen bağımsız hücre hattı)

3.2. Metod

3.2.1. Hücre kültürü

3.2.1.1. Hücrelerin bakımı ve pasajlanması

Hücrelerin beslenmesi amacıyla % 10 FBS, %1 L-glu, %1 P/S içeren RPMI kullanıldı. U937 hücrelerinin besi ortamında kullanılan FBS 2 kez inaktive edildi. LNCaP abl/104r2 hücre hattı içinde %3CT-FBS'li (aktif karbon içeren serum) ortamda beslendi. Hücreler yetiştirilirken eğer tüm yüzeyi kaplayacak kadar çoğalmadıkları durumda, yüzeye bağlı hücrelerin ortamı pastör pipeti ile uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine taze ortam eklenerek 2 günde bir ortam değiştirildi. Hücreler, 75 cm'lik flaskda 13 ml, 10 cm'lik hücre kültür kaplarında 8 ml, 6 cm hücre kültür kaplarında 3 ml ortam içinde, 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde büyütüldüler. Hücreler tüm yüzeyi kaplayacak kadar çoğaldıklarında pasajlandılar.

Steril cam pastör pipetleri kullanarak vakum yardımıyla ortam uzaklaştırıldı. Kültür yüzeyi tripsin muamelesinin etkisini arttırmak için Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen steril PBS ile bir kez yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml (10 cm kültür kapları için) tripsin-EDTA solüsyonu ilave edildi ve 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 4-5 dakika hücreler yüzeyden kalkana kadar bekletildi. Hücre yoğunluğuna uygun hacimde taze ortam hücreler üzerine eklendi ve hücreler pipet yardımıyla homojenize edildi. Homojenize edilen hücreler yeni kültür kabındaki

ortamın üzerine yavaşça ilave edildi ve büyümeleri için 37°C'de %5 CO₂'li inkübatöre yerleştirildi.

3.2.1.2. Hücrelerin dondurulması ve çözülmesi

Hücreler uzun süreli kültüre edildiklerinde morfolojik, büyüme, fonksiyon ve karyotipik olarak değişime uğramaktadırlar. Hücre kültürleri *in vitro* yaşa bağımlı değişiklikler gösterir ve bazı kültürler büyüme ve fonksiyonel özelliklerinde değişime sebep olan spontan transformasyona uğrarlar. Dondurulan hücreler ise daha uzun süre özelliklerinde değişim olmadan saklanabilir. Çalışma süresince, hücreler belirli pasaj numaralarında donduruldu. Dondurulma sırasında hücreleri korumak için DMSO ve gliserol gibi kriyoprotektan ajanlar kullanıldı.

Hücreleri pasajlamak üzere yapılan tüm işlemler yapıldıktan sonra son aşamada hücre kültür kabına aktarılmadan, %30 FBS içeren taze hücre ortamında bulunan hücreler üzerine % 5 DMSO eklendi ve her kriyotüpe 1 ml aktararak -86 °C saklandı.

Çözdürülecek olan hücreler -86 °C derin dondurucudan çıkarılıp hızla 37 °C su banyosunda çözülene kadar (yaklaşık 1-2 dk) bekletildi. Ardından hücreler, hücre kültürü kabındaki 37 °C'ye ısıtılmış 8 ml ortam üzerine ilave edildi.

3.2.1.3. Hücre sayımı

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

- Sayım için hücre süspansiyonundan 10 µl alınıp tripan mavisile 100 µl'ye tamamlandı (10 kat dilüsyon).
- Karışım pipetle homojenize edildi.
- Hemositometre ile üzerindeki lamel arasına, hücre süspansiyonu pipetle kenardan yayıldı.

- Hemositometre üzerinde yer alan 9 büyük kare içindeki hücre miktarı sayıldı.
- Mililitredeki hücre sayısını (hücre sayısı/ml) belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı

$$\text{Hücre sayısı / ml} = \frac{\text{Sayılan hücre miktarı} \times \text{Dilüsyon oranı (10)} \times 10^4}{9}$$

3.2.2. Transfeksiyon

NKX3.1-pcDNAHismax için: 5×10^5 LNCaP hücresi 60mm'lik hücre kültürü kaplarında büyütüldü. Transfeksiyondan 2 saat önce besi ortamı uzaklaştırılarak hücreler PBS ile yıkandı ve normalde kullanılan miktarın yarısı kadar serumsuz ve antibiyotiksiz ortam eklendi. 2 saat sonra aynı özellikteki ortama (6 cm kültür kabı için toplam hacim 100 µl olacak biçimde) 6 µl Xtreme (Roche) eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında beklendi. Ardından oluşan kompleksin üzerine 1 µg DNA eklenerek tekrar oda sıcaklığında 15 dk beklendi. Son olarak da oluşan kompleksler mikropipet ile hücrelerin üzerine damlatıldı. Transfeksiyondan 6 saat sonra normalin yarısı kadar serumsuz ortam içeren kültür kaplarına normalin 2 katı serum içeren ortam eklenerek ortam ve serum seviyesi normal düzeye getirildi.

siAR transfeksiyonu için: 5×10^5 LNCaP hücresi 60cm'lik hücre kültürü kaplarında büyütüldü. Hücreler transfeksiyondan 2 saat önce P/S içermeyen serumlu besi ortamına alındı. Transfeksiyon karışımı P/S ve serum içermeyen ortamda, 6 µl Dharmafect II ve 200 pmol siAR kullanılarak hazırlandı. İlk önce bir tüpte ortam ve reagent hazırlanırken diğer tüpte de ortam ve siAR hazırlandı ve 5 dk beklendi. Ardından siAR tüpü reagent üzerine eklendi ve 15 dk bekletildi. Son olarak, hücrelerin üzerine pipetle eklendi (6 cm'lik kültür kaplarına 200 µl eklendi).

3.2.3. RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-PCR

Hücreler 4x10⁵ olacak şekilde 60 cm'lik hücre kültürü kaplarına ekildi ve 2 gün kültürde bekletildi. Hücrelerden RNA izolasyonu için hücrelerin ortamı uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. Ardından RNeasy RNA izolasyon kiti kullanılarak (Qiagen) hücrelerdeki total RNA izole edildi. Elde edilen RNA'ların miktarı ve saflığı spektrofotometrede ölçüldü. 500 ng RNA %5 formaldehit içeren %1'lik agaroz jelde yürütülerek 28S ve 18S ribozomal RNA'lar dikkate alınarak, degradasyon durumu kontrol edildi. Elde edilen RNA'dan cDNA oluşturmak için Superscript III cDNA sentez kiti (Invitrogen) kullanıldı, 4 µg RNA cDNA'ya çevrildi.

RT-PCR deneyleri LC-480 Real Time PCR cihazında SYBR Green yöntemi ile yapıldı. Reaksiyonlar 20 µl hacimde ve aşağıdaki gibi hazırlandı;

- 1 µl hacimde 10 pmol primer (Forward+Reverse)
- 2X SYBR Green Master Mix
- 1 µl hacimde 50 ng cDNA
- 20 µl'ye kit içeriğindeki su ile tamamlandı.

RT-PCR cihazında (Denatürasyon: 94°C'de 5 dk. 1 döngü, Amplifikasyon: 94°C'de 10 sn / 60°C'de 10 sn / 72°C'de 20 sn olmak üzere 45 döngü şeklinde ve çift zincirin ayrılması/melting curve basamağı programlandı.

RT-PCR denemeleri için primerler, “Roche primer ve probe design software” kullanılarak tasarlandı veya literatürde daha önce kullanılmış olan primer dizilerinden yararlanıldı. Bütün sonuçlar için karşılaştırmalı CT hesaplama yöntemi kullanıldı. Bu amaçla deneyde kullanılan ve ekspresyonu değişmeyen GAPDH “housekeeping” geninin amplifikasyonu dikkate alınarak araştırılan genlerin ekspresyon değişimleri normalize edildi (Lightcycler 480 cihazının relatif kuantifikasyon analizi). Aşağıdaki primerler kullanıldı:

GPX2_F:	CAGTCTCAAGTATGTCCGT
GPX2_R:	AGGCTCAATGTTGATGGT
GPX3_F:	CTTGACCATTCGGTCT
GPX3_R:	CGGACATACTTGAGGGTAG

PRDX6_F:	TAGTGTGATGGTCCTTCCAAC
PRDX6_R:	AGCGGAGGTATTTCTTGC
QSCN6_F:	GAGGCTACGTGCACTACT
QSCN6_R:	CTGCAAGGCGAGCATTGA
ENOX2_F:	CTGAACGTGAAGCACTG
ENOX2_R:	ATCAAGACGGTGCAAGTAG
SOD1_F:	TGTACCAGTGCAGGTCC
SOD1_R:	GCCAATGATGCAATGGTC
SOD2_F:	TGTCCAAGGCTCAGGT
SOD2_R:	CTGAAGGTAGTAAGCGTGC
NKX3.1_F:	TCTATCAGCATCTGACAGGTGAA
NKX3.1_R:	AGCAGGGTTTGTATGCATGTAG
SIRT1_F:	TGCGGGAATCCAAAGGATAATTCAGTGTC
SIRT1_R:	CTTCATCTTTGTCATACTTCATGGCTCTATG
GAPDH_F:	CATTGCCCTCAACGACCACTTT
GAPDH_R:	GGTGGTCCAGGGGTCTTACTCC

3.2.4. İmmünoflöresan

3.2.4.1. Hücrelerin hazırlanması

%70 EtOH'de bekletilen lameller steril kabin içinde kağıt mendil üzerine konularak kuruması beklendi ve kültür kaplarına yerleştirildi. Hücreler; içlerinde lamel bulunan 6 cm'lik kültür kaplarına 3 ml ortam içerisinde %50-60 yoğunlukta olacak biçimde pasajlandı ve 24 saat kültür edildi.

Madde uygulamaları ve/veya transfeksiyonlar yapıp deney tasarımına uygun şekilde kültür edildi.

3.2.4.2. Fiksasyon ve Bloklama

Ortam uzaklaştırılıp 1 ml PBS ile bir kez yıkama yapıldı. 1 ml soğuk %100 metanol eklenerek -20C de 30 dk fiske edildi. 1 ml PBS ile 1-2 kez yıkama yapıldı. Oda sıcaklığında ve karıştırıcı üzerinde % 0,2 triton X-100 içeren PBS ile 5 dakika inkübasyon yapılarak hücreler geçirgenleştirildi. 1 ml PBS ile bir kez yıkama yapıldı. % 1 BSA içeren PBS ile 5 dakika oda sıcaklığında bloklama yapıldı ve bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı.

3.2.4.3. Antikor işaretleme

Kullanım konsantrasyonları optimize edilmiş primer antikorlar %1 BSA içeren PBS içinde, her lamele 50 µl hacimde damlatıldı ve lamellerin üzeri parafilm ile kapatılarak 37°C' de 1 saat inkübe edildi. 4 defa PBS ile yıkandı. %1 BSA içeren PBS içerisinde hazırlanan sekonder antikorlar her lamele 50 µl hacimde damlatıldı ve lamellerin üzeri parafilm ile kapatılarak 37°C' de 20 dk inkübe edildi. 4 defa PBS ile yıkandı. 1 ml % 70 EtOH eklendi ve en az 5 dk +4 C'de bekletildi. 1 ml %100 EtOH eklendi ve oda sıcaklığında 1-2 dk bekletildi.

3.2.4.4. DAPI ile kapatma

%100 etanol içindeki hücreler buradan çıkarılarak kağıt mendiller üzerine konuldu ve kuruması beklendi. Hücrelerin lamel üzerinde tutunduğu yüzeye 10 µl DAPI solüsyonu (0,25 µg/ml) damlatıldı ve ters çevrilerek lamaların üzerine kapatıldı. Flöresan mikroskobu ile inceleme yapıldı.

3.2.5. İmmünoablota (western-blot)

3.2.5.1. Protein izolasyonu

RIPA modified tamponu kullanarak protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla, hücre kazıyıcı yardımıyla hücreler ortam içindeyken kaldırıldı ve 15 ml tüplere toplandı. 300 g'de santrifüj edilerek ortam uzaklaştırıldı. Hücreler, 1 ml soğuk PBS ile süspande edildi ve tekrar santrifüjlenerek PBS uzaklaştırıldı. Hücre miktarına uygun miktarda RIPA modified tamponu (inhibitörler eklenmiş) ile süspande edildikten sonra buz üzerinde 45 dk bekletildi. Sonra %30 güçle, %50 aralıkla 20 sn sonkasyon yapıldı ve 12.000 g'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant yeni tüpe alındı, protein lizatı olarak -86°C'ye kaldırıldı.

3.2.5.2. Protein miktarının belirlenmesi

Elde edilen lizatlardaki protein miktarı BCA protein miktarı ölçüm kiti kullanılarak belirlendi. Ölçüm aşağıdaki gibi yapıldı.

Eppendorf tüplere 149 µl RIPA modified tamponu ve 1 µl protein lizati örneği eklendi.

BCA çalışma reaktifi; her örnek başına 75 µl QA, 75 µl QB ve 3 µl QC olacak şekilde bütün örnekler ve kör için gerekli toplam karışım hazırlandı. Hazırlanan BCA çalışma reaktifi vortekslenerek örneklerin bulunduğu tüplere her örnek için 150 µl eklendi. Kör olarak protein lizati bulunmayan 150 µl RIPA kullanıldı.

Tüpler vortekslenip, kısa santrifüjden sonra 60°C'de ısıtıcı blokta 1 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında örneklerin oda sıcaklığına gelmesi beklenip spektrofotometrede 562 nm'de absorbansları ölçüldü.

Elde edilen absorbans değerleri protein standart eğrisine göre hesaplanarak protein miktarları µg /µl olarak belirlendi.

3.2.5.3. Proteinlerin SDS-PAGE ile ayrılması

Camlar sırasıyla su-etanol-izopropanol ile silindi hazırlanan jel dökme aparatına uygun yüzdede ayırma jelleri döküldü (Çizelge 1). Jelin düzgün bir biçimde donabilmesi için üzerine izopropanol döküldü.

Ayırma jeli donduktan sonra, donan ayırma jelinin üzerindeki izopropanol uzaklaştırıldı ve depolama jeli dökülerek (Çizelge 2) tarak yerleştirildi. Kullanımdan önce gerekli hacimde 4×yükleme tamponu içerisine %10 oranında β-merkaptotanol eklendi ve karıştırıldı. Protein lizatlarından her örnekten 30 µg-70 µg miktarlarına karşılık gelen hacimlerde yeni tüplere örnekler koyuldu ve su ile 20 µl'ye tamamlandı, 8 µl 4x yükleme tamponu ilave edildi. Hazırlanan protein örnekleri 95 °C' de 5 dakika denatüre edildi. Denatürasyonun hemen ardından örnekler buz üzerine alındı ve jele yüklemmeden önce kısa santrifüj yapıldı. Kuyucuklara yüklenen örnekler uygun voltajda (80 V) ve sürede (3-4 saat) yürütüldü.

Çizelge 1. Ayırma jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları

Ayırma jeli (10 ml)	%6	%8	%10	%12	%15
dH ₂ O	5,4 ml	4,7 ml	4,1 ml	3,4 ml	2,4 ml
%30 akrilamid karışımı	2,0	2,7	3,3	4	5
4X ayırma jeli tamponu	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
%10 APS (ml)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
TEMED (ml)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Çizelge 2. Depolama jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları

Depolama jeli	10 ml	5 ml	2,5 ml
dH ₂ O (ml)	5,7	2,85	1,425
%30 akrilamid karışımı	1,7	0,85	0,425
4x depolama jel tamponu	2,5	1,25	0,625
%10 APS (ml)	0,1	0,05	0,025
TEMED (ml)	0,010	0,005	0,005

3.2.5.4. Membrana transfer

PVDF membran metanol içinde ıslatıldı. Western-blot transfer kaseti içine sırasıyla sünger, Whatman kağıdı, proteinlerin yürüdüğü jel, PVDF membran, Whatman kağıdı ve sünger yerleştirilerek transfer örneği hazırlandı. Transfer kaseti, transfer tankına yerleştirilerek gece boyu +4°C’de 90 mA’de transfere bırakıldı.

3.2.5.5. Primer antikor işaretleme

Transfer tankından çıkarılan membran 2 kez TBS-T ile çalkalandı. TBS-T’de hazırlanan %5 yağsız süt tozu ile oda sıcaklığında 1 saat bloklandı. Bloklamadan sonra membran TBS-T ile 2 defa çalkalandı. Daha önce kullanım oranı optimize edilmiş primer antikor, % 0,5 süt tozu ya da %5 BSA içeren TBS-T’de hazırlandı. Membran primer antikor solüsyonu içinde, oda sıcaklığında 1 saat ya da +4°C’de gece boyu yavaşça çalkalanarak inkübe edildi. Membran 2 kez çalkalama, 1 kez 15 dk ve 3 kez 5 dk TBS-T ile yıkandı.

3.2.5.6. Sekonder antikor işaretleme

Kullanım oranı 1/5000 veya 1/10.000 olarak optimize edilmiş HRP- bağlı tavşan, fare ya da keçi sekonder antikorları % 0,5 süt tozu içeren TBS-T içinde hazırlandı. Membran sekonder antikor solüsyonunda, oda sıcaklığında 1 saat yavaşça çalkalanarak inkübe edildi.

Membran 2 kez çalkalama, 1 kez 15 dk ve 3 kez 5 dk TBS-T ile yıkandı.

3.2.5.7. Bantların görüntülenmesi

Karanlık odada membran üzerine hazırlanan ECL-plus kiti solüsyonu (A:B solüsyonu 40:1 oranında membran büyüklüğüne uygun hacimde hazırlandı) döküldü ve 5 dakika inkübe edildi.

Kasetin içinde iki asetat kağıdı arasına yerleştirilen membran üzerine film konularak farklı sürelerde pozlama gerçekleştirildi.

Film 2 dakika developer ve 5 dakika fikser solüsyonundan geçirilerek bantlar film üzerinde görüntülendi.

3.2.6. İnflamatuvar şartlandırılmış ortam üretimi

3.2.6.1. U937 monosit hücrelerin farklılaştırılması ve şartlandırılmış ortam (Conditioned Media/CM) üretimi

U937 monosit hücreleri, 10% FBS içeren RPMI 1640 besi ortamında, 5% CO₂ ve 37°C koşullarında kültür edildi. Makrofajlara farklılaştırmak amacıyla, madde uygulamasından 2 saat önce, 8×10^6 hücre, 75 cm²'lik flasklara split edildi. 2, 4, 8, 16nM final konsantrasyonlarında phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 16 saat süresince uygulandı ve doğal koşullarda süspande halde olan monosit hücrelerin farklılaşarak kümeler oluşturmaları sağlandı. Besi ortamı uzaklaştırılıp hücreler PBS ile yıkandı ve 20 ml yeni besi ortamı eklendi. Hücreler 3 saat dinlendirildikten sonra, 10 ng/ml final konsantrasyonda lipopolisakkarit (LPS) eklendi ve hücreler 24 saat inkübe edildi. Son olarak CM toplanarak 0,2 µM filtre

ile filtrelendi.

3.2.6.2. CM'deki TNF α , IL-1 β , IL-6 sitokin konsantrasyonların ölçümü

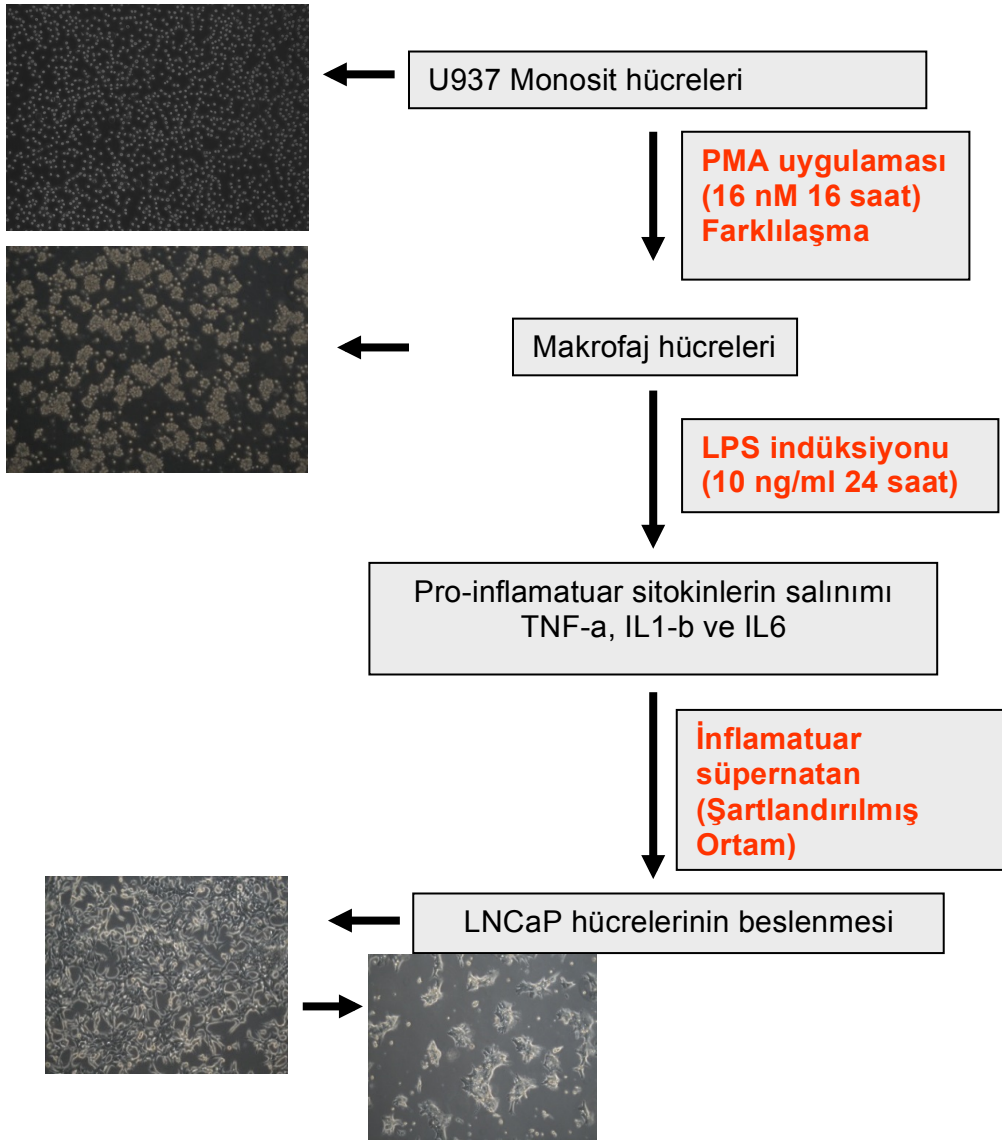
LNCaP hücreleri CM ile beslenmeden önce, TNF α , IL-6, IL-1 β konsantrasyonları, ELISA yöntemi ile bu sitokinlere özel hazırlanmış kitler kullanılarak ölçüldü. Şekil 3.1'de CM eldesinin basamakları, sitokin konsantrasyonlarının ölçümü, ve LNCaP hücrelerinin beslenmesini içeren *in vitro* inflamasyon modeli şematik olarak gösterilmektedir.

3.2.7. DCFH ile ROS ölçümü

10⁴ LNCaP hücresi 96-gözlü hücre kültürü kaplarında büyütüldü. Transfeksiyon sonra, FR- içerisinde 10 μ M DCFH-DA eklendi ve 37°C'deki %5.5 CO₂'li inkübatörde 30 dk inkübe edildikten sonra besi ortamı uzaklaştırıldı ve FR- ile 1 kez yıkama yapıldı. Madde uygulamaları yapıp hemen florimetride ex: 485 ve em: 538 filtreleri ile okumaya başlandı. 3 saat boyunca her 20 dakikada ölçüm alındı.

3.2.8. Gerçek zamanlı hücre proliferasyon ölçümü

Xcelligence proliferasyon denemesi gerçek zamanlı ölçümler için kullanıldı. Özetle, 96-gözlü hücre kültürü kaplarında büyütülen LNCaP hücreleri (8*10³) HM-vektör ve HM/NKX3.1 ile 24 saatlik transfeksiyon yapıldı. Madde uygulamaları yapıldı ve proliferasyon hızı ve morfolojik değişimler ölçüldü. Empedans değerleri 48 saat boyunca her on dakikada bir toplandı.

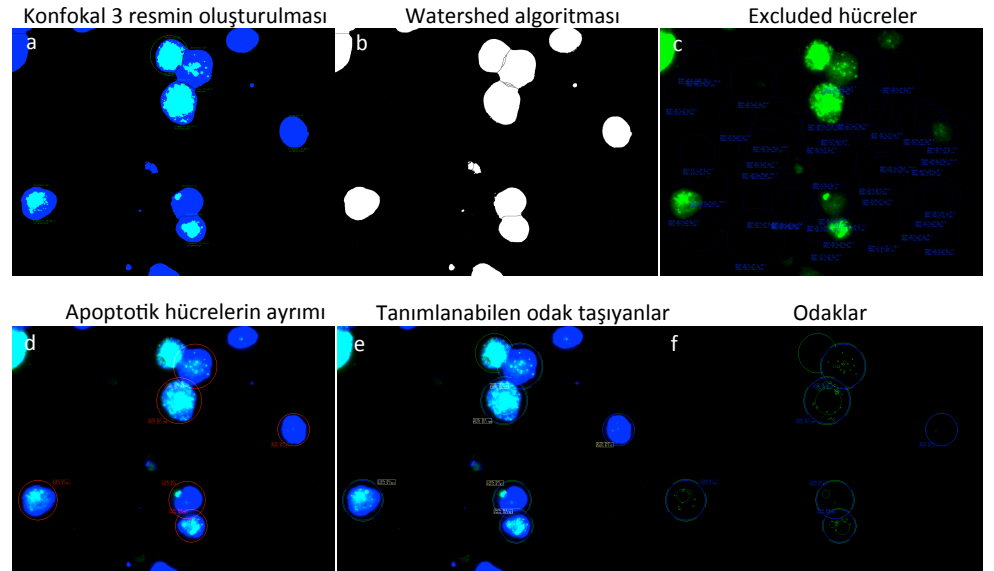


Şekil 3.1: In vitro inflamasyon modeli basamaklarının şematik gösterimi

3.2.8. Aklides Nuk sistemi ile γ -H2AX odak sayımı

Aklides Nuk sistemi, DNA hasarı belirteci olan γ -H2AX odaklarının otomatize olarak hızla sayılması için tasarlanmış ve çoğunlukla tanıda kullanılması amaçlanmıştır. Pediatrik malignitelerdeki DNA onarım değişikliklerine ilişkin bir çalışmada, lenfositlerdeki γ -H2AX odakları analizi bu sistemle çalışılmıştır. Sistemin optimizasyonuna ilişkin bir diğer çalışmada, periferik kan mononükleer hücrelerinde farklı DNA hasarı ajanları kullanılarak γ -H2AX odakları analizlenmiş ve protein düzeyleri ile karşılaştırılarak sonuçların tutarlılığı saptanmıştır.

Çalışmamızda 2.5×10^5 LNCaP hücresi 6-gözlü hücre kültürü kaplarında, lameller (No:1) üzerinde büyütüldü. Transfeksiyon ve madde uygulamalarından sonra, immüno Floresan yöntemiyle aynı biçimde fiksasyon ve antikor işaretlemeleri yapıldı. Lameller üzerindeki hücreler kurutulduktan sonra DAPI boyası içeren solüsyon ile Aklides sisteminin özel büyüklükteki lamalarına kapatıldı. Her örnek için en az 100 hücredeki γ -H2AX odakları sayılarak ortalamaları hesaplandı. Hücre tanımı için atanmış (80) parametreden bazıları (6 parametre) sistem tarafından LNCaP hücrelerinin tanınması için optimize edildi. Bu parametrelerden en önemlileri nükleus büyüklüğü (4-26 μm), γ -H2AX odak büyüklükleri (0.1-1 μm) ve konveksite (0.8) değerleri yeniden ayarlandı. Tam otomatik olarak çalışan Aklides Nuk sistemi tarafından elde edilen nükleus ve odak sayımı görülmektedir (Şekil 3.2). Burada görüldüğü üzere, sistem atanmış parametreler kullanılarak hücreler 3 ayrı konfokal odakta görüntülenmekte (a), atanmış büyüklük parametrelerine göre hücre olmayan partikülleri ayrılarak (b ve c), varsa apoptotik olanları ayırmakta (d) ve odak içeren ilaç veya muamele sonucunda oluşan değişiklikleri (etkilenmiş) (e) tanımlayarak, hücre başına (f) sayımları excel dosyasına aktarılmaktadır. Hücre sınırlarının daha iyi tanımlanması için watershed algoritması kullanılmaktadır.

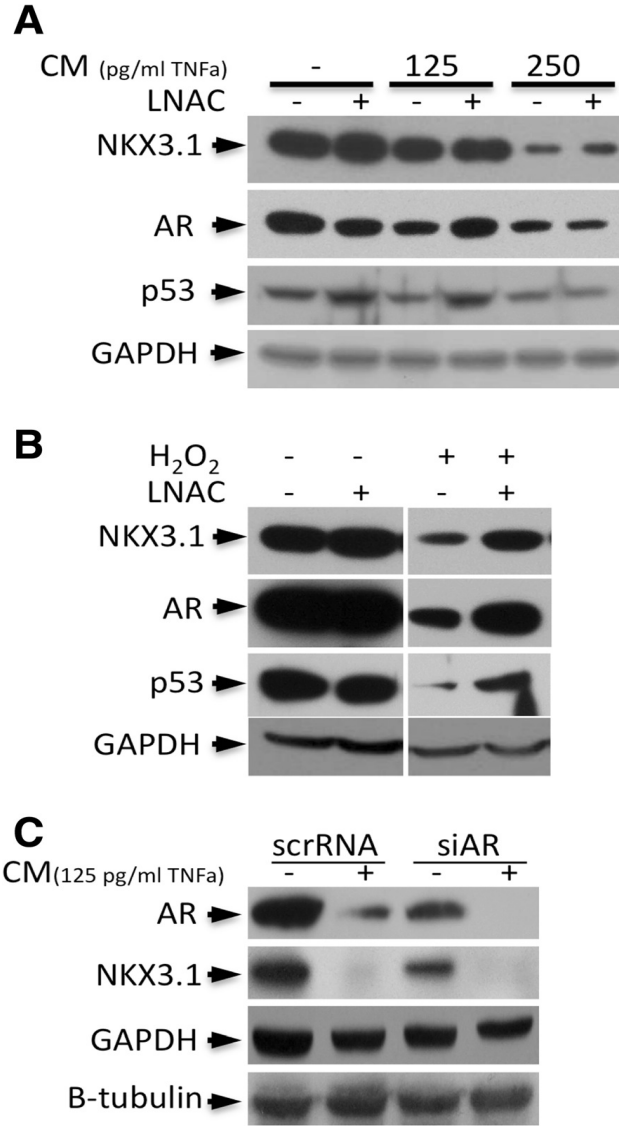


Şekil 3.2: Aklides Nuk sisteminin çalışma prensibine ilişkin örnek analiz fotoğrafları

4. BULGULAR

4.1. AR, NKX3.1 ve p53 degradasyonlarının LNAC uygulaması ile inhibisyonu

Sitokin ve ROS sinyalizasyonu arasındaki etkileşim birçok çalışmada gösterilmiştir. Ancak inflamatuvar mikroçevre koşullarında AR, NKX3.1 ve p53 degradasyonları üzerinde, oksidatif stres ve sitokinlerden hangisi(leri)nin etkisinin esas faktör olduğunu belirlemek amacıyla, LNCaP hücrelerine, antioksidan LNAC ile birlikte CM ve H₂O₂ uygulanarak degradasyon değişiklikleri incelenmiş, AR, NKX3.1 ve p53 seviyelerinde, CM'in artan konsantrasyonuna bağlı olarak degradasyon artışı görülmüştür. Ayrıca, LNAC uygulamasıyla AR seviyesinde ve düşük CM dozunda bir geri kazanım görülmekte, ancak NKX3.1 degradasyonunda değişiklik görülmemektedir (Şekil 4.1.A). H₂O₂ varlığındaki AR ve NKX3.1 degradasyonlarının LNAC ile tamamen inhibe edildiği belirlenerek, bu etkinin sitokin ve ROS sinyalizasyonu arasındaki etkileşimden kaynaklandığı düşünülmüştür (Şekil 4.1.B). Bununla birlikte, LNAC uygulamasıyla p53 seviyesinde kontrol hücrelerinde ve düşük doz CM varlığında tamamen geri kazanım belirlenmiş (Şekil 4.1.A), H₂O₂ varlığında ise artış görülmüştür (Şekil 4.1.B). Bu nedenle, inflamatuvar ortamdaki p53 degradasyonunun artan ROS seviyesinin bir sonucu olduğu varsayımlanmıştır. Dahası, LNCaP hücrelerinde CM uygulamasıyla beraber AR susturulduğunda, AR yoksunluğu ve CM aracılıklı proteozomal degradasyonun sonucu olarak NKX3.1 seviyesi de azalmıştır (Şekil 4.1.C).



Şekil 4.1: Antioksidan LNAC uygulaması ile AR, NKX3.1 ve p53 protein düzeylerinin korunması. LNCaP hücrelerindeki protein düzeyleri, **A.** 24 saatlik CM (125 ve 250 pg/ml TNFα içeren) ve **B.** H₂O₂ (250 uM) uygulamaları sonucunda ölçülmüştür. 10 mM LNAC uygulamaları ise CM ve H₂O₂'dan 1 saat önce yapılmıştır. **C.** CM uygulaması ile AR yokluğunda NKX3.1 protein seviyesi azalır. CM (Conditioned media/şartlandırılmış ortam).

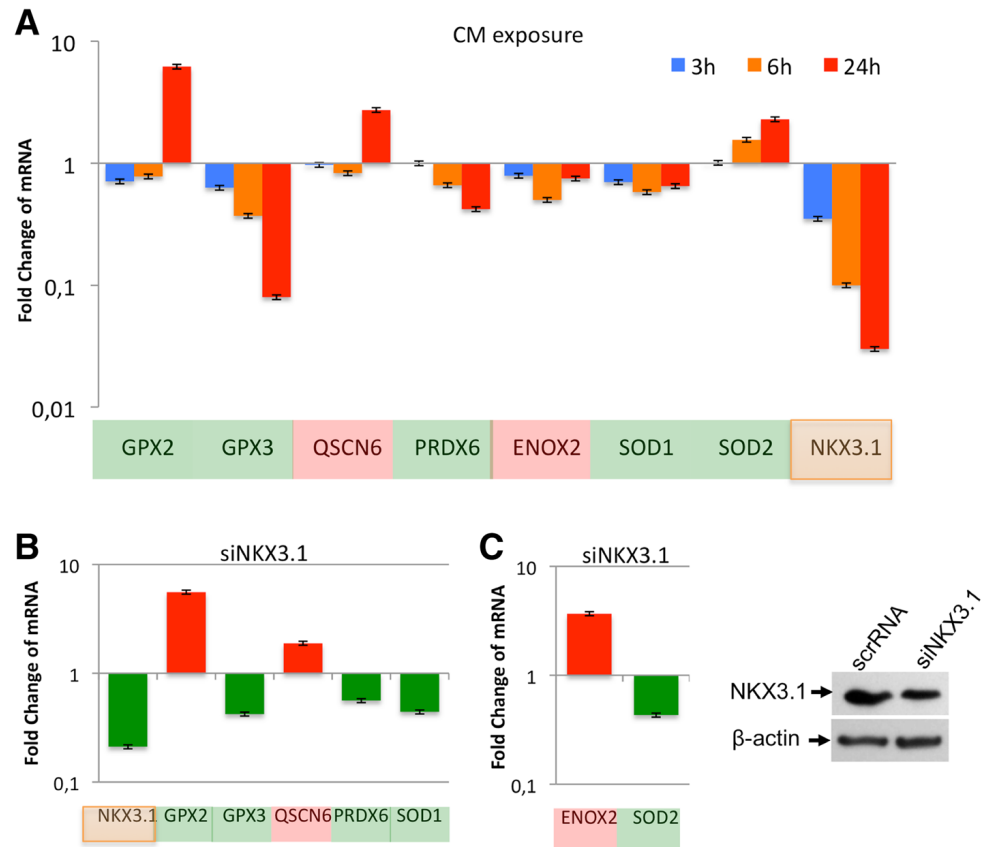
4.2. Oksidatif stres regülatörü enzimlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde NKX3.1'in etkisi

NKX3.1, prostat dokularında androjenlerle regüle olan ve tümör baskılayıcı işleve sahip önemli bir transkripsiyon faktörüdür. LNCaP hücrelerinde, oksidatif stres ve inflamasyon koşullarındaki NKX3.1 kaybının, antioksidan yanıt

oluşumuyla ilişkili genlerin ekspresyonundaki etkisini araştırmak için 3, 6 ve 24 saatlik CM (250 pg/ml TNF α) uygulaması yapılarak, oksidatif stres genlerinin mRNA düzeylerindeki değişimler araştırılmıştır. 24 saat CM uygulaması sonucunda, pro-oksidanlar Quiescin Q6 (QSCN6) ve Ecto-NOX disulfide thiol exchanger 2 (ENOX2) düzeylerinin sırasıyla 2.7 ve 1.3 kat arttığı bulgulanmıştır. Antioksidan regüle edici glutathione peroxidase-2 (GPX2)'nin 6.2 kat arttığı, ancak glutathione peroxidase-3 (GPX3) ve peroxiredoxin-6 (PRDX6)'nın 12.5 ve 2.4 kat azaldığı belirlenmiştir. Antioksidan superoxide dismutase-1 (SOD1) geninin mRNA seviyesinin 1.5 kat azalmakta olduğu ve superoxide dismutase-2 (SOD2)'nin 2.3 kat arttığı görülmüştür (Şekil 4.2A). NKX3.1 seviyesinde de 30 kat azalma saptanmış ve bu dramatik düşüşün hem sitokin maruziyeti hem de AR kaybına bağlı transkripsiyonel baskılanmadan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak, inflamasyon ve oksidatif stres varlığı, oksidatif stres regülatörü genlerin ekspresyon seviyelerinde önemli değişikliklere (pro-oksidanların seviyesinde artış ve bazı antioksidanların seviyesinde azalma) neden olmaktadır.

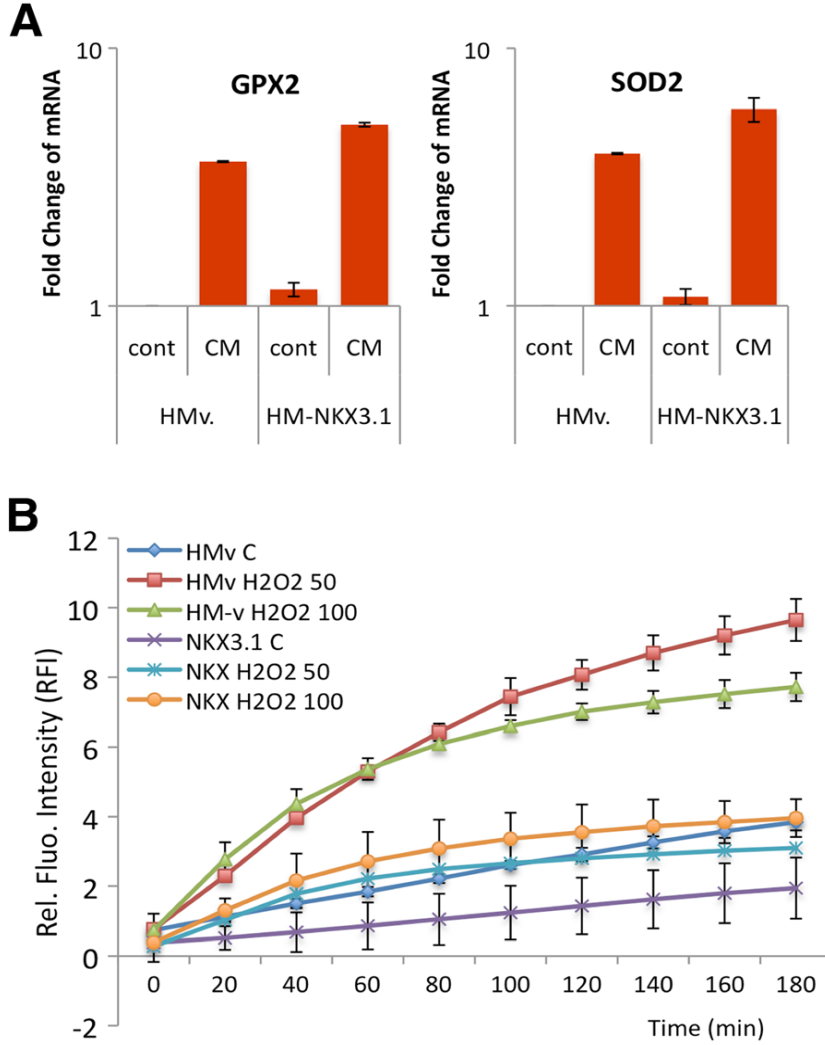
Oksidatif regülatörlerin transkripsiyonel değişimlerinin androjenlerle regüle olan NKX3.1 kaybına bağlı olup olmadığını anlamak amacıyla, NKX3.1 ekspresyonu siRNA kullanılarak baskılanmış ve elde edilen mRNA seviyesi değişiklikleri 2 gruba ayrılarak açıklanmıştır. İlk gruptaki genler, ekspresyon değişiklikleri, CM uygulaması sonucu oluşan değişikliklerle uyumlu olanlardır. İkinci grup ise, sadece NKX3.1 yokluğunda değişim gösterip CM uygulaması ile benzer değişim göstermeyen gen grubunu oluşturmaktadır. İkinci grup genlerde NKX3.1 yokluğuna bağlı olarak ENOX2 seviyesinde 3.7 kat artış ve SOD2'de 2.5 kat azalma belirlenmiştir. Birinci grup genlerden GPX2'nin mRNA seviyesi 5.6, QSCN6'nın 1.9 kat artmış, ancak GPX3 (2.4 kat), PRDX6 (2 kat) ve SOD1 (2.5 kat) mRNA seviyeleri azalmıştır (Şekil 4.2B ve C). Ayrıca, kontrol amacıyla, NKX3.1 protein seviyesindeki azalma da Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Elde edilen verilerin doğrulanması için, basal NKX3.1 seviyesine ek olarak, ektopik NKX3.1 ekspresyonu gerçekleştirildiğinde, antioksidanlardan GPX2'nin mRNA seviyesindeki değişim 3.7'den 5.1 kata ve SOD2'nin ise 3.8'den 5.9 kata artış göstermiştir (Şekil 4.3A).

Ayrıca, antioksidan yanıt faktörlerinin gen ekspresyonlarında NKX3.1'e bağlı değişim gözlemlendiğinden, hücrelerde intraselüler ROS seviyesindeki değişimin etkisi de araştırılmış ve H₂O₂ (50 and 100 µM) uygulaması sonucundaki intraselüler ROS seviyesi DCFH yöntemi ile ölçülmüştür. H₂O₂ uygulaması ile artan intraselüler ROS seviyesinin basal ve ektopik NKX3.1 ekspresyonu ile baskılandığı gösterilmiştir (Şekil 4.3B). Sonuç olarak, androjenlerle regüle olan NKX3.1'in, prostat hücrelerindeki oksidatif stres ve inflamasyon koşullarında, antioksidan yanıtın düzenlenmesinde gerekli bir transkripsiyon faktörü olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.2: NKX3.1 susturulmasıyla oksidatif stres regülatörü genlerin ekspresyonunda bozulma. A. LNCaP hücrelerinde 3, 6 ve 24 saatlik CM (250 pg/ml TNFα içeren) uygulaması sonucunda antioksidan yanıt enzimlerinin gen ekspresyonu değişimleri. Pembe ve yeşil renkler sırasıyla pro- ve anti-oksidan enzimleri ifade etmektedir. B. NKX3.1 susturulması sonucundaki değişimleri CM (250 pg/ml TNFα içeren, 24 saat) uygulaması ile korelasyon gösteren genler. C. NKX3.1 susturulması sonucundaki değişimleri CM uygulaması ile korelasyon göstermeyen genler. Kırmızı ve yeşil çubuklar sırasıyla mRNA düzeyi artışı ve azalışını göstermektedir. Western blot sonucu,

NKX3.1 susturulması sonucunda azalan protein düzeyinin kontrolü amacıyla gösterilmiştir.



Şekil 4.3: NKX3.1 ekspresyon artışı ile oksidatif stres düzeyinin baskılanması. Kontrol pcDNA4-HM ve HM-NKX3.1 vektörlerinin transfeksiyonu madde uygulamalarından 24 saat önce yapılmıştır. A. Antioksidan GPX2 ve SOD2 ekspresyonları NKX3.1 ekspresyon artışıyla yükselmesi. B. H₂O₂ ile indüklenen hücre içi ROS düzeyinin ektopik NKX3.1 ekspresyonu ile baskılanması, $p < 0.001$.

4.3. Oksidatif stres ve inflamatuvar koşullarda SIRT1 aracılıklı oksidatif stres direnci gelişimi

DNA, protein ve yağlardaki hasar birikimi, hücre içi ROS süpürme yeteneğindeki azalma ve bunu takiben oksidatif stres düzeyindeki artışın sonucu

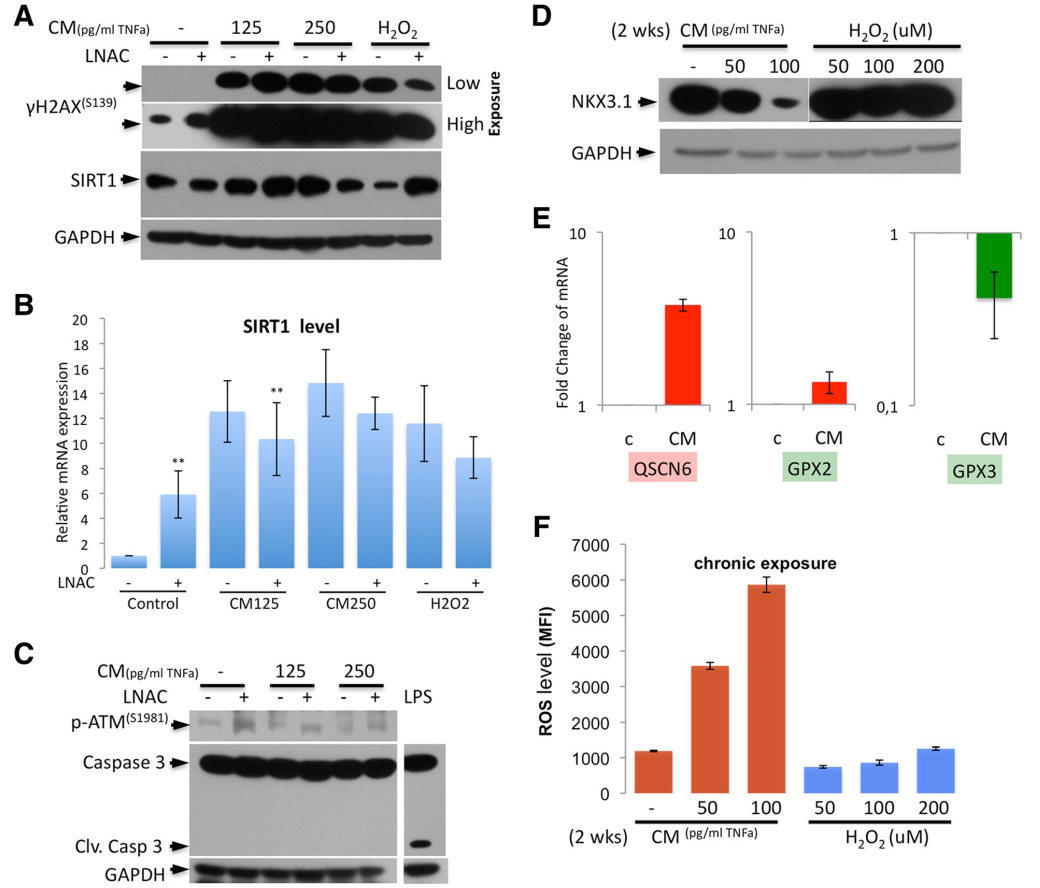
olarak gerçekleşir. Hücre içi oksidatif toleransın kaybı yaşa bağlı olduğu üzere, hücredeki DNA hasarı onarım kapasitesi ve metabolik düzensizlikle de ilişkilidir.

İleri evre prostat kanserlerinde, p53 sıklıkla tamamen kaybolmuş yada mutant formda bulunabilmektedir. Bu nedenle, başka tümör baskılayıcılar da hücredeki proliferasyon ve apoptoz mekanizmasının kontrolünde rol alırlar. p53 stabilitesinde asetilazlar aracılığıyla gerçekleşen hiperasetilasyon, p53'ü aktive ederek apoptoz ve hücre döngüsünün durdurulmasına neden olmaktadır. SIRT1 tarafından deasetilasyonu ise, p53'ün übikülin mekanizması aracılığıyla parçalanmasını artırmaktadır (Debeleç-Bütüner et al., 2015). Bu nedenle, SIRT1 aktivasyonundaki artışın, oksidatif stres ve inflamasyon koşullarında DNA hasarı yanıtının aktive edilememesi durumunda, genetik heterojenitede artışa neden olacağı düşünülmüştür. Yüksek SIRT1 ekspresyonu, prostat kanserinde sıklıkla görülen bir durum olduğundan, çalışmamızda oksidatif stres ve inflamasyon koşullarındaki DNA hasarı düzeyi ve sonrasındaki hasar yanıtı ve SIRT1 aktivasyon düzeyleri de araştırılmıştır.

LNCaP hücrelerinde, CM ve H₂O₂ uygulaması sonucunda DNA hasarının göstergesi olan γ -H2AX(S139) seviyesinin yükseldiği ancak CM ile indüklenen DNA hasarının LNAC ile bazal seviyelere indirilemediği, H₂O₂'da ise kısmi bir inhibisyon olduğu saptanmıştır. SIRT1 ekspresyonunun CM uygulamasıyla arttığı ancak H₂O₂'da değişmediği gözlenmiştir. Antioksidan LNAC uygulamasının ise, ROS oluşumunu azaltması nedeniyle SIRT1 ekspresyonunu indüklediği saptanmıştır (Şekil 4.4A). Artan DNA hasarına karşın, H₂O₂ uygulaması ile temsil edilen oksidatif stres koşullarında SIRT1'in baskılanmış, ancak CM ile temsil edilen inflamasyon koşullarında artış göstermiştir. Bizim hipotezimize göre SIRT1 inflamatuvar koşulları altında upregüle olur ve ayrıca kontrol mekanizmaları protein stabilizasyonunu etkiler çünkü SIRT1 mRNA seviyesi, SIRT1 protein seviyesi ile ilişkilidir (Şekil 4.4B). SIRT1, oksidatif stres toleransı altında metabolik hız ve oksidatif seviyesini algılayan önemli metabolik regülatördür. Bu nedenle, inflamatuvar mikroçevrede artan DNA hasarına karşın hasar yanıtının aktive olup olmadığı incelenerek, CM uygulaması sonucunda p-ATM(S1981) düzeyinde artış olmadığı, LNAC uygulamasının ise yalnızca kontrol hücrelerinde p-ATM(S1981) fosforilasyonunu indüklediği ancak CM varlığında

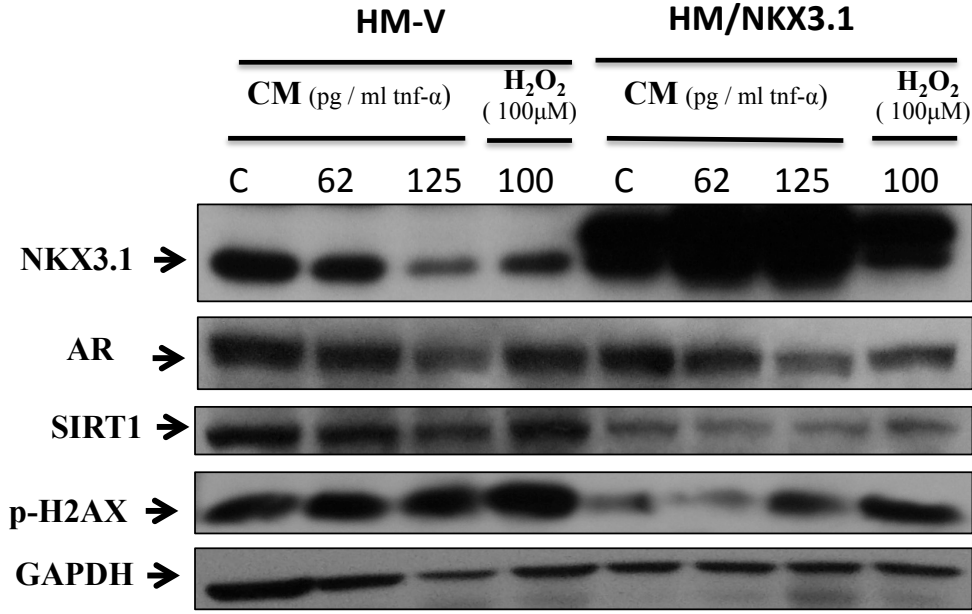
etkin olmadığı ve sonuç olarak DNA hasarı yanıtının aktifleşmediği gözlenmiştir. Ek olarak, hücrelerin inflamasyon durumundaki en son yanıtını da incelemek amacıyla apoptoz düzeyine bakılmış ve kaspaz-3 parçalanmasında/kesilmesinde artış olmadığı saptanmıştır. LPS ile indüklenen kaspaz-3 kesimi ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 4.4C). Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, CM uygulaması sonucunda, DNA hasarının arttığı ancak hasar yanıtının aktive olamaması nedeniyle hasarlı hücrelerin hücre döngüsünde ilerlediği ve böylece genetik heterojenitenin arttığı sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, yalnızca oksidatif stres koşullarının SIRT1 aracılıklı oksidatif direnç gelişiminde yeterli olmadığı düşünülerek, inflamatuvar mikroçevrede artan oksidatif DNA hasarının neden olduğu NKX3.1 yokluğu ile ilişkilendirilerek, aktive olamayan onarım mekanizması nedeniyle DNA hasarlarının daha yüksek seviyelerde kalıcı olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu durum, kanser gelişiminde sıklıkla gözlenen, oksidatif stres toleransı oluşumuyla örtüşmektedir.

Ayrıca, LNCaP hücrelerinde NKX3.1 ekspresyonuna bağlı SIRT1 aktivitesinin değiştiği gözlemlenmiştir. Hücrelere pcDNA4-HM ve HM-NKX3.1 vektörlerinin transfeksiyonu madde uygulamalarından 24 saat önce yapılmıştır. 24 saat sonunda CM 62 ve 125 pg/ml ve H₂O₂ 100µM 24 saat uygulanmıştır. Western-Blot sonuçlarına göre, AR seviyesinde önemli bir değişiklik olmaz iken SIRT1 seviyesi değişmiştir. Bu sonuca göre, metabolik aktivitede önemli değişikliklerin olabileceği düşünülmektedir (Şekil 4.5).



Şekil 4.4: İnflamatuar mikroçevrede artan DNA hasarına karşı oksidatif stres direnci

gelişimi. **A.** LNCaP hücrelerinde LNAC varlığında/yokluğunda, CM ve H₂O₂ uygulamaları sonucunda, DNA hasarı belirteci olan γ -H2AX^(S139) düzeyindeki artış ve metabolik regülatör SIRT1 düzeylerindeki değişim. **B.** LNCaP hücrelerinde SIRT1 mRNA ekspresyonunun CM ve H₂O₂ uygulaması ile değişimi. **C.** DNA hasarı yanıt mekanizması aktivatörü p-ATM^(S1981) düzeyindeki azalma ve apoptoz göstergesi kaspaz-3 kesiminin aktifleşmemesi, oksidatif DNA hasarına karşı hasar yanıt mekanizması ya da apoptozun aktive olmadığını göstermektedir. LPS (10 ng/ml) uygulaması sonucu, kaspaz-3 aktivasyonunun pozitif kontrolü olarak sunuldu. **D.** LNCaP hücreleri, 2 hafta süresince, H₂O₂ (50, 100 ve 200 μ M) içeren normal besi ortamı ve CM (50 ve 100 pg/ml TNF α içeren) ile beslendi ve NKX3.1 seviyesinin yalnızca kronik oksidatif stres koşullarında korunduğu ancak kronik inflammatuar koşullarda azaldığı saaptandı. **E.** Akut (24 saat) uygulamalara benzer biçimde, 100 pg/ml TNF α içeren kronik CM uygulaması sonucunda, QSCN6 ve GPX2 ekspresyonlarında artma, GPX3 düzeyinde ise azalma görüldü. Kırmızı ve yeşil çubuklar sırasıyla ekspresyon artışı ve azalışını ifade etmektedir. **F.** DCFA-DA kullanılarak yapılan ölçümü sonucunda, hücre içi ROS düzeyinin, kronik CM uygulaması sonucu yükseldiği ancak kronik H₂O₂ uygulaması sonucunda ise bazal seviyede kaldığı saptandı. Ölçümler 2 kez tekrarlandı.



Şekil 4.5: LNCaP hücrelerinde NKX3.1 aşırı ifadesi ve SIRT1 ilişkisi. LNCaP hücrelerine pcDNA4-HM ve HM-NKX3.1 vektörlerinin transfeksiyonu madde uygulamalarından 24 saat önce yapılmıştır.

4.4. Kronik oksidatif stres ve inflamasyon sonrasında antioksidan yanıt kaybı

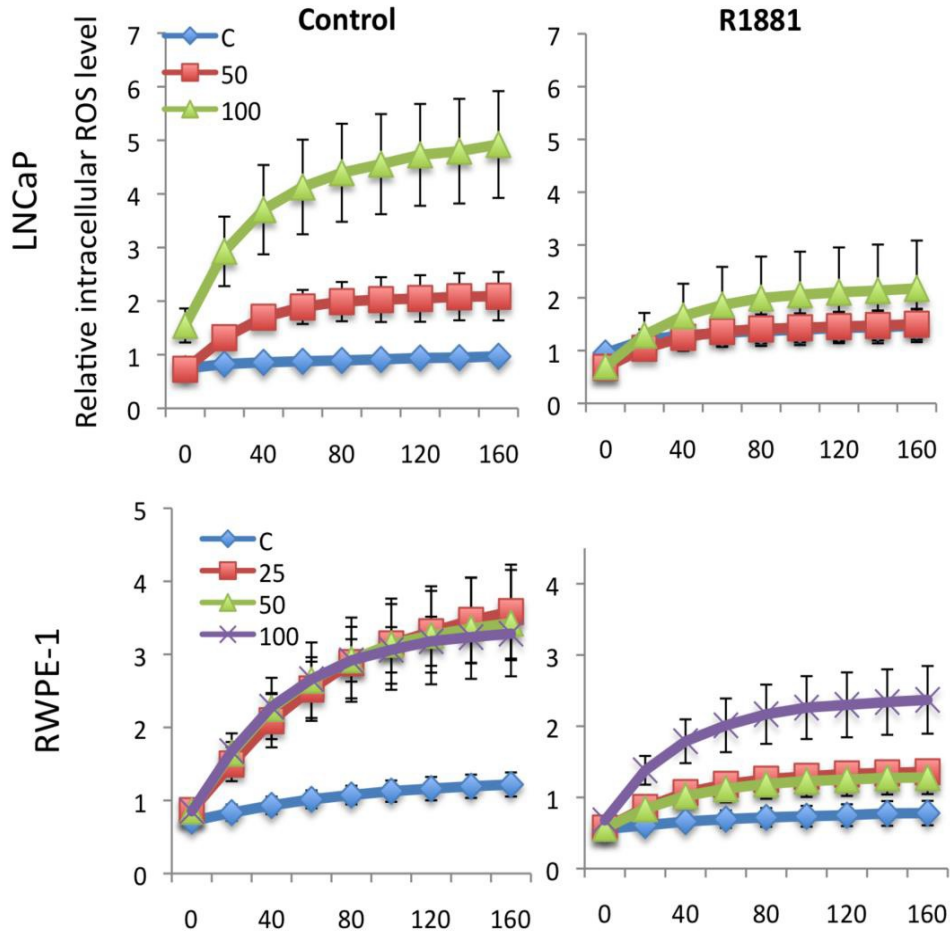
Uzun süreli oksidatif stres ve kronik inflamasyon durumunun kanserleşmeyi tetiklediği bilinmektedir. Çalışmamızda, *in vitro* olarak kronik oksidatif stres ve inflamasyon mikroçevresini taklit etmek amacıyla, LNCaP hücreleri, H₂O₂ (50, 100 and 200 μ M) içeren normal media ve CM (50 ve 100 pg/ml TNF α içeren) ile 2 hafta boyunca beslendi. NKX3.1'in degradasyon düzeyi incelendi ve artan CM konsantrasyonu ile korele olarak seviyesinin azaldığı ancak oksidatif stres koşullarında korunduğu gözlemlendi (Şekil 4.4.D). Ayrıca, antioksidan yanıtındaki değişim de araştırıldı ve 2 haftalık CM (100 pg/ml TNF α içeren) uygulaması sonucunda, pro-oksidan QSCN6 mRNA düzeyinin 3.8 kat, anti-oksidan GPX2'nin 1.3 kat (2'den az olduğu halde kronik maruziyet durumunda hücrelerin yaşamsal fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için, tümörjenik değişimlerin, çok büyük değil minimal moleküler değişimlerle tetiklenebileceği öngürülerek) arttığı belirlendi. Anti-oksidan GPX3 mRNA düzeyinin ise 2.5 kat azaldığı görüldü

(Şekil 4.4.E). Eşzamanlı olarak, 2 hafta boyunca H_2O_2 (50 ve 100 μM) ile kronik oksidatif stres maruziyeti sonucunda ise antioksidan yanıt faktörlerinin ekspresyon düzeyinde bir değişim görülmedi. Ek olarak, antioksidan yanıtta bozulma sonucunda hücre içi ROS seviyesindeki değişimi incelendiğinde, kronik CM uygulaması ve artan konsantrasyon ile uyumlu biçimde ROS artışı saptandı. Ancak, kronik H_2O_2 uygulaması sonucunda basal düzeye yakın kaldığı görüldü (Şekil 4.4.F). Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, prostat hücrelerinde, kronik oksidatif stres maruziyeti oluşturan ve antioksidan yanıtın bozulmasıyla sonuçlanan koşullarda, sitokin sinyalizasyonunun belirleyici faktör olduğu sonucuna varıldı.

4.5. Androjenler ve AR'ın hücre içi ROS seviyesine etkisi

Prostat kanseri tedavisi için kullanımdaki en yaygın yöntem olan anti-androjen tedavi stratejisinin, hücrenin oksidatif stres regülasyonunda bozulmaya ve başta tümörjenik olmak üzere hücresel ve metabolik değişimlere neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, androjen reseptörü işlev kaybının, androjen bağımsız/kastrasyon-dirençli prostat kanseri evresine geçişte, önemli roller üstlendiği kabul edilmektedir.

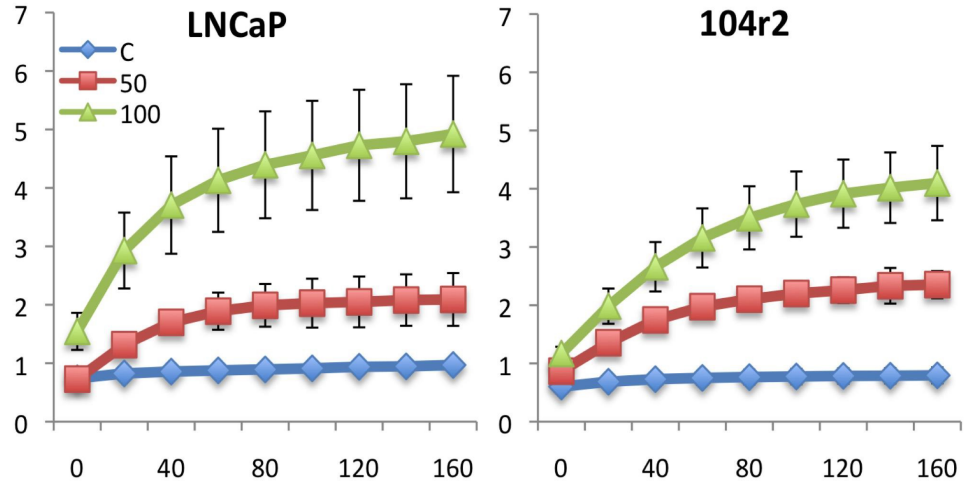
Androjen uygulaması ile AR aktivasyonunun, RWPE-1 normal prostat epitel hücre hattı ve LNCaP prostat kanseri hücre hattında hücre içi ROS seviyesine etkisi araştırılmıştır. 10^4 sayıda hücreye, 24 saat 10 nM sentetik androjen (R1881) uygulanarak, DCFH yükleme yapıldıktan sonra, R1881 varlığında /yokluğunda 50 ve 100 μM H_2O_2 uygulaması sonucu oluşan ROS düzeyi 3 saat boyunca gerçek zamanlı olarak kinetik florimetre ile ölçülmüştür. H_2O_2 konsantrasyonuna bağlı olarak artan ROS seviyesinin R1881 uygulaması ile azalarak gerilediği gözlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: LNCaP hücrelerinde androjenlere bağlı olarak anlamlı değişen hücre içi ROS seviyeleri ($p < 0.001$).

Sonuç olarak, oksidatif stres sonucu artan ROS seviyesinin androjenlere duyarlılık gösteren prostat kanseri hücrelerinde, androjen uygulaması ile baskılanmış olması androjen varlığının ve AR aktivasyonunun antioksidan yanıt üzerindeki rolünü ortaya koymaktadır.

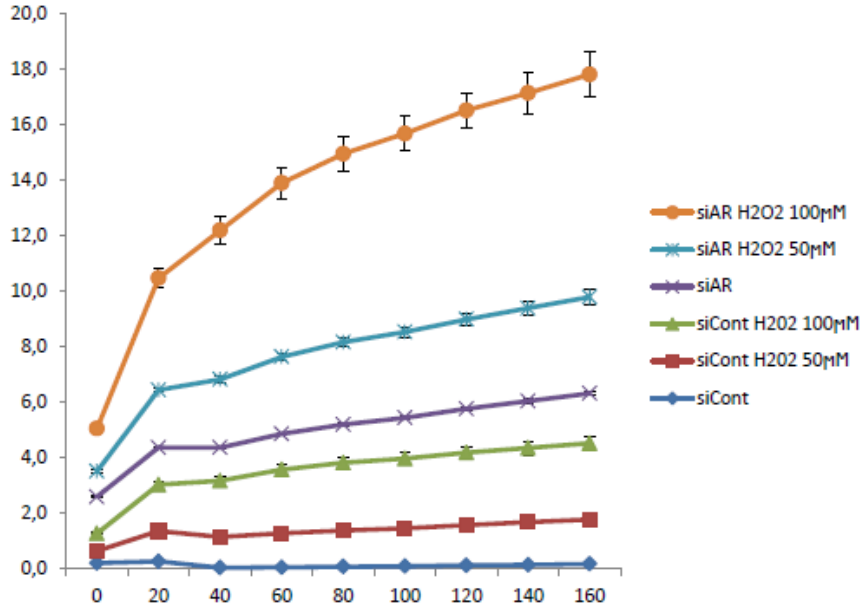
Ayrıca, LNCaP hücreleri ile bu hücrelerden türetilmiş, androjen bağımsız LNCaP 104r2 hücrelerinin hücre içi ROS seviyesi karşılaştırıldığında, bazal seviyede ve düşük oksidatif stres düzeyinde fark bulunmadığı, ancak yüksek oksidatif stres maruziyetinin, androjen bağımsız hücreler tarafından daha iyi tolere edildiği gözlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: LNCaP ve LNCaP 104r2 hücrelerinde H₂O₂ uygulamasına bağlı olarak değişen hücre içi ROS seviyeleri karşılaştırılmıştır (p<0.001).

4.6. Androjen reseptörü fonksiyon kaybının ROS oluşumu ve Oksidatif DNA hasarına etkisi

Androjen reseptörü fonksiyon kaybının hücre içi ROS seviyesine etkisi araştırılmıştır. LNCaP hücrelerine, 24 saatlik siAR transfeksiyonu yapılmış, sonra 50 ve 100 μ M H₂O₂ uygulaması sonucundaki ROS düzeyi 3 saat boyunca ölçülmüştür. ROS seviyesinin H₂O₂'nin konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı ve bu artışın AR yokluğunda daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8). Bu nedenle, ROS seviyesinin sadece AR susturulması durumunda da artmış olması, AR sinyalizasyonun hücrenin oksidatif solunum kaynaklı ROS oluşumun kontrolünde rol oynadığını göstermektedir.

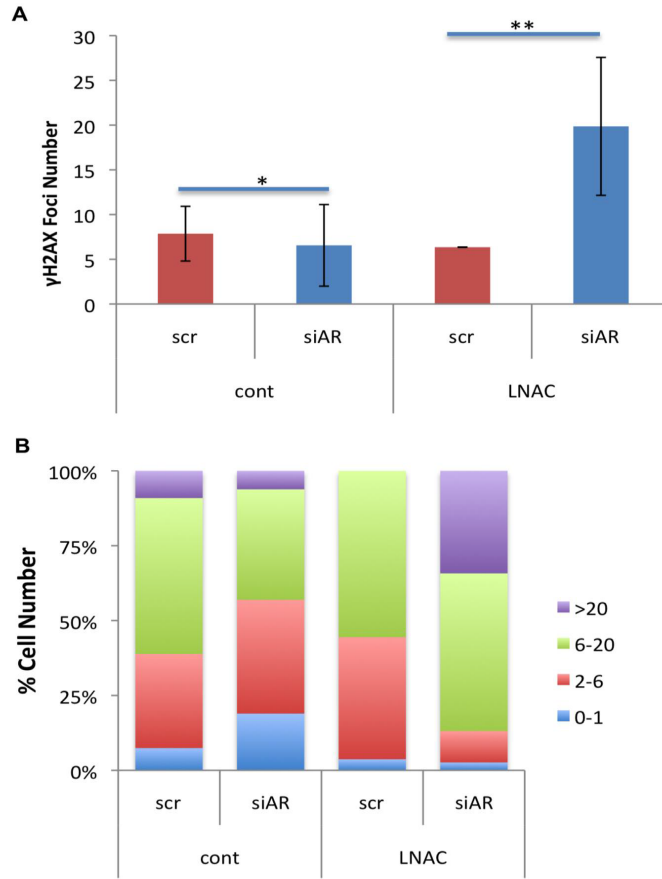


Şekil 4.8: LNCaP hücrelerinde, AR fonksiyon kaybının hücre içi ROS düzeyine etkisi.

24 saat AR susturulması ve H₂O₂ (50 ve 100 µM) uygulamaları sonucunda DCFH yöntemi ile florimetrede ölçüldü. Her 20 dakikada, ROS düzeyini gösteren relatif floresans değeri kaydedildi. siRNA: Kontrol siRNA, siAR: Androjen reseptörü siRNA . p<0.001

4.7. Androjenler ve AR'ın DNA hasarına etkisi

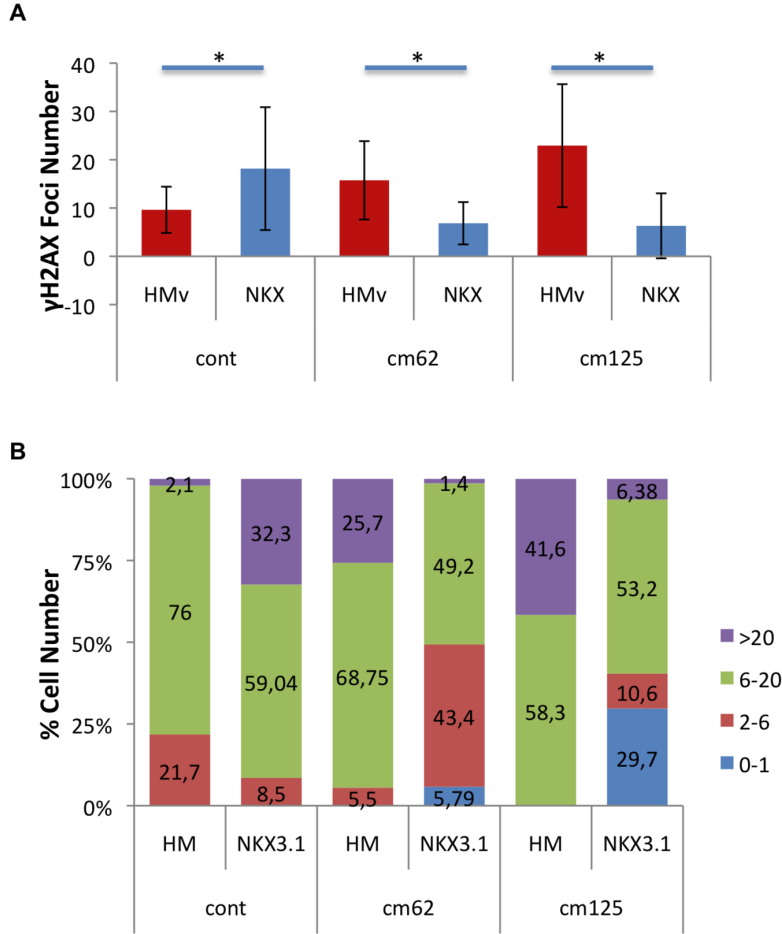
AR yolağının oksidatif DNA hasarı üzerindeki etkisi, AR ve AR'ın transkripsiyonel kontrolündeki tümör baskılayıcı NKX3.1'in yokluğu durumlarında da araştırılmıştır. LNCaP hücrelerinde siAR transfeksiyonu aracılığıyla AR seviyesi azaltılmış, antioksidan (LNAC) yokluğunda/varlığında ortalama γH2AX^(S139) odak sayısı analizi yapılmıştır. AR seviyesi azaltılmış olan her bir hücrede ortalama odak sayısının azaldığı, ancak antioksidan LNAC ile arttığı saptanmıştır (Şekil 4.9A).



Şekil 4.9: A. AR ekspresyonunun baskılanmasıyla değişmeyen ancak LNAC uygulamasıyla artan DNA hasarı. B. γ -H2AX odak bulunduran hücreler odak sayılarına göre gruplanarak AR etkisine bağlı oran değişiklikleri gösterilmiştir (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.8. Androjenlerle regüle olan NKX3.1'in DNA hasarı oluşumu üzerindeki etkinin araştırılması

AR'ın DNA hasarı üzerindeki etkisine NKX3.1'in rolünü belirlemek amacıyla, inflamatuvar mikroçevrede, NKX3.1'in DNA hasarı oluşumu üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, LNCaP hücrelerinde NKX3.1 ekspresyonu artırılmış ve inflamatuvar besi ortamı uygulamasıyla ortalama γ H2AX^(S139) odak sayısı analizi yapılmıştır. İnflamasyon durumunda artan odak sayısının, NKX3.1'i yüksek miktarda eksprese eden hücrelerde baskılandığı saptanmıştır (Şekil 4.10.A). Bunun yanında, inflamasyon koşullarında, yüksek sayıda odak taşıyan % hücre sayısı oranında da, NKX3.1 ekspresyonuna bağlı olarak azalma olduğu görülmüştür (Şekil 4.10.B).

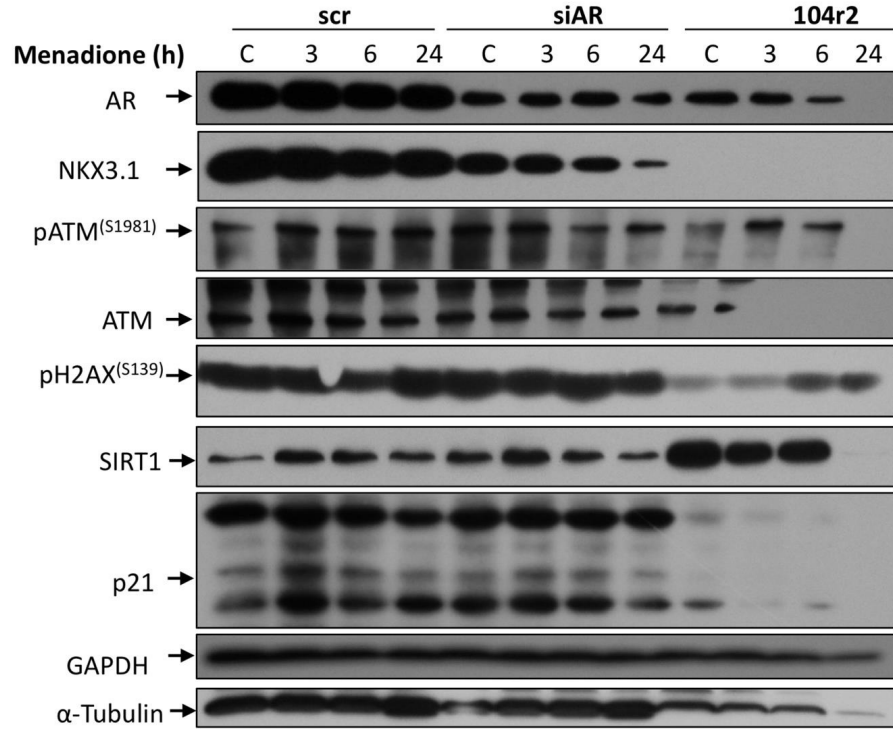


Şekil 4.10: NKX3.1 ekspresyonu ile artan oksidatif stres düzeyinde artan DNA hasarı. A. Kontrol pcDNA4-HM ve HM-NKX3.1 vektörlerinin transfeksiyonu CM uygulamalarından 24 saat önce yapılmıştır. B. Aklides sistemi ile γ -H2AX odakları bulunduran hücreler, odak sayılarına göre gruplanarak NKX3.1 etkisine bağlı oran değişiklikleri belirlenmiştir. (* $p < 0.05$).

4.9. Androjen yolağının Oksidatif stres ile DNA hasarı yanıtındaki etkisinin araştırılması

Androjen yolağının, oksidatif stres koşullarında DNA hasarı yanıtındaki etkisini araştırmak amacıyla, LNCaP (androjen duyarlı) ve LNCaP/104r2 (androjen-bağımsız) hücrelerinde AR susturulması ardından 3, 6 ve 24 saat 50 μ M menadion uygulaması yapılarak, DNA hasarı yanıtına ilişkin proteinlerin ekspresyon değişimi incelenmiştir.

104r2 hücre hattında AR ekspresyonunun LNCaP hücrelerine göre daha düşük olduğu, NKX3.1 ekspresyonunun ise tespit edilebilir düzeyde olmadığı saptanmıştır. DNA hasarı yanıtının aktivasyonunda ise pATM^(S1981) düzeyi, AR ekspresyonunun az olduğu hücrelerde artmıştır. 104r2 hücrelerinde bazal DNA hasarının LNCaP'lere göre daha düşük olduğu belirlenmiş, SIRT1 seviyesinin AR susturulmasına bağlı olarak arttığı, 104r2 hücrelerinde ise bazal seviyesinin LNCaP'lere göre oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak, 3 saatlik menadion uygulamasında AR pozitif hücrelerde p21 aktivasyonu görülürken, AR susturulan hücrelerde p21 seviyesinin değişmediği, AR pozitif fakat duyarlı olmayan 104r2 hücrelerinde ise p21 ekspresyonunun bazalda dahi düşük seviyede olduğu saptanmıştır (Şekil 4.11).

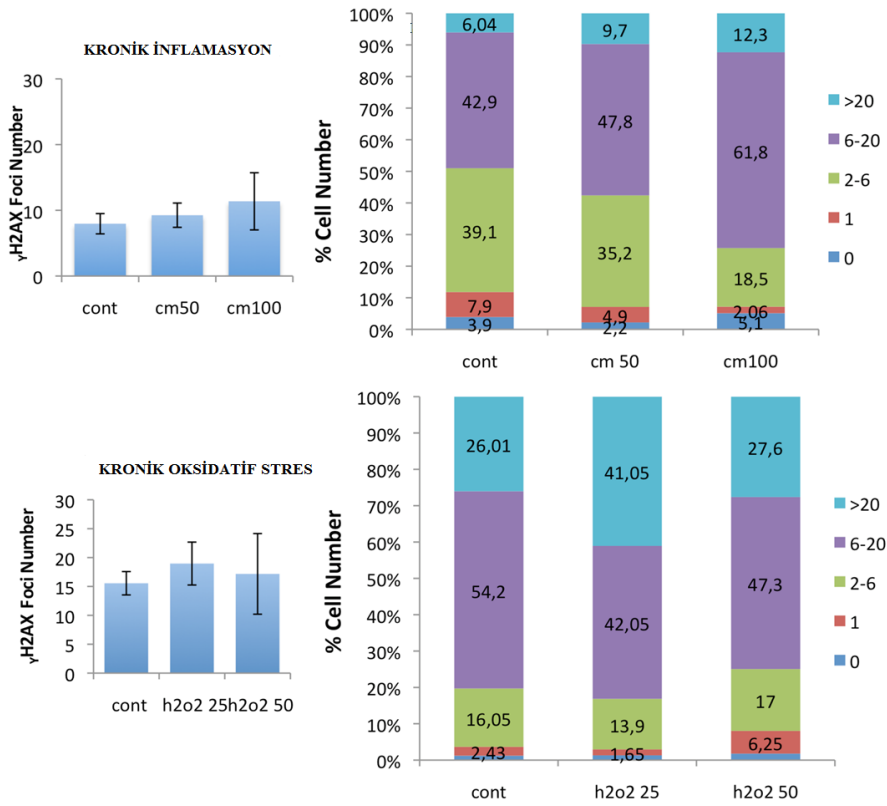


Şekil 4.11: LNCaP ve 104r2 lerde AR susturulması ardından 3, 6 ve 24 saat 50 mM menadion uygulamasına bağlı proteinlerin ekspresyon değişimi.

4.10. Kronik inflamasyon ve oksidatif stres durumunda DNA hasarı yanıtı

Kanserleşme sürecindeki moleküler değişimlerin kronik inflamasyon ve oksidatif stresle ilişkili olduğu varsayımlandığından, çalışmalarımızda mikroçevreyi hücre kültüründe modellemek amacıyla görece düşük dozda oksidatif indükleyici (H_2O_2 25, 50 ve 100 μM) ya da inflamatuvar ortam (50 ve 100 pg/ml TNFa içeren inflamatuvar ortam/CM) 2 hafta süreyle hücrelere uygulanmıştır.

Bu model kullanılarak, DNA hasarı üzerinde görülen etkilerin, LNCaP hücrelerinde kronik inflamasyon ve oksidatif stres koşullarında da test edilmesi amacıyla ortalama $\gamma H2AX^{(S139)}$ odak sayısı analizi yapılmıştır. Kronik maruziyet durumunda, hem odak sayısının hem de yüksek sayıda odak taşıyan hasarlı hücre oranının arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: LNCaP'lerde 2 hafta süreyle H_2O_2 ve CM (50 ve 100 pg/ml TNFa içeren inflamatuvar ortam/CM) uygulamasına bağlı $\gamma H2AX$ odak oluşumu değişimi.

5. TARTIŞMA

Prostat kanseri, batılı ülkelerde karşılaşma sıklığı yüksek olan ve erkeklerde en sık görülen kanserlerdendir. 1979 yılında Wang ve arkadaşları prostat dokusuna özgü yeni bir antijenik molekül olan Prostat Spesifik Antijen (PSA)'yı tanımlamışlardır. Daha sonraki çalışmalarda, PSA düzeyindeki artışın prostat kanseri tanımlanmasında kullanılabilmesi amacıyla, PSA seviyesindeki artışın prostat kanserini öngörebileceğini, bu artışa prostat kanseri dışında neden olabilecek faktörlerin olup olmadığı araştırma konusu olmuştur (Abate-Shen and Shen, 2010). İleriki çalışmalarda, vücutta meydana gelen doku hasarı ve/veya enflamasyona neden olabilecek diğer durumların histopatolojik değişikliklere neden olduğu (Chrns et al., 2013), bu nedenle enflamatuvar prostat hastalıkları ile PSA ve prostat kanseri arasında bir ilişki olabileceği düşünülmüş ve araştırılmaya başlanmıştır (Chrns et al., 2013). Prostat kanseri nedeni ile cerrahi tedavi alan hastalardan alınan doku örneklerinde yapılan patolojik incelemelerde, tümör tarafından infiltre edilmemiş bölgelerde, multifokal akut ve kronik enflamasyon alanları gözlenmiştir. Bu çalışmalarla, kronik enflamasyonun karsinogenez oluşumuna etkisinin bulunduğu ve erişkinlerde görülen kanserlerin %20' inde etiyolojik faktör olarak sorumlu tutulabileceği sonucuna varılmıştır (Chrns et al., 2013).

Tümörleşme sürecinde görülen artan enerji ve oksijen tüketiminin bir sonucu olarak artan oksidatif baskı nedeniyle, ayrıca antioksidanlar (vitamin C, vitamin E vb.) ve antioksidan enzimlerin (glutasyon, süperoksit dismutaz vb.) seviyesindeki azalmalarla ilişkili olarak reaktif oksijen türlerinin seviyesindeki artışa, dolayısıyla oksidatif strese neden olur (Ripple et al., 1997).

Oksidatif stres prostat karsinogenezinde, başlama, gelişme ve ilerleme olarak tanımlanan 3 basamağın tümüne de katkı sağlar. Bu etki, başlangıç aşamasında reaktif oksijen türleri tarafından yaratılan DNA hasarı olarak başlar, gelişme aşamasında anormal gen ifadesi ve sinyal iletimi, ilerleme aşamasında DNA hasarının sürekli tetiklenmesi ile genomik kararsızlık olarak ortaya çıkar (Acharya et al., 2010).

Prostat kanserinin tedavisinde uygulanan androjen ablasyonu tedavisi/antihormon tedavisi organ içi sınırlarda olan andenokarsinomun gerilemesine neden olmakta, ancak sonrasında sıklıkla hormona dirençli tümörlerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu evreye erişen tümörlerin tedavisi için ise etkin bir yöntem bulunmamaktadır. Anti-hormon tedavilerinden beklenen yararların elde edilemediği günümüzde, kombine tedavi protokollerinde bazı diğer antikanser moleküllerin kullanımlarına da başvurulmuştur. Ancak bu moleküllerin birçoğu etkilerini DNA hasarı üzerinden veya yaşam yollarının baskılanması ile göstermektedirler. Kullanılan birçok bileşik (topoizomera inhibitörlerinden doksorubisin, etoposid, naftakinonlar, antrakininonlar ve diğer bileşikler) reaktif oksijen oluşumunu (ROS) tetiklemekte ve oksidatif hasara neden olmaktadır. Bu durum başlangıçta tümörlerin gerilemesine neden olurken, daha öncede belirtildiği üzere artan ROS seviyesinin tolere edilmesine ve heterojen hücre gruplarından dirençlilerin ortaya çıkmasına katkıda bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasının ilk bölümünde, enflamatuar ortamda sitokinlerin mi yoksa oksidatif stresin mi temel faktör olduğunu belirlemek amacıyla deneyler yapıldı. Bu bağlamda, CM ve H₂O₂ uygulamaları ile AR, NKX3.1 ve p53 seviyeleri incelendiğinde, antioksidan uygulama ile inflammatuar koşullardaki AR ve NKX3.1 yıkımının baskılanmadığı, sitokinlerin AR ve NKX3.1 yıkımından sorumlu olan temel faktör olabileceği sonucuna varılmıştır. Ancak, H₂O₂ varlığında AR ve NKX3.1 yıkımlarının, antioksidan olan LNAC ile tamamen baskılanmadığı belirlendiğinde, yıkıma neden olan faktörlerin etkilerinin sitokin ve ROS sinyalizasyonu arasındaki etkileşimden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Inflamatuar mikroçevre çalışmalarımızda, daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen veriler ile homolog rekombinasyonel onarım mekanizmasının aktivasyonu için gerekli olan ATM^(S1981)'in fosforilasyonlarının NKX3.1 ile arttığı, bu nedenle kaybının önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Hücrede S fazında gerçekleşen DNA hasarının ATM aracılıklı tanınmasında önemli olan NKX3.1'in inflammatuar sitokin ve ROS varlığında oluşan proteosomal degradasyonları sonucundaki kaybı prostat hücrelerinin DNA hasarına karşı oluşturduğu yanıtı azaltmakta ve oksidatif hasar sonucu hücrenin ölümünü geciktirerek oksidatif tolerans seviyesinin artmasına neden olmaktadır.

Androjenlerle transkripsiyonu düzenlenen NKX3.1'in varlığında oksidatif seviye düzeyi hücrede düşük tutulmakta, hücrelerin metabolik olarak SIRT1 aktivasyonu aracılığıyla DNA hasar tanıma yetenekleri daha yüksek seviyelerde gerçekleşerek, hücreler yaşam döngüsüne devam etmektedirler. Bu kontrollü durum, inflamatuvar mikroçevre oluşumu nedeniyle NKX3.1 kaybına bağlı olarak değişmekte ve

- 1) oksidatif toleransın azalmasına,
- 2) SIRT1 aktivasyonunun azalarak metabolik kontrolün ortadan kalkmasına,
- 3) ATM aracılığıyla DNA hasarının onarımının gerçekleştirilememesine ve DNA hasarının birikmesine neden olmaktadır.

Prostat hücreleri büyüme işlevleri ve çoğalmaları için androjenlere bağımlıdır. Ayrıca, AR prostat gelişimi ve fizyolojisinde önemli düzenleyicilerden biridir. AR yolağının öneminden dolayı bu yolağın aktivasyonundaki değişimler PCa gelişimine/ilerleyişine potansiyel olarak katkı sağlar. Prostat kanseri tedavisi için kullanımdaki en yaygın yöntem olan anti-androjen tedavi stratejisinin, hücrenin oksidatif stres regülasyonunda bozulmaya ve başta tümörijenik olmak üzere hücresel ve metabolik değişimlere neden olduğu bilindiğinden, oksidatif stres AR sinyalizasyonundaki değişikliklere neden olan birçok yolda etkili olabileceği, bu değişikliklerin bir sonucu olarak AR sinyalizasyonunun oksidatif stres ve sitotoksik durumlarda anti-apoptotik etki göstererek prostat kanserli hücrelerin yaşamasını teşvik edebileceği sonucuna varılmıştır.

Yapılan araştırmalar androjen reseptörü işlev kaybının androjen bağımsız/kastrasyon-dirençli prostat kanseri evresine geçişte önemli roller üstlendiğini göstermiştir. Ancak, son yıllarda yürütülen araştırmalar, kronik enflamasyon sonucunda oluşan ROS'un kanserleşme süreci ile arasında bir bağlantı olabileceğini işaret etmekte olup, ROS üretimi karşısında doğru hücresel yanıtın üretilmesinin hücrelerin canlılığının devamı açısından kritik olduğunu göstermiştir. Herhangi bir hücrede tolere edilebilir seviyeden daha fazla hasar oluştuğunda, bu hücrenin apoptotik yolların aktivasyonu aracılığıyla ortadan

kaldırılmasının, evrimsel anlamda yakın mikroçevredeki diğer hücrelerin yararına yaşamsal avantaj sağladığını düşündürmüştür.

Bu çalışmalarda, tümör gelişimine neden olan önemli transkripsiyon faktörlerinin enflamatuvar hücrelerin varlığında ROS üretmelerine yardımcı oldukları belirlenmiş, androjen duyarlı prostat hücre hatlarında oksidatif stres sonucu artan ROS seviyesinin androjen uygulaması ile önemli oranda baskılanmış olması, androjen varlığı ve AR aktivasyonunun antioksidan yanıt üzerindeki önemli rolünü göstermiştir. Ayrıca, H_2O_2 varlığında ROS seviyesi artarken AR yokluğunda bu seviyenin daha da yükselmekte olduğu bulgulanmıştır. Bu verilerden yola çıkarak, AR sinyalizasyonunun kaybı durumunda hücre içi ROS artışında önemli bir transkripsiyon faktörü olarak işlev gördüğü sonucuna varılmıştır. Sonuçta, antioksidantlar ile AR sinyalizasyonunun baskılanmasının mekanizmasının anlaşılması, prostat kanserinin tedavisine direnç gelişiminde (Kastrasyon dirençli prostat kanseri) umut vaat edici olabilir.

Bazı diğer çalışmalarda ROS'un tümör başlangıcındaki rolüne ilişkin olarak DNA hasarı yaratan temel neden olduğu ve mutasyon oranını arttırarak onkogenik transformasyona neden olduğu, yeni bulgulara göre; bazı özgül sinyal yollarını da aktive edebildiği ve bu şekilde hücrel çoğalmayı, anjiyogenezi ve metastazı aktive ederek tümör gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir.

Androjen ablasyon tedavisi gibi anti-androjen tedavilerin uygulandığı günümüzde tekrarlayan kanserlerden ve metastatik biçimlerinden korunabilmek için, kronik inflamasyon maruziyetindeki mikroçevre oluşumları daha iyi incelenmeli, moleküler değişikliklerin gerçek temelleri ortaya konulmalıdır. Prostat kanserinin oluşumu ve gelişiminde reaktif oksijen türleri ve inflamasyonun önemi araştırılmaya devam edilmeli, metabolik kontrol ve AR sinyalizasyonu arasındaki ilişki çalışılmalı, oksidatif stres ve AR sinyalizasyonu ile ilişkili sinyal iletim yolları araştırılmaya devam edilmeli, daha doğru tedavi seçenekleri belirlenmeye çalışılmalıdır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abate-Shen, C. and Shen, M. M.**, 2010, Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges, *Genes Dev*, 14(19), 2410-34pp.
- Acharya, A., Das, I., Chandhok, D. and Saha, T.**, 2010, Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential, *Oxidative Medicine And Celluler Longevity*, 3:1, 23-34pp.
- Balkwill, F.**, 2004, Cancer and the chemokine network, *Nature rev. Cancer*, Vol.4, 540-548p.
- Bostwick, D.G., Burke, H.B., Djakiew, D., Euling, S., Ho, S.M., Landolph, J., Morrison, H., Sonawane, B., Shifflett, T., Waters, D.J. and Timms, B.**, 2004, Human prostate cancer risk factors, *Cancer*, 101(10 Suppl), p2371-490.
- Chrons, M., Westermarck, T. and Atroshi, F.**, 2013, Prostate cancer, inflammation and antioxidants, *Advences in Prostate Cancer*, Chapter 17,1-22pp.
- Cohen, M.B. and Rohklin, O.W.**, 2009, Mechanisms of prostate cancer cell survival after inhibition of AR expression, *Journal of Celluler Biochemistry*, 106:363371pp.
- Cunha, G.R.**, 1994, Role of mesenchymal-epithelial interaction in normal and abnormal development of the mammary gland and prostate, *Cancer*, 47, 1030-1044pp.
- Debeleç-Bütüner, B., Alapınar, C., Varışlı, L., Erbaykent-Tepedelen, B., Hamid, S.M., Gonen-Korkmaz, C. and Korkmaz, K.S.**, 2012, İnflammation mediated abrogation of androgen signaling: an in vitro model of prostate cell inflammation, *Molecular Carcinogenesis*, 1-13pp.
- Debeleç-Bütüner, B., Ertunç, N. and Korkmaz, K.S.**, 2015, İnflammation contributes to NKX3.1 loss and DNA damage but does not alter the DNA damage response via increased SIRT1 expression, *Journal Of İnflammation*, 12:12, 1-9pp.
- Ergun, O. ve Koşar, A.**, 2010, Prostat kanseri ve kronik prostat ilişkisi, *S.D.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 17(3):28-31s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Feldman, B.J. and Feldman, D.**, 2001, The development of androgen-independent prostate cancer, *Nature Rev. Cancer*, 1(1), 34-45pp.
- Görgel, N.C., Özdamar, K.Y. ve Balci, U.**, 2011, Gleason skoru 3+4 ve 4+3 prostat kanseri olgularında preoperatif klinikopatolojik ve radyografik bulguların karşılaştırılması, *Yeni üroloji dergisi*, 6(3):6-10s.
- Grossmann, M.E., Huang, H. and Tindal, D.J.**, 2001, Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer, *Journal Of The National Cancer Institute*, vol. 93, No. 22.
- Guyton, K.Z. and Kensler, T.W.**, 1993, Oxidative mechanisms in carcinogenesis, *Br Med Bull*, 49(3), 523-44pp.
- Hallstrom, T.A.**, 2007, p53 and DNA damage checkpoint responses in the human prostate, Molecular and Cancer Biology Program, Biomedicum Helsinki, Department of Virology, Haartman Institute, University of Helsinki, Finland.
- İzmirli, M.**, 2010, Prostat kanserinin ELAC2 ve SRD5A genlerindeki polimorfizmler ile ilişkisinin araştırılması, Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 182s.
- Kaikkonen, S., Paakinaho, V., Sutinen, P., Levonen, A.L. and Palvimo, J.J.**, 2013, Prostaglandin 15d-PGJ₂ inhibits androgen receptor signaling in prostate cancer cells, *Mol. Endocrinol*, 27(2):212-223pp.
- Konishi, N., Shimada, K., Ishida, E. and Nakamura, M.**, 2005, Molecular pathology of prostate cancer, *Pathology International*, 55:531-539pp.
- Kuran, O.**, 1983, Sistematik anatomi, Filiz Kitabevi, İstanbul, 521-4s.
- Ma, Q.**, 2010, Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications, *Pharmacology And therapeutics*, 376-393pp.
- McEwan, I.J.**, 2004, Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain, *Endocrin-Related Cancer*, 281-293pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nelson, W. G., De Marzo, A. M., DeWeese, T. L. and Isaacs, W. B.,** 2004, The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer, *J Urol*, 172(5 Pt 2), 6-11p; discussion 11-2pp.
- Nguyen, D.P., Li, J. and Tewari, A.K.,** 2014, İnflammation and prostate cancer: the role of interleukin-6(IL-6), *BJU International*, 113:986-992p.
- Poelaert, F., Praet, C.V., Beerens, A.S., Meerleer, G.D., Fonteyne, V., Ost, P. and Lumen, N.,** 2015, The role of androgen receptor expression in the curative treatment of prostate cancer with radiotherapy: A pilot study, *Biomed Research International*, 1-8pp.
- Polat, Ö., Gül, O., Biçgi, O., Özbey, İ. ve Bayraktar, Y.,** 1997, Benign prostat hiperplazisi ve büyüme faktörleri, *Türkiye Ektopatoloji Dergisi*, 3(1-2):53-57s.
- Ripple, M.O., Henry, W.F., Rago, R.P. and Wilding, G.,** 1997, Prooxidant-antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells, *Journal Of the National Cancer Institute*, vol.89, No.1, 40-46pp.
- Schulz, W.A., Burchardt, M. and Cronauer, M.V.,** 2003, Molecular biology of prostate cancer, *Molecular Human reproduction*, Vol9, 437-448pp.
- Seketee, K.,** 2007, Molecular mechanisms of androgen receptor function, The Department of Pathology of the JosephineNefkens Institute, Rotterdam, The Netherlands.
- Sezer, K.,** 1980, Prostat ve hastalıkları, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 1-17s.
- Shiota, M., Yokomizo, A. and Naito, S.,** 2011, Oxidative stress and androgen receptor signaling in the development and progression of castration-resistant prostate cancer, *Free Radical Biology And Medicine*, 51, 1320-1328pp.
- Shiota, M., Yokomizo, A. and Naito, S.,** 2012, Pro-survival and anti-apoptotic properties of androgen receptor signaling by oxidative stress promote treatment resistance in prostate cancer, *Endocrine-Related Cancer*, 19, 243-253pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shiota, M., Song, Y., Takeuchi, A., Yokomizo, A., Kashiwagi, E., Kuroiwa, K., Tatsugami, K., Uchiumi, T., Oda, Y. and Naito, S.,** 2012, Antioxidant therapy alleviates oxidative stress by androgen deprivation and prevents conversion from androgendependent to castration resistant prostate cancer, *The Journal Of Urology*, vol. 187, 707-714pp.
- Staverosky, J.A., Zhu, X.H., Ha, S. and Logan, S.K.,** 2013, Anti-androgen resistance in prostate cancer cells chronically induced by interleukin-1 β , *Am J Clin Exp Urol*, 1(1), 53-65pp.
- Tan, P.Y., Chang, C.W., Chng, K.R., Wansa, K.D.S.A., Sung, W.K. and Cheunga, E.,** 2011, Integration of regulatory networks by NKX3.1 promotes androgen-dependent prostate cancer survival, *Molecular And Celluler Biology*, 399-414pp.
- Taverna, G., Peedretti, E., Di Caro, G., Barroni, E.M., Marchesi, F. and Grizzi, F.,** 2015, Inflammation and prostate cancer: friends or foe?, *Inflammation Research*, 64:275-286pp.
- Xu, B., Wanga, W., Guoa, H., Suna, Z., Weia, Z., Zhanga, X., Liua, Z., Tischfieldc, J.A., Gongga, Y. and Shaoa, C.,** 2014, Oxidative stress preferentially induces a subtype of micronuclei and mediates the genomic instability caused by p53 dysfunction, *Science Direct*, 1-8pp.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı: Nurşah ERTUNÇ

Uyruk: Türk (Türkiye Cumhuriyeti)

Doğum tarihi: 08/09/1988

Adres: Erzene mahallesi, 13.sok, Uncu apartmanı. 12/6, Bornova/İZMİR

İletişim numarası: 0090 554 475 17 86

Eğitim

Lisans: Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik opsiyonu (2007-2012)

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çok disiplinli anabilin dalı Biyoteknoloji programı (2012-2015)

Araştırma Deneyimleri

Yüksek lisans araştırması: Oksidatif DNA hasarı aracılıklı prostat kanseri gelişimine androjenlerin etkisinin araştırılması, *Kanser Biyolojisi laboratuvarı*, Biyomühendislik Bölümü, Ege Üniversitesi (2012-2015) (COST (European Cooperation in Science and Technology) tarafından desteklenmiştir).

Lisans araştırması: Biyoaktif küçük moleküller ve onların bitki hedefleri üzerine bir yapısal biyoloji perspektifi, Moleküler biyoloji ve genetik opsiyonu, Biyoloji Bölümü, Ege Üniversitesi (2011-2012).

Yaz Stajları

- Ege üniversitesi, Tıp fakültesi, Patoloji bölümü, *Kanser hastalarından alınan kemik iliği örneklerinin mikroskopik analizi*, 2011.
- Akdeniz Üniversitesi, Mikrobiyoloji Bölümü, *ELISA, Western-blot teknikleri ve genel mikrobiyoloji kültür metodlarının öğrenilmesi*, 2009.
- Akdeniz Üniversitesi, Biyokimya bölümü, Mikrobiyoloji bölümü ve Tıbbi

Biyoloji bölümünde rotasyonlu olarak, *genel biyokimya ve moleküler methodların öğrenilmesi*, 2008.

Yayınlar ve Poster Sunumları

- Debelec-Butuner B, Ertunc N, **Korkmaz KS**. Inflammation contributes to NKX3.1 loss and augments DNA damage but does not alter the DNA damage response via increased SIRT1 expression. **J Inflamm (Lond)**. 2015 Feb 15;12:12. doi: **10.1186/s12950-015-0057-4**.
- Debelec-Butuner B., Alapinar C., Gonen-Korkmaz C., Yorukoglu K., **Korkmaz KS**. Enhanced Akt activity stabilizes β -catenin and facilitates migration of prostate cells via disruption of E-cadherin association upon inflammation. **PLoS One**. 2014 Oct 31;9(10):e109868.
- *Poster sunumu, 1.hücre ölümü araştırma kongresi, Izmir, 2013; Role Of Nkx3.1 Protein Loss in Abrogated Oxidative Stress Regulation.*

Başarılar Ve Sertifikalar

- Hücre kültürü çalıştayında, organizasyon komitesi ve öğretici asistan, Hücre ölümü araştırma derneği, 2014
- Onur belgesi, Ege Üniversitesi, 2008, 2012
- Yüksek onur sertifikası, Ege Üniversitesi, 2009,2010
- International IX. IÜGEN Molecular Biology and Genetics Students Winter School Participation Certificate, 2012
- 3. Kök Hücre Sempozyumu, Ebitem, 2011
- International VIII. IUGEN Molecular Biology and Genetics Students Winter School Participation Certificate, 2011
- Ege University International 4. Molecular Biology and Genetics Research and Application Platform, 2010

Teknikler

- Hücre kültürü ve teknikleri
- SDS-page
- Agaroz-page
- İmmüno Floresan
- DNA&RNA izolasyonu
- Plasmid izolasyonu

- PCR
- RT-PCR
- Transfeksiyon

REFERANSLAR

Prof.Dr. **Kemal Sami Korkmaz**

ks_korkmaz@yahoo.com

Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi

Biyomühendislik bölümü, Kanser Biyolojisi Laboratuvarı, Bornova, İzmir.

Prof.Dr. **İsmail Türkan**

ismail.turkan@ege.edu.tr

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji bölümü, Bornova, İzmir.

