



**EGE ÜNİVERSİTESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANDROJEN RESEPTÖRÜNÜN OLASI  
HEDEFLERİNE BAĞLANMA DİNAMİĞİNİN  
ÇALIŞILMASI**

**Gülseren ÖZDUMAN**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi : 08.01.2019**

**Bornova-İZMİR**

**2019**

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**ANDROJEN RESEPTÖRÜNÜN OLASI  
HEDEFLERİNE BAĞLANMA DİNAMİĞİNİN  
ÇALIŞILMASI**

**Gülseren ÖZDUMAN**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi : 08.01.2019**

**Bornova-İZMİR**

**2019**



Gülseren ÖZDUMAN tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan "Androjen Reseptörünün Olası Hedeflerine Bağlanma Dinamiğinin Çalışılması" 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 08.01.2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oy çokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**Jüri Başkanı : Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ**

**Raportör Üye: Doç. Dr. Bünyamin AKGÜL**

**Üye : Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY**

**İmza**

*K. Korkmaz*  
*B. Akgül*  
*A. Nalbantsoy*



# EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Androjen Reseptörünün Olası Hedeflerine Bağlanma Dinamiğinin Çalışılması” 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 haklarımı 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.

08/01/2019

Gülseren Özdoğan



**ÖZET****ANDROJEN RESEPTÖRÜNÜN OLASI HEDEFLERİNE  
BAĞLANMA DİNAMİĞİNİN ÇALIŞILMASI**

ÖZDUMAN, Gülseren

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kemal Sami Korkmaz

08 Ocak 2019, 43 sayfa.

Normal prostat hücrelerine benzer şekilde prostat kanseri hücreleri, büyümek ve hayatta kalabilmek için androjenlere ihtiyaç duyar. Prostat kanserinin büyümesi, hücre çoğalması/hücre ölümü oranına bağlıdır. Prostat kanserinde, çoğalma oranı ölüm oranından daha yüksektir ve sürekli büyümeye neden olur. Androjenler ve AR bu oranın ana düzenleyicisidir. AR prostat gelişiminde ve karsinogenezde transkripsiyonel faktör olarak kilit rol oynamaktadır. AR'ın olası hedef genlere bağlanma dinamiğini araştırmak prostat kanserinde AR patofizyolojisini aydınlatmak için gereklidir. Bu amaçla bu tez çalışmasında nutlin3a varlığında p53 stabilizasyonunun AR'ın transkripsiyonel hedeflerine bağlanma dinamiği, hücre içi lokasyonunu nasıl etkilediği ve AR transaktivasyonu üzerindeki etkisi araştırıldı. LNCaP hücrelerine nutlin3a uygulanarak sağlanan p53 stabilizasyonunun AR yolağı üzerindeki etkisi western blot analizi yapılarak araştırıldı. AR transaktivasyonundaki değişimi araştırmak için nutlin3a'nın farklı dozları uygulanarak Lüsiferaz Reporter assay analizi yapıldı ve transaktivasyonunun düşük dozlarda baskılandığı anlaşıldı. AR transaktivasyonunun baskılanmasının translokasyondaki etkisini anlamak amacıyla immünofloresan deneyi ve sitoplazmik-nükleer fraksiyonlama sonrasında western blot analizi yapılarak araştırıldı ve nutlin3a'nın MDM2 aracıklı AR transaktivasyonundaki azalmanın sitoplazmik tutulumdan kaynaklandığı sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** Prostat kanseri, AR, nutlin3a, MDM2, p53



**ABSTRACT****STUDYING THE DYNAMIC BINDING OF AR INTO  
PUTATIVE TARGETS**

ÖZDUMAN, Gülseren

MSc in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Kemal Sami Korkmaz

Jan 08, 2019. 43 pages.

Prostate cancer cells need androgens to grow and maintain like normal prostate cells, both utilize that Androgen Receptor (AR) function. Androgen receptor AR is expressed throughout the prostate cancer progression plays a critical role as a transcription factor in castration-dependent stages of disease. AR also interacts to many cellular proteins, including p53, to regulate apoptosis. Further, as the stabilization of p53 protein triggers apoptosis, p53 interacting small molecules such as nutlin3a, are interpreted as cancer therapeutics. In this study, to find out how nutlin3a-mediated p53 stabilization effect on AR signaling. Here, we investigated the dynamics of p53 binding to transcriptional targets of AR, and further investigated the variations of AR intracellular localization as well as transactivation in the presence of nutlin3a. To do this, the changes in AR transactivation were investigated via luciferase reporter assay, which was performed by treating LNCaPs with different doses of nutlin3a and resulted that transactivation was suppressed by nutlin3a in a dose dependent manner. AR transactivation and sub-cellular localization were also studied by immunofluorescence assay and found that cytoplasmic-nuclear fractionation-coupled western blot analysis showed that nutlin3a inhibits AR phosphorylation and nuclear translocation regardless of androgens.

**Key words:** Prostate cancer, AR, nutlin3a, MDM2, p53



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışma konumun belirlenmesinde ve çalışmanın hazırlanma sürecinin her aşamasında bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan, bunların yanı sıra biz öğrencilerine laboratuvar dışında da zaman ayırıp destek olan, değerli danışman hocam Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ'a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi birikimini, ilgisini ve önerilerini göstermekten kaçınmayan sevgili Dr. Öğr. Üy. Bilge DEBELEÇ BÜTÜNER'e çok teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans eğitiminde birlikte yol aldığım, her türlü zorluğa birlikte göğüs gerdiğim sevgili dostum Elif İŞEL'e, çalışmalarım boyunca bana her zaman her konuda destek olan sevgili Dr. Bilge Esin ÖZTÜRK'e ve birlikte çalışmaktan keyif aldığım değerli arkadaşlarım Gizem Gülevin TAKIR'a, İroda SAYDULLAEVA'ya, gerek laboratuvar malzemelerini gerek bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen Arş. Gör. Arzu YILDIRIM'a ve şu an her biri ayrı ülke ve memleketlerde olan mezun arkadaşlarımdan Öznur SİNGİN, Serhan TURUNÇ, Aykut BOSTANCI ve Gencer Kaan AKYÜZ'e desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Beni her zaman destekleyip yanımda olan canım aileme çok teşekkür ederim.

Proje desteğinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım (Proje No: 117S289).



**İÇİNDEKİLER**Sayfa

ÖZET.....	VII
ABSTRACT .....	IX
TEŞEKKÜR.....	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XV
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	XVI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Normal Prostat Gelişiminde Androjenler .....	2
2.2. Prostatın Androjenik Kontrolü .....	2
2.3. Androjen Reseptörü (AR) Yapısı ve Fonksiyonu.....	2
2.4. Prostat Kanseri ve AR Ekspresyonu .....	7
2.5. p53, Mdm2, AR İlişkisi .....	9
2.6. Nutlin3a .....	10
3. MATERYAL VE METOT.....	12
3.1. Materyal.....	12
3.1.1. Cihaz .....	12

## İÇİNDEKİLER (devam)

3.1.2. Sarf malzemeler.....	12
3.2. Metod .....	17
3.2.1. Hücre kültürü.....	17
3.2.2. İmunoblotlama .....	18
3.2.3. Transfeksiyon .....	22
3.2.4. Lüsiferaz reporter assay .....	22
3.2.5. Nükleer-sitoplazmik protein izolasyonu .....	23
3.2.6. İmmünoflöresans .....	23
4. BULGULAR.....	25
4.1. Mdm2 İnhibisyonunun p53 ve AR Yolağına Etkisi.....	25
4.2. Nutlin3a'nın AR Transaktivasyonuna Etkisinin Belirlenmesi.....	26
4.3. Nutlin3a'nın AR Translokasyonuna Etkisi .....	27
5. TARTIŞMA .....	31
6. SONUÇ.....	34
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	35
ÖZGEÇMİŞ.....	42

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Testosteron biyosentezi .....	3
2.2 Androjen ve AR işlevi .....	4
2.3 AR fonksiyonel alanların yapıları.....	6
2.4 Kastrasyon dirençli prostat kanserinde androjen ve AR işlevi.....	9
2.5 A: Nutlin3a yokluğunda p53-MDM2 etkileşimi, B: Nutlin3a varlığında p53-MDM2-AR etkileşimi .....	11
4.1 LNCaP hücrelerine 24 saat süreyle 3, 6, 12, 24, ve 48 $\mu$ M nutlin3a uygulanması ile p53 ve AR sinyalizasyonundaki değişim.....	25
4.2 A: Nutlin3a'nın LNCaP hücrelerinde AR transaktivasyonuna etkisi. B: pProbasin-luc transfekte edilmiş LNCaP hücrelerinde RLA kat değişimi ..	27
4.3 R1881 varlığında ve yokluğunda nutlin3a (2,5 $\mu$ M,24 saat) uygulanmış LNCaP hücrelerinde AR yerleşimi. ....	28
4.4 LNCaP hücrelerinde nutlin3a (2,5 $\mu$ M, 24 saat) uygulaması sonucunda AR ve p21'in seviyesel değişimi ve hücre içi yerleşimi .....	29
4.5 Sitoplazmik - Nükleer fraksiyonlama sonucu elde edilen bantların dansitometrik analiz grafikleri .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

3.1 Ayırma jeli bileşenlerinin değişik yüzdeler için oranı ..... 20

3.2 Depolama jeli bileşenlerinin değişik yüzdeler için oranı ..... 20



## 1. GİRİŞ

Androjen erkek cinsel farklılaşmasının yanı sıra prostat gelişimi ve karsinogenezisin ana düzenleyicisidir. Androjen tarafından düzenlenen gen ifadesi, ligand bağımlı bir transkripsiyon faktörü olarak işlev gören nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesi olan androjen reseptörünün (AR) etkisiyle gerçekleşir (Grossmann et al., 2001).

AR, genomdaki androjen yanıt elementlerine (ARE'ler) bağlanarak veya spesifik tanıma bölgelerine bağlı diğer transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek hedef genlerin ekspresyonunu düzenler (Wang et al., 2005). Örneğin Probasin geninin promotöründeki ARE dizileri spesifik olarak AR tarafından tanınmaktadır, fakat diğer steroid hormon nükleer reseptör süperailisi üyesinden biri olan glukokortikoid reseptör (GR) tarafından tanınmaz. DBD, bir katlanma bölgesi tarafından ligand bağlanma alanına bağlanır (Schoenmakers E., et al., 2000). AR, prostat kanserinin gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı için agresif ve yaygın prostat kanserinde terapötik hedef haline gelmiştir (Azeem W. et. al., 2017).

AR'nin ekspresyon seviyesi ve transkripsiyonel aktivitesi MDM2 tarafından kontrol edilebilmektedir (Lin HK et al, 2002; Gaughan L et al, 2005). Bununla birlikte MDM2'nun negatif düzenleyicisi olan p53 AR ile de etkileşebilmekte ve AR aracılıklı transkripsiyonun baskılanmasına yol açabilmektedir (Sengupta S et al, 2004; Shenk JL et al, 2001).

p53-MDM2 etkileşimini inhibe eden nutlin3a varlığında p53 stabilizasyonunun AR'ın transkripsiyonel hedeflerine bağlanma dinamiğini, hücre içi lokasyonunu nasıl etkilediği ve AR transaktivasyonu üzerindeki etkisi LNCaP hücrelerinde araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Normal Prostat Gelişimi ve Androjenler

Prostatın prenatal gelişimi androjene özellikle de dihidrotestosterona (DHT) bağımlıdır. Fetal testis testosteron üretse de, tam prostat morfogenezi için testosteronun 5 $\alpha$ -redüktaz ile hücre içi indirilmesi gereklidir. İnsanda yaklaşık 10 haftalık gebelikte prostatın duktal yapısı ürogenital sinüsün epitelyal çıkıntılarında kaynaklanır ve gelişmekte olan mesanenin hemen altındaki çevre mezeneşime doğru hareket eder. 5 $\alpha$ -redüktaz enzimi, ürogenital sinüste prostat gelişimi öncesi ve sırasında mevcuttur (Shapiro E. et al.,2000; Siiteri PK. et al., 1974). Fonksiyonel bir 5 $\alpha$ -redüktaz geni bulunmayan bireylerde prostat küçük veya tespit edilemezdir. Sıçanlarda, fetal gelişim sırasında 5 $\alpha$ -redüktaz inhibisyonu, kısmi prostat gelişimi ile sonuçlanır (Imperato-McGinley J. et al., 1985). Prostat gelişiminin başlatılması fonksiyonel bir AR'e bağımlıdır (Yeh S. et al., 2002).

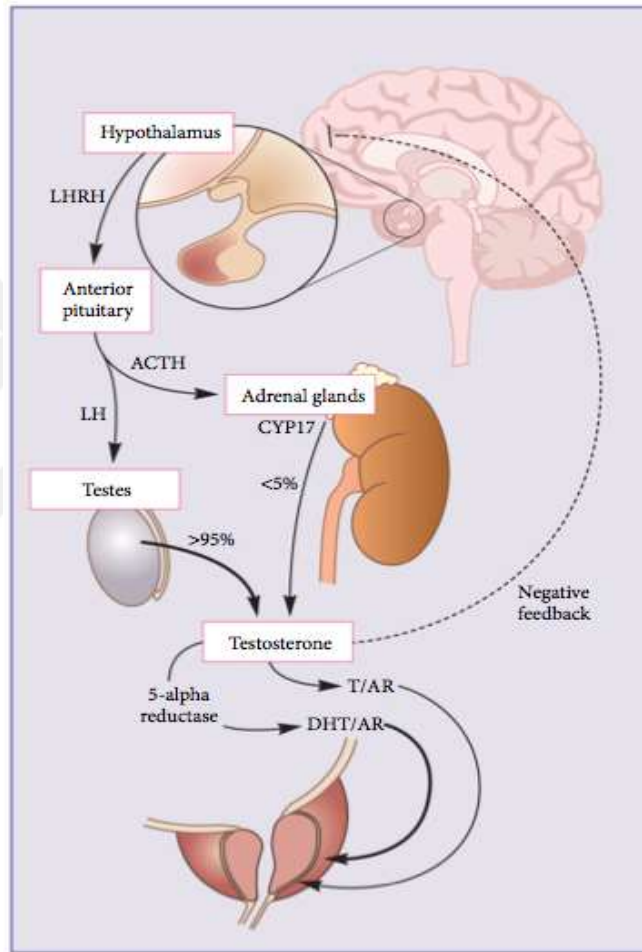
### 2.2. Prostatın Androjenik Kontrolü

1875 yılında Pelikan, Rusya'daki Skopsty tarikatında, cinsel saflığı geliştirmenin bir yöntemi olarak kastrasyon uygulayan erkeklerin çocuklarla aynı büyüklükte prostat bezleri olduğunu gözlemlemiştir (PelikanE, 1875; Alastair D. et al., 2014). Ancak 1940'lı yıllara kadar, prostatın androjen regülasyonunun gerçek öneminin, Huggins ve Clark'ın kastrasyon yaparak ilk olarak prostat büzülmesine ve asit fosfataz salgılanmasının azalmasına yol açtığı, testosteron enjeksiyonunun ise zıt etkiye sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Huggins prostat kanserli sekiz hastada orşiektomi ve adenektominin dolaşımdaki androjenleri uzaklaştırdığını gösterdi. Kırk yıl sonra Redding ve arkadaşları, 1982'de bir GnRH analogu olan D-Trp6'nın, 344 sıçanda anterior hipofiz bezinin aşırı uyarılmasında indüklenen negatif bir geri besleme döngüsü ile normal prostat büyüklüğünü ve tümör yığınını etkili bir şekilde azalttığını göstermiştir (Şekil 2.1) (Alastair D. et al., 2014).

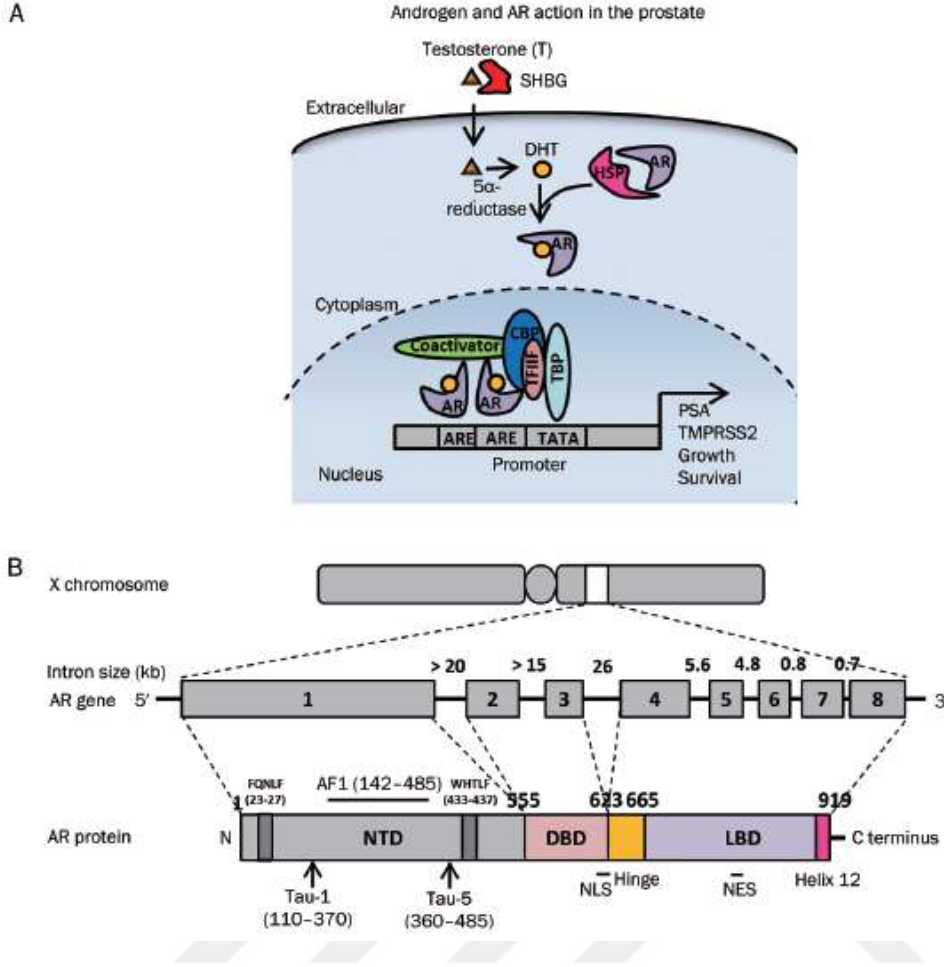
### 2.3. Androjen Reseptörü (AR) Yapısı Ve Fonksiyonu

AR geni X kromozomu üzerinde Xq11-Xq12 lokusunda bulunur (Şekil 2.2B) (Lubahn DB. Et al., 1988; Brown CJ. et al., 1989; Migeon BR. et al., 1981). Protein

kodlama bölgesinde 2757 nükleotidi vardır ve 0.7 ile 2.6 kb boyutlarında değişen intronlarla birlikte sekiz ekson içerir. AR geni, 919 amino asitten oluşan 110-kDa'lık bir proteini kodlar (Şekil 2.2B) (Gelman EP. et al., 2002). Nükleer reseptör ailesinin diğer üyeleri gibi, AR da üç ana fonksiyonel bölgeden oluşur; N-terminal alanı (NTD) (1-555), DNA bağlama alanı (DBD) (555-623) ve esnek bir katlanma 'hinge' bölgesi (623-665) ile DBD'ye bağlanan C-terminal ligand bağlama bölgesi (LBD) (665-919) (Şekil 2.2B) (Mangelsdorf DJ. et al., 1995).



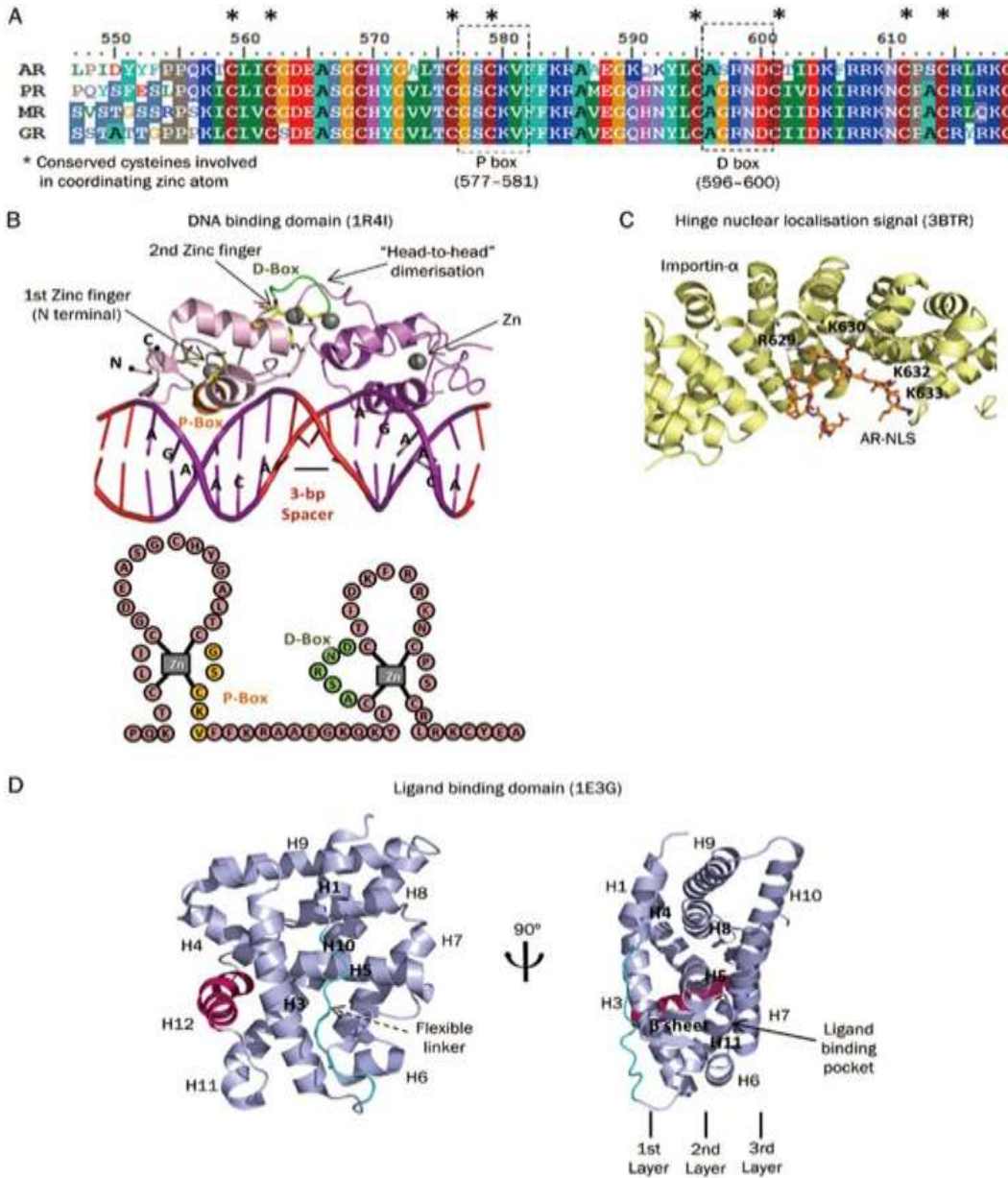
**Şekil 2.1: Testosteron biyosentezi.** Hipotalamustan salınan LHRH, ön hipofiz bezinden luteinize edici hormon (LH) ve adrenokortikotropik hormon (ACTH) da dahil olmak üzere gonadotropinlerin salınmasına neden olur. Bunlar testosteron salımını testislerden (toplam testosteron üretiminin > % 95'i) ve adrenal bezden (< % 5), testosteron-öncülü androstenedionun sitokrom p450, alt aile 17 (CYP17) tarafından kolesterolden sentezlendiği yerde uyarır. Testosteron (T) 5a-redüktaz ile dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülür. Hem testosteron hem de DHT, androjen reseptörüne (AR) ligand olarak bağlanabilir.



**Şekil 2.2: Androjen ve AR işlevi.** Androjen reseptör geninin genom organizasyonu ve androjen reseptör proteininin fonksiyonel domain yapısı. (A) Prostat hücrelerinde androjen ve AR sinyalleri. Testiküller sentezden sonra, testosteron, prostat gibi hedef dokulara taşınır ve 5- $\alpha$ -redüktaz ile dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülür. DHT, ligand bağlanma bölgesine bağlanır ve ısı şok proteinlerinin (HSP'ler) AR'dan ayrılmasını teşvik eder. AR sonra çekirdeğe transloke olur, dimerize olur ve prostata spesifik antijen (PSA) ve TMPRSS2 gibi hedef genlerin promoter bölgesindeki androjen yanıt elementine (ARE) bağlanır. AR promotöre, p160 ailesel koaktivatörler ve CREB, CBP üyeleri gibi diğer koregülatörlere ek olarak bazal transkripsiyon makinesi TBP (TATA-box-binding protein) ve TFIIF (transcription factor IIF) üyelerini de toplayabilir. SHBG: serum seks hormonu bağlayan globulin. CREB cAMP-yanıt element bağlayıcı protein. CBP; CREB bağlayıcı protein. (B) Androjen reseptör geni, X-kromozomunun uzun koluna eşlenmiştir (lokus: Xq11-q12). Değişik uzunluklarda (0.7-2.6 kb) intronlar tarafından kesilen sekiz ekson içerir ve çeşitli işlevsel alanlardan (N-terminal alanı (NTD), DNA bağlama alanı (DBD) ve ligand bağlama alanı (LBD) (9,19 amino asitten oluşan bir protein kodlar), amino asit rezidü numaraları AR protein domain haritasının üzerinde belirtilmiştir). Ekson 1, NTD'yi kodlar, ekson 2 ve 3 DBD'yi kodlar ve ekson 4-8 hem katlanma bölgesini hem de LBD'yi kodlar.

NTD, AR'nin boyutunun yarısından fazlasını kapsar (1-555 rezidü) ve ekson 1 ile kodlanır (Sasaki M. et al.). DBD (rezidü 556-623), steroid hormon reseptörleri arasında oldukça korunmuş olan sistein açısından zengin bir bölgedir (Şekil 2.3A). AR, DBD'nin kristal yapısına göre, her bir DBD monomerinin çinko iyonunu koordine eden dört sistein rezidüsünden, iki çinko parmaktan (Şekil 2.3B)

(PDB: 1R4I) oluşan bir çekirdeği vardır. AR, diğer steroid reseptörleri gibi, bir 3 baz çiftlik bir boşluk (base pair spacer) (IR3) ile ayrılmış iki eşit ortak heksamerik yarı bölge (half site) (5'-AGAACA-3')' den oluşan promotör DNA yanıt elementlerine bağlanan bir dimer olarak işlev görür. N-terminal çinko parmağın  $\alpha$ -heliks DNA majör groove hormon yanıt elementinde nükleotidler ile doğrudan etkileşime girer (Şekil 2.3B). Proksimal kutu [glisin-serin-valin] (amino asitler 577-581; GSCKV) olarak adlandırılan bu  $\alpha$ -sarmalın N ucundaki üç amino asit rezidüsü progesteron reseptörü (PR), glukokortikoid reseptörü (GR) ve mineralokortikoid reseptörü (MR)'de aynıdır (Şekil 2.3A ve 2.3B) ve DNA yanıt elementini spesifik tanımadan sorumludur. AR, PR, GR ve MR, ortak bir DNA yanıt elementini bağlarsa steroid reseptörlerinin hedef spesifikliğini nasıl sağladığına ilişkin yapılan çalışmalar spesifik AR aktivasyonuna izin veren seçici androjen yanıt elementlerini (ARE'leri) (örn. 5'-GGTTCT-3 ') tanımlamıştır. ARE'lerin doğrudan 'repeat oryantasyon heksamerik half site'leri vardır. Yapısal araştırmalar, seçiciliğin, AR'nin doğrudan yarı tekrar bölgelerine (repeat half sites) bağlanmasına olanak tanıyan distal kutu bölgesi (amino asit 596-600; ASRND) yoluyla "head-to-head" biçimde reseptör dimerizasyonu ile sağlandığını doğrulamıştır (Şekil 2.3A ve 2.3B). DBD, farklı steroid reseptörleri arasında oldukça korunmuş olduğundan, diğer steroid reseptörlerinin seçici ARE'leri tanımamasının nedeni hala tartışma konusudur.



Şekil 2.3: AR fonksiyonel alanların yapıları. (A) AR, PR, MR ve GR'nin DNA bağlanma alanının, ClustalW kullanılarak gerçekleştirilen dizi hizalanması. "\*" çinko atomunun koordinasyonunda yer alan korunmuş sisteinlerini belirtir. (B) AR, DBD'nin (pembe) (PDB: 1R4I), hormon yanıt elementi (kırmızı / mor) ile kompleksleşmiş üst kristal yapısı. DBD, iki çinko parmak içerir (gri). Her çinko iyonu dört sistein tarafından koordine edilir (sarı). Bir çinko parmak, spesifik hormon yanıtı elementi half site 5'-AGAACA-3 'değerini tanıyan P-kutusu (turuncu) aracılı doğrudan DNA bağlanmasına katılır. Diğer çinko parmak, D-kutusu (yeşil) vasıtasıyla bir 'head-to-head' reseptör dimerizasyonuna katılır. Alttaki şekil, AR DBD'nin taslak gösterimi. (C) importin- $\alpha$  (sarı) ile kompleksleştirilmiş AR nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) peptidinin (amino asit 621-635) (turuncu) kristal yapısı (PDB: 3BTR). Büyük NLS sitesinden alınan rezidüer 629-RKLKKL-634, importin- $\alpha$  bağlanmasına katkıda bulunur. (D) AR ligandı bağlama alanının (mor) (LBD) (PDB: 1E3G) kristal yapısı. LBD tipik üç katmanlı, antiparalelik spiral sandviç katında düzenlenmiş 11  $\alpha$ -helis ve iki küçük, iki bükümlü  $\beta$ -tabakadan oluşur. Sarmal 1 ve 3 arasındaki uzun esnek linker mavidir.

## 2.4. Prostat Kanseri gelişimi ve Androjen reseptörü

Genel olarak prostat kanseri, farklı klinik ve morfolojik özelliklere sahip heterojen ve çok odaklı olarak tanımlanmıştır (Ruijter et al., 1996). Prostat kanseri genellikle ağrısız yavaş ilerleyen “indolent” bir hastalık olmasına rağmen, tümörlerin % 25-30'u klinik olarak agresiftir (Greenlee et al., 2001; Coffey, 1993).

Prostat kanserinin başlangıçta androjene bağımlı bir tümör olduğu düşünülmektedir. Bazı durumlarda, oldukça invaziv androjenden bağımsız bir tümöre ilerleyebilir. Hastalık ilerlediğinde, tümör lokal olarak yayılır, pelvik lenf düğümlerine metastaz yapar ve kemik gibi uzak bölgelere yayılır. Metastaz başladığında prostat kanseri tedavi edilemez (Zetter, 1990; Rinker-Schaeffer et. al., 1994; Arnold and Isaacs, 2002). Prostat karsinogenezisi sırasında, genetik değişiklikler de dahil olmak üzere çoklu hücrel ve moleküler olaylar meydana gelir (De Marzo et. al., 2003a).

Yetişkinlerde, iki ana tip prostat hastalığı meydana gelir: iyi huylu prostat hiperplazisi (BPH) ve prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) lezyonlarından türediği düşünülen prostat kanseri (Untergasser et. al., 2005; Chrisofos et. al., 2007). Prostatik hastalık ile ilişkisi temelinde, prostatta üç farklı morfolojik bölge tanımlanmıştır:

- 1) periferik bölge (peripheral zone); prostat karsinomunun olduğu yer,
- 2) geçiş bölgesi (transition zone); BPH'nin meydana geldiği bölge
- 3) merkezi bölge (central zone); karsinom ve diğer hastalıklara nispeten dirençli olan bölge (McNeal, 1969; McNeal, 1988).

Prostat kanseri gelişiminde, benin epitelyal bezlerden pre-malign lezyonlara ve invaziv karsinomaya dönüşüm gerçekleşir. Bazı morfolojik lezyonlar, yüksek dereceli PIN (Chrisofos et. al., 2007) ve proliferatif inflamatuvar atrofi (PIA) gibi prostat kanserinin potansiyel öncüsü olduğu ileri sürülmüştür (De Marzo et. al., 1999; De Marzo et. al., 2003b).

AR, Amerikalı erkekler arasında en yaygın teşhis edilen kanser olan ve kanser ölümlerinin ikinci önde gelen nedeni olan prostat kanseri ile yakından ilgilidir (Siegel R. et al., 2012; Hoffman RM. et al., 2011). 2010'da, prostat kanseri için doğrudan tıbbi maliyetlerin 12 milyar dolara ulaşacağı ve 2020 yılına kadar daha da artması beklenmektedir (Mariotto AB. et al., 2011). AR'yi kodlayan gende bulunan 1029 mutasyondan 159 mutasyon, erkeklerin prostat kanserine yatkın olmasını sağlamaktadır.

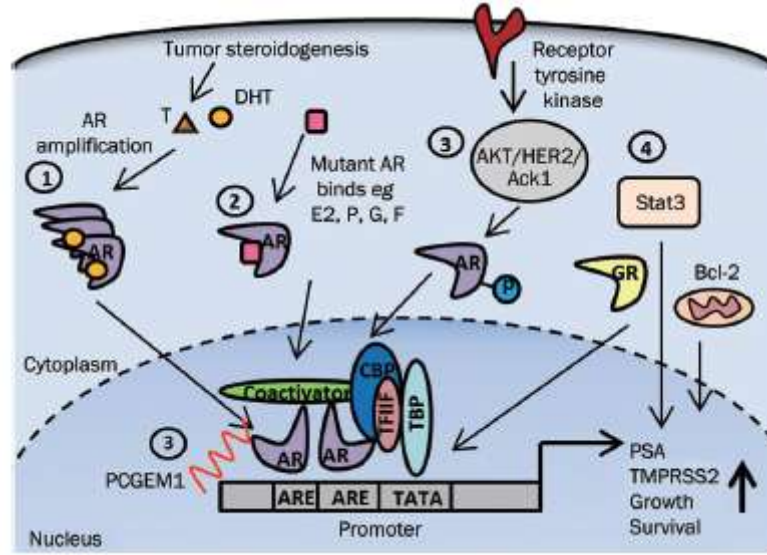
Tek başına serum androjenler prostat karsinogenezini desteklememesine rağmen, androjen işlevi ve AR'nin fonksiyonel durumu prostat kanseri ilerlemesinin önemli araçlarıdır. Yeni teşhis edilmiş ve tedavi edilmemiş prostat kanseri olan erkeklerde düşük serum testosteron düzeylerinin, yüksek AR ekspresyonu, tümör içindeki artan kapiler damar yoğunluğu ve daha yüksek Gleason skoru ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Schatzl G. et al., 2002). Operasyon öncesi tedavi edilmeyen hastalardan elde edilen klinik prostat kanseri örneklerinin son analizi, yüksek AR ekspresyonunun daha düşük tekrarsız sağ kalım ve hastalık ilerlemesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Lee D. et al., 2003). Prostat kanserinin endokrin tedavisi temel cerrahi kastrasyon ya da LHRH agonistleri ile kimyasal kastrasyon ile, testiküler androjenlerin dolaşımındaki yoksunluğu ile AR aktivitesi modülasyonunu kapsar. AR'nin aktivitesi yalnız anti-androjenlerin uygulanmasıyla, cerrahi veya kimyasal kastrasyon ile kombine halinde (kombine androjen blokajı olarak anılır) da bloke edilebilir. Hastaların % 80'inden fazlası androjen ablasyonuna pozitif bir yanıt göstermektedir. Bununla birlikte, metastatik prostat kanserli hastalar, androjen yoksunluğu tedavisinden sonra 12 ila 18 aylık bir medyanda hastalık progresyonu ile sonuçlanır (Fowler JE. et al., 1982). Bu kastrasyon dirençli bir hastalığın gelişmesidir. Hastalığın bu türü öldürücüdür ve hastalar artık birinci basamak androjen yoksunluğu tedavisine yanıt vermemektedir. Kastrasyona dirençli prostat kanseri (CRPC) hastaları, genellikle hayatta kalma avantajı sağladığı gösterilen anti-mitotik bileşik dosetaksel içeren kemoterapi ile tedavi edilir. Kastrasyon direncinin mekanizmaları belli olmamasına rağmen çok çeşitli olduğu düşünülmektedir. Bunlar;

- 1) AR'ın agonistlerine duyarlılığının artması,

2) AR mutasyonlarının, androjen olmayan ligandlara reseptör yanıtını değiştirmesi,

3) Ligandan bağımsız AR aktivasyonu ve

4) AR- Bağımsız mekanizmalardır (Şekil 2.4) (Tan MH. et al.,2012).



Şekil 2.4: Kastrasyon dirençli prostat kanserinde androjen ve AR işlevi. Kastrasyon dirençli prostat kanserinin mekanizması. Birkaç mekanizma, kastrasyon dirençli prostat kanserinin ilerlemesini desteklemektedir: (1) AR aşırı ekspresyonu, devam eden tümör steroidogenezini desteklemektedir. (2) mutant AR'nın östrojen (E2), progesteron (P), glukokortikoidler (C) ve flutamid (F) gibi alternatif ligandlarla bağlanması ve aktivasyonu. (3) AR'yi fosforilasyonla Akt, HER2 ve Ack1 kinazlarıyla çapraz iz yoluyla ve AR hedef genlerinin transkripsiyonunu uyarmak için AR'ye bağlanan uzun kodlamayan RNA'lar (örneğin PCGEM1) yoluyla, ligandan bağımsız AR aktivasyon mekanizmaları. (4) Kanser hücrelerinin sağkalımı ve büyümesinin Stat3 sinyallemesi veya anti-apoptotik Bcl-2'nin upregülasyonu ile yönlendirildiği AR'dan bağımsız yollar. Glukokortikoid reseptör (GR), kanser hücrelerinin hayatta kalması için gerekli AR hedef genlerinin benzer bir setini aktive ettiği bulunmuştur.

## 2.5. p53, MDM2, AR İlişkisi

p53 proteini, çeşitli hücre stres formlarına yanıt olarak hücre döngüsü arrestini veya apoptozu indükleyebilen güçlü bir tümör baskılayıcıdır (Levine A.J., 1997). Stresiz koşullar altında, p53 negatif regülatör MDM2 tarafından otoregülatörlü bir feedback döngüsü aracılığıyla sıkıca kontrol edilir (Wu X. et al., 1993 ; Bond GL. et. al., 2005) . p53 MDM2 geninin transkripsiyonunu aktive eder ve buna karşılık MDM2 proteini p53 transkripsiyonel aktivitesini inhibe eder. Ayrıca MDM2, ubiquitasyon ve proteazomal degradasyon için p53'ü hedefleyen

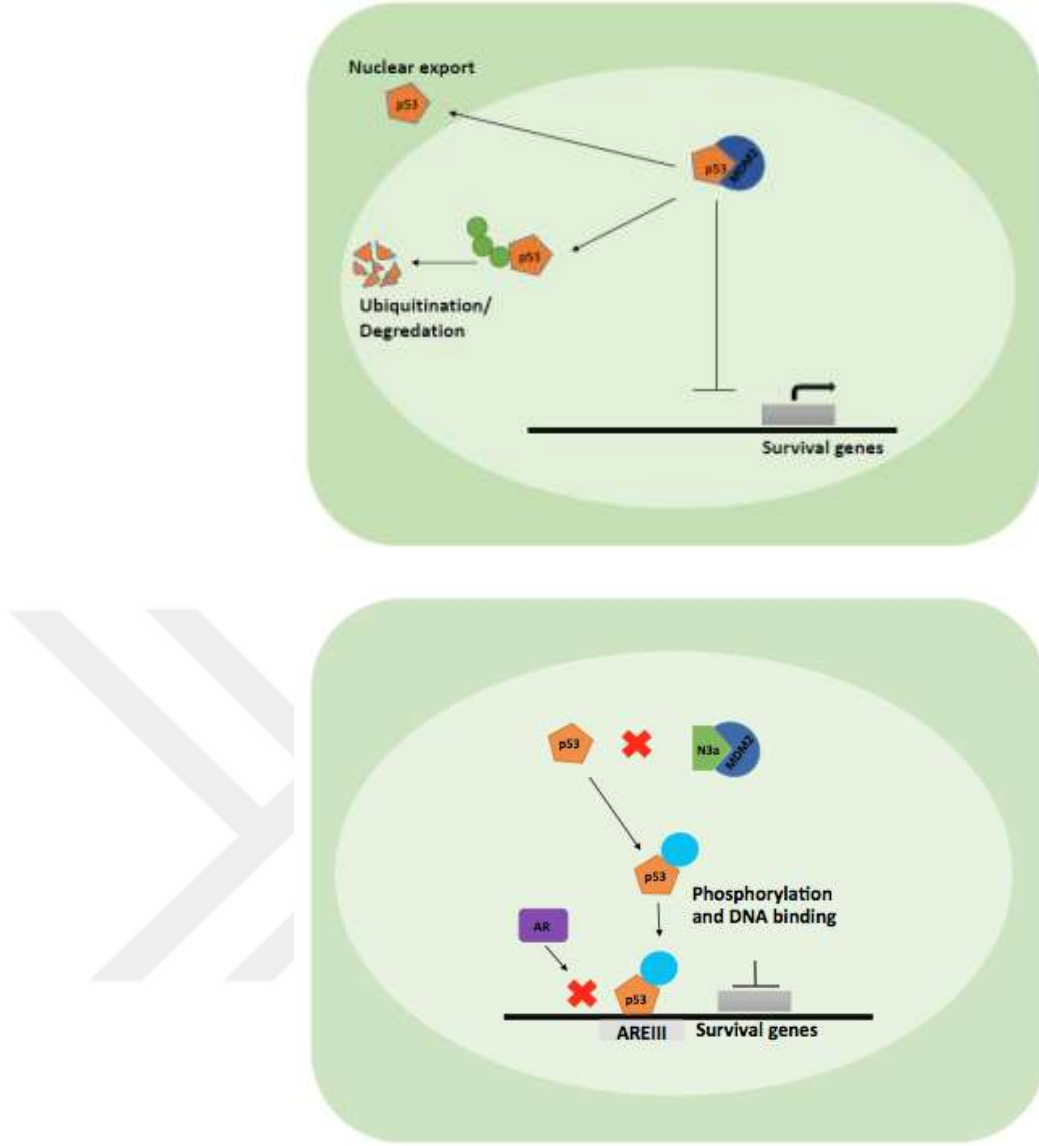
p53'e özgü bir E3 ligazdır (Honda R. et al., 1997). Bu otheregölasyon döngüsünün düzgün çalışması sonucunda p53 ve MDM2 düşük seviyelerde tutulur. Strese yanıt olarak, p53'ün hücreseel seviyesi ana fonksiyonlarıyla, çoklu hedef genlerin ve p53 yolağının aktivasyonuna neden olur: hücre döngüsünü durdurma ve apoptoz (Tovar et al., 2011). Bu antitümör sonuçlar, p53'ü farmakolojik aktivasyon için istenen bir hedef yapar (Brown CJ. et al., 2009).

Hücre döngüsü arresti ve apoptozdaki rolünün yanı sıra p53 AR düzenlenmesinde de rol oynar (Cronauer MV. et al., 2004). p53'ün AR üzerindeki kontrol mekanizması açıkça anlaşılmasa da, p53 aşırı ifadesinin, androjen bağımlı genlerin ekspresyonunda azalma ile görünüşte androjen fonksiyonunu azalttığı gösterilmiştir (Shenk JL et al, 2001; Nesslinger NJ. et al., 2003).

Bununla birlikte, fizyolojik seviyelerde p53'ün androjen sinyalizasyonunu korumak için hareket edebileceği göz önüne alındığında, bu düzenleme oldukça karmaşıktır. Tersine, androjen sinyali etoposid ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde azalmaktadır, çünkü stabilize p53, AR geni promotörüne bağlanmaktadır. Dolayısıyla, p53, AR promotörüne bağlanmak için AR ile yarışmalı rekabet ederek AR sinyalizasyonunun azaltılmasını kolaylaştırabilir (Şekil2.5). Yapılan bir çalışmada AR protein seviyesinin düzenlenmesinde MDM2'nin ubiquitin bağımlı degradasyon için hedeflendiği gösterilmiştir (Lin HK., et al., 2002).

## 2.6. Nutlin3a

Nutlin3a, p53-MDM2 etkileşiminin güçlü ve seçici küçük molekülü inhibitörüdür. Nutlin3a, MDM2 molekülünün yüzeyindeki p53 bağlanma bölgesine bağlanarak p53 stabilizasyonu sağlar ve *in-vivo* ve *in-vitro* p53 yolağını aktive eder. Böylece p53 yolunun aktivasyonuna yol açan p53-MDM2 bağlanmasını etkin bir şekilde bozar. Yabancıl tip p53'e sahip tümörlerde tedavi seçeneği sağlamaktadır (Vassilev L.T. et al., 2004).



**Şekil 2.5: A: Nutlin3a yokluğunda p53-MDM2 etkileşimi, B: Nutlin3a varlığında p53-MDM2-AR etkileşimi**

p53, ARE bölgelerine bağlanmak üzere AR ile yarışarak transkripsiyonu baskılayabileceği için ve AR, MDM2 tarafından parçalanmak üzere hedeflenebildiğinden çalışmamızda LNCaP (lenf noduna metastaz olan prostat kanseri hücre hattı) hücrelerinde nutlin3a aracılıklı olarak p53-MDM2 etkileşimini inhibe ederek AR'nin transkripsiyonel hedeflerine bağlanma dinamiğini, hücre içi lokasyonunu nasıl etkilediği ve AR transaktivasyonu üzerindeki etkisi içi lokasyonunu nasıl etkilediği ve AR transaktivasyonu üzerindeki etkisi LNCaP hücrelerinde araştırılmıştır.

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Cihaz

- Biyogüvenlik kabini - Sınıf II (Esco, Hollanda)
- Soğutmalı Santrifüj (Sigma, B6916, ABD)
- Karbondioksitli inkübatör (Sanyo, MCO-18AIC, Japonya)
- pH ölçüm cihazı (Hanna, HI221, Almanya)
- Isıtılmalı Manyetik Karıştırıcı (Wisd, MSH-20A, Almanya)
- Kuru blok ısıtıcı (Grant, QBA2, İngiltere)
- Spektrofotometre cihazı (Amersham Biosciences, Ultraspec. 100Pro, ABD)
- Santrifüj (Eppendorf 5415D ve 5415R, ABD)
- Dikey Elektroforez Sistemleri (Biorad – 1658000FC, ABD)
- Western blot 4'lü transfer modülü (Biorad-1660828EDU, ABD)
- İverted ışık mikroskobu (Leica DMIL, Almanya)
- Çalkalayıcı (DUOMAX 1030 ve Heidolph, ROTAMAX120, Almanya)
- Test tube karıştırıcı (YellowLine, TTS2, Fransa)
- Soğutma ayarlı santrifüj (Eppendorf 5415R, UK)
- Floresan mikroskop (Leica DMIL, Germany)
- Mikro hacimli spektrofotometre (Thermo Nanodrop 1000, Wilmington, DE, ABD)
- Karıştırıcı (Biosan PSU-2T, Latvia)
- İnkübasyon/inaktivasyon su banyosu (WiseBath WB-6, Kore)
- Buzdolabı (BEKO, İzmir, Türkiye)
- Kırık buz makinesi (ITV, ABD)
- Orbital inkübatör - çalkalamalı (Biosan-PSU-2T, Letonya)
- Homojenizatör (Sonoplus HD 2070, Berlin, Almanya)
- Florimetrik ve lüminometrik mikroplate okuyucu (Thermo Scientific, Fluoroskan Ascent Fl, Shangai, Çin)
- Enjektörler (Ayset, Türkiye)

### 3.1.2. Sarf malzemeler

- Pastör pipet (Marienfeld, Germany)
- Hemositometre (Neubauer, Marienfeld, Almanya)
- Tripan mavisi % 0,4 (Sigma, T-6146, ABD)
- Whatman kağıtları (GE Healthcare Amersham, Buckinghamshire, UK)
- Kuvars küvet (Hellma, 105. 202-QS, Almanya)
- FBS - Fetal dana serumu (Gibco, 10270, ABD)
- Erlen (ILMABOR TGI, Almanya)
- Hücre kazıyıcı (TPP 9903, İsviçre)
- Manyetik Karıştırıcı (Wisd-MSH20A, Almanya)
- TE, Tripsin-EDTA (Gibco, 3103382, ABD)
- Mikrosantrifüj tüpleri (Greiner, 616201, Almanya)
- P/S ; Pensilin/Streptomisin (Gibco15140, ABD)
- L-Glutamin (Gibco, 25030, ABD)
- Pipet uçları (VWR, ABD)
- DMSO (Merck K 33960212-504, ABD)
- Gliserol (Sigma, G5150, Almanya)
- Lamel 22X22 mm No: 1 (Marienfeld, Königshofen, Almanya)
- 6 kuyulu hücre kültür kapları (Greiner, Almanya)
- RPMI Hücre ortamı; (Gibco, 31330, ABD)
- Hücre kültür kapları (6 cm) (Sarstedt AG&G, D-51588, Nümbrecht, Almanya)
- Hücre kültürü kapları (10 cm) (Sarstedt AG&G, D-51588, Nümbrecht, Almanya)
- $\beta$ -merkaptoetanol (Sigma, M3148, ABD)
- Fosfataz inhibitör kokteyli (Roche, 04906837001, Almanya)
- Sodyum florür; NaF 100X (100mM), (Merck, B815549 606, ABD)
- Falkon tüpler (15 ml ve 50 ml) (Jet Biofil, CFT-011-150, İtalya)
- Steril pipetler (2,5- 5- 10 ve 25 ml) (Orange, İtalya)
- Otomatik pipetler (1-10, 20-200 ve 100-1000  $\mu$ l) (Brand, Transferpette-S, Almanya)

- ECL PLUS kiti (HRP) (GE Healthcare Amersham Western Blot detection system, RPN2132, ABD)
- PVDF (Polyvinylidene fluoride) transfer membranı (Roche, 03010040001, Almanya)
- Proteaz inhibitor kokteyli (Roche, 04693159001, Almanya)
- Western blot pozlama kaseti (Amersham Hypercassette, RPN 11643, Buckinghamshire, UK)
- İzopropanol (Merck, K35707095 607, ABD)
- X-Ray Film (Carestream Healt MXB, Fransa)
- Fikser solüsyonu (Kimetsan, Fast X-Ray Fikser Sol., Türkiye)
- Asetat kağıtları (Türkiye)
- Developer solüsyonu (Kimetsan, Fast X-Ray Developer Sol., Türkiye)
- EtOH, Etanol (Merck, K41414186 038, ABD)
- MetOH, Methanol % 100 (Merck, 1552608 034, ABD)
- TEMED (Sigma, T9281, Almanya)
- PMSF 100X (100 mM) (Fluka, 93482)
- DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) solüsyonu:
  - ✓ 0.25 µg/ml DAPI dilactate (Sigma, D9564, Almanya),
  - ✓ % 30 gliserol (Sigma, Almanya),
  - ✓ % 70 PBS)
- 4X SDS-PAGE ayırma jeli çözeltisi
  - ✓ 1.5 M Tris/HCl (Sigma, T5, Almanya941),
  - ✓ % 0,4 SDS (Sigma, L4390, Almanya), pH 8.8
- Modifiye RIPA çözeltisi:
  - ✓ 10 mM Tris.Cl pH=8,0 (Sigma, T5941, Almanya),
  - ✓ % 0,1 SDS (Sigma, L4390, Almanya),
  - ✓ % 1 Triton X-100 (Sigma, T8787, Almanya),
  - ✓ % 0,1 Sodyum Deoksikolat (Sigma, D6750, Almanya),
  - ✓ 1 mM EDTA (Sigma K5134, Almanya),
  - ✓ 1 mM EGTA (Sigma, E3889, Almanya),
  - ✓ 140 mM NaCl (Sigma, S3014, Almanya)
- BCA kiti (Sigma, 088K6138, Almanya)

- % 30 akrilamid karışımı için
  - ✓ % 29 akrilamid (Sigma, A9099, Almanya) ve
  - ✓ % 1 N, N- metilenbisakrilamid (Sigma, M2022, Almanya)karışımı hazırlanarak filtrelendi ve gazı alınarak kullanıldı.
- 5 ml steril enjektör (Ayset, Türkiye)
- Yağsız süt tozu (Meier, Almanya)
- SDS-PAGE jel 10X transfer tamponu, toplam hacim 1L (1x olarak kullanılır):
  - ✓ % 20 metanol (Merck, K34212908503, ABD),
  - ✓ 30.0 g Tris baz (Sigma, T6066, Almanya),
  - ✓ 144.0 g Glisin (Biochemika/FLUKA, 50046, Almanya)
- 4X SDS-PAGE depolama jel tamponu:
  - ✓ 0.5 M Tris/HCl (Sigma, T5941, Almanya),
  - ✓ % 0,4 SDS (Sigma, L4390, Almanya), pH 6.8
- % 10'luk Amonyum Persülfat (APS) (Sigma, A9164, Almanya)
- 1L hacim için SDS-PAGE jel 10X yürütme tamponu (1X olarak kullanılır):
  - ✓ 30 g Trizma baz (Sigma, T6066, Almanya),
  - ✓ 144 g Glisin (Biochemika/FLUKA, 50046, Almanya)
  - ✓ 10.0 g SDS (Sigma, L4390, Almanya)
- LNCaP hücre hattı (CRL-1740) (ATCC, Manassas, Virgingia, ABD)
- 4X Yükleme tamponu:
  - ✓ 40 mM Tris HCl (pH 8,0 , Almanya),
  - ✓ 0.4 mM EDTA (Sigma, K5134, Almanya),
  - ✓ % 4 SDS (SIGMA L4390, Almanya),
  - ✓ % 20 Gliserol (Sigma, G5150, Almanya),
  - ✓ Brom fenol mavisi 200 ul (Merck, L54971322-525, ABD)
- 10 X TBS (pH 7.6), toplam hacim 1L:
  - ✓ 2,1 g Tris baz (Sigma, T6066, Almanya),
  - ✓ 80.0 NaCl (Sigma, S3014)
- TBS-T için 1X TBS içine % 0,1 Tween 20 (Sigma, E1383, ABD) ilave edilmiştir.

- Fosfat Tamponu (Phosphate Buffered Saline / PBS):
  - ✓ 8 g NaCl (Sigma, S3014, ABD),
  - ✓ 0,2 g KCl (Merck, ABD),
  - ✓ 1,57 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (Merck, K22287176), ABD,
  - ✓ 1 L dH<sub>2</sub>O, pH 7.4
- Anti-rabbit IgG horse radish peroxidase (HRP) (Amersham, NA934, ABD)
- Anti-mouse IgG sekonder antikor (Invitrogen Molecular Probes Alexa Fluor 488) (Invitrogen- A11001, ABD)
- R1881 (Metribolone, sentetik androjen, Sigma Aldrich, ABD)
- Anti-rabbit IgG sekonder antikor (Invitrogen Molecular Probes Alexa Fluor 488) (Invitrogen- A11008, Kanada)
- FuGene HD Transfection reagent, (Promega, E2311, ABD)
- Anti-Androgen Receptor Antibody (Millipore-06-680, rabbit)
- Anti-NKX3.1 antikor (Prof. Dr.Fahri Saatçiođlu'nun laboratuvarında Prof. Dr. Kemal Sami Korkmaz tarafından üretildi)
- Anti-p53 antikor (Santa Cruz Fl-393, rabbit, ABD)
- Anti p21 antikor (Santa Cruz 187, mouse, ABD)
- Anti p-AR (ser-213/210) (Imgenex, mouse)
- Anti p-AR (ser-81) (Millipore, rabbit)
- Anti-GAPDH antikor (Ambion, mouse, 447288, ABD)
- Anti-β-Aktin antikor (Sigma- A5316, Almanya)
- Lüsiferaz Assay kit (Promega, E1500, ABD)
- PBS (1X)
  - ✓ 8 g NaCl (Sigma- S3014, ABD)
  - ✓ 0.2 g KCl (Merck- 1049360250, ABD)
  - ✓ 1.57 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (Merck- K22287176, ABD) ile dH<sub>2</sub>O içerisinde hazırlanarak 1M HCl ile pH 7.4'e ayarlandı.

## 3.2. Metot

### 3.2.1. Hücre kültürü

#### 3.2.1.1. Hücrelerin bakımı ve pasajlanması

Hücrelerin bakımı için % 10 FBS, % 1 L-glu, % 1 P/S ile desteklenen RPMI-1640 kullanıldı. Kültür kabının yüzeyini tamamen kaplayacak kadar çoğalmadıklarında, yüzeye tutunan hücrelerin ortamı pastör pipeti kullanılarak uzaklaştırıldı ve kültür kabının kenarından hücrelere yavaşça yeni ortam eklendi. Hücreler yüzeyi kaplayana kadar ortamları gün aşırı değiştirildi. Hücreler, 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda 10 ml, 100 x 20 mm'lik hücre kültür kaplarında 8 ml ve 60 mm hücre kültür kaplarında 3 ml besi ortamında, 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde büyütüldüler. Hücreler kültür kabının yüzeyini dolduracak kadar çoğaldıklarında pasajlandılar.

Aspirasyon pompasına steril cam pastör pipeti takılmak suretiyle vakum yardımıyla ortam uzaklaştırıldı. Tripsin uygulamasının etkisinin artırılması amacıyla Ca<sup>2+</sup> ve Mg<sup>2+</sup> bulundurmeyen steril PBS ile kültür yüzeyi bir kez yıkandı. PBS ortamdan çekildikten sonra kültür kabının yüzeyini kaplayacak kadar tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub>'li incubator içinde hücreler yüzeyden kalkana kadar yaklaşık 4 dk muamele edildi. Önceden 37 °C'ye ayarlanmış su banyosunda ısıtılan besi ortamı Hücre yoğunluğuna uygun hacimde hücrelere ilave edildi ve hücreler serolojik pipet kullanılarak homojen hale getirildi. Daha sonra yeni kültür kabına taze besi ortamı eklendi ve homojen hale getirilen hücreler bu ortamın üzerine kibarca eklenerek ve büyümeleri için 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

#### 3.2.1.2. Hücrelerin dondurulması ve çözülmesi

Hücreler sürekli olarak kültür edildikleri zaman yapısal, işlevsel, büyüme ve karyotipik olarak farklılaşmaktadır. Hücre kültürleri *in vitro* pasaj sayısına bağımlı farklılıklar gösterir. Dondurulan hücrelerin özelliklerinde uzun süre farklılık olmadan saklanabilir. Çalışma süresince, hücreler belli pasaj sayılarında donduruldu. Dondurma işleminden hücrelerin zarar görmemesi amacıyla hücrelerin

üzerine kriyoprotektan ajanı olarak % 5 DMSO kullanıldı ve her kriyotüpe 1,5 ml aktarılarak daha sonra kullanılmak üzere -80 °C saklandı.

Çözdürülecek hücreler -80 °C derin dondurucudan alınarak hızla önceden 37 °C'ye ısıtılmış su banyosunda çözülene kadar (yaklaşık 2 dk) bekletildi. Daha sonra hücreler, kültür kabındaki 37 °C'ye ısıtılmış ortam üzerine ilave edildi.

### **3.2.1.3. Hücre sayımı**

Hücre miktarını belirlemek için hücre sayımı yapıldı. Hücreler pasajlanırken, yeni kültür kabına istenen miktarda hücre alabilmek için hemositometrik lam ile sayıldı. Sayım için hücre süspansiyonundan 10 µl alındı ve tripan mavisiyle 100 µl'ye tamamlandı (10 kat seyreltme yapılmış oldu). Karışım pipetle homojen hale getirildi. Hemositometre ve onun üzerine konulan lamel arasına, hücre süspansiyonu pipetle hemositemetrik lamın oluğundan yayıldı. Hemositometre üzerinde bulunan 9 farklı büyüklükte olan karelerin içindeki hücre miktarı sayıldı. Mililitredeki hücre sayısını (hücre sayısı/ml) bulabilmek için aşağıdaki formül kullanıldı.

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

## **3.2.2. İmmunoblotlama**

### **3.2.2.1. Protein izolasyonu**

Hücreler inkübatörden alındıktan sonra direkt buz üzerine alındı ve kendi ortamları içinde 'scraper' (kazıyıcı) kullanılarak toplandı. 300 xg'de santrifüj edilerek ortam uzaklaştırıldı. Hücreler, 1 ml soğuk PBS ile süspansiyon edildi ve tekrar santrifüjlenerek PBS uzaklaştırıldı. Hücre miktarına uygun miktarda RIPA modified tamponu (proteaz inhibitör karışımı, PMSF, fosfataz inhibitör karışımı, NaVO<sub>3</sub> ve NaF içeren) ile süspansiyon edildikten sonra buz üzerinde 45 dk bekletildi. Sonra % 25 güç ile, 20 sn sonikasyon yapıldı ve 12.000 xg'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant yeni tüpe alındı, protein lizatı olarak -80 °C'ye kaldırıldı.

### **3.2.2.2. Protein miktarının belirlenmesi**

Hazırlanan lizatlardaki protein miktarı BCA kiti kullanılarak belirlendi. Ölçüm için santrifüj tüplerine 149 µl modifiye RIPA tamponu ve 1 µl protein lizati ilave edildi. BCA çalışma reaktifi her örnek için 75 µl QA, 75 µl QB ve 3 µl QC olmak üzere tüm örnekler ve blank (kör) için gerekli tüm karışım hazırlandı. Hazırlanan BCA karışımı vortex ile karıştırılarak örnek tüplerine örnek başına 150 µl olacak şekilde eklendi. Blank olarak protein lizati içermeyen 150 µl RIPA kullanıldı. Tüpler vortekslenip, kısaca santrifüjlendikten sonra 60 °C'de ısıtıcı blokta 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi bittikten sonra örneklerin oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve 562 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbansları ölçüldü. Elde edilen değerler protein standart eğrisine (curve) göre hesaplanarak µg/µl olarak protein miktarları belirlendi.

### **3.2.2.3. Proteinlerin SDS-PAGE ile ayrılması**

Camlar sırasıyla dH<sub>2</sub>O-EtOH-izopropanol ile temizlendi. Hazırlanan jel dökme aparatına uygun yüzdede ayırma jelleri döküldü (Çizelge 3.1). Jelin düzgün donabilmesi için üzeri izopropanol ile kaplandı. Ayırma jelinin donması beklendikten sonra, donan jelin üzerindeki izopropanol dökülerek uzaklaştırıldı ve üzerine depolama jeli hazırlanıp dökülerek tarak yerleştirildi (Çizelge 3.2). 4× yükleme bufferi içerisine % 10 olacak şekilde β-merkaptoetanol (kullanmadan önce gerekli miktarda) eklendi ve karıştırıldı. Protein lizatlarından her örnekten 30 µg-80 µg miktarlarına karşılık gelen hacimlerde yeni tüplere örnekler kondu ve eşit hacimde olmaları için üzeri su ile tamamlandı, sonra 4x yükleme tamponu eklendi. Hazırlanmış olan protein örneklerinin 90-95 °C'de 5 dk bekletilerek denatürasyonu yapıldı. Denatürasyon işleminin hemen sonrasında örnekler buza alındı ve jele yüklemmeden önce kısaca santrifüj yapıldı. Kuyucuklara yüklenen örnekler uygun voltajda (60-80 V) ve sürede (2,5-4 saat) yürütüldü.

**Çizelge 3.1: Ayırma jeli bileşenlerinin değişik yüzdeler için oranı**

<b>Ayırma Jeli (10 ml)</b>	<b>% 6</b>	<b>% 8</b>	<b>% 10</b>	<b>% 12</b>	<b>% 15</b>
<b>dH<sub>2</sub>O (ml)</b>	<b>5,4</b>	<b>4,7</b>	<b>4,1</b>	<b>3,4</b>	<b>2,4</b>
<b>% 30 Akrilamit karışımı</b>	<b>2,0</b>	<b>2,7</b>	<b>3,3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>4x Ayırma Jeli Tamponu</b>	<b>2,5</b>	<b>2,5</b>	<b>2,5</b>	<b>2,5</b>	<b>2,5</b>
<b>% 10 APS (ml)</b>	<b>0,15</b>	<b>0,15</b>	<b>0,15</b>	<b>0,15</b>	<b>0,15</b>
<b>TEMED (ml)</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>

**Çizelge 3.2: Depolama jel bileşenlerinin değişik yüzdeler için oranı**

<b>Depolama Jeli (10 ml)</b>	<b>10 ml</b>	<b>5 ml</b>	<b>2,5 ml</b>
<b>dH<sub>2</sub>O (ml)</b>	<b>5,7</b>	<b>2,85</b>	<b>1,425</b>
<b>% 30 Akrilamit karışımı</b>	<b>1,7</b>	<b>0,85</b>	<b>0,425</b>
<b>4x depolama jeli tampon</b>	<b>2,5</b>	<b>1,25</b>	<b>0,625</b>
<b>% 10 APS (ml)</b>	<b>0,1</b>	<b>0,05</b>	<b>0,025</b>
<b>TEMED (ml)</b>	<b>0,01</b>	<b>0,005</b>	<b>0,005</b>

#### **3.2.2.4. Membrana aktarma**

PVDF membran MetOH içinde ıslatıldı. İmmüno blot transfer kasetine sırasıyla sünger, Whatman, protein yürütülen jel, PVDF membran, Whatman ve sünger konularak transfer örneği hazırlandı. Transfer kaseti tanka yerleştirildi ve +4 °C'de 16-18 saat boyunca 90 mA'de transfere bırakıldı.

#### **3.2.2.5. Primer antikor işaretleme**

Transferden çıkarılan membran iki defa TBS-T ile yıkandı. TBS-T ile hazırlanan yağsız süt tozu (% 5) ile oda sıcaklığında 1 saat bloklamaya bırakıldı. Membran blokama sonrasında TBS-T ile 2 kez çalkalandı. Kullanma oranı daha önceden denenerek belirlenmiş olan primer antikor, TBS-T'ye % 5 BSA veya % 0,5 süt tozu ilave ederek hazırlandı. Membran primer antikor karışımı içerisinde, oda sıcaklığında 1 saat veya +4 °C'de gece boyu yavaş çalkalamalı olarak inkübe edildi. Membran 2 defa çalkalandı, 1 defa 15 dk ve 3 defa 5'er dk olacak şekilde TBS-T ile yıkandı.

#### **3.2.2.6. Sekonder antikor işaretleme**

Kullanma oranı daha önceden denenerek 1/5000 veya 1/10.000 olarak belirlenmiş HRP- bağlı tavşan, fare ya da keçi sekonder antikorları TBS-T'ye % 5 BSA veya % 0,5 süt tozu ilave ederek hazırlandı. Membran sekonder antikor karışımı içerisinde, oda sıcaklığında 1 saat yavaş çalkalamalı olarak inkübe edildi. Membran 2 defa çalkalandı, 1 defa 15 dk ve 3 defa 5'er dk olacak şekilde TBS-T ile yıkandı.

#### **3.2.2.7. Bant görüntülenmesi**

Membrana hazırlanan ECL-plus kiti solüsyonu (solüsyon A: solüsyon B oranı 40:1 olacak şekilde membran büyüklüğüne uygun hacimde hazırlandı) karanlık odada döküldü ve 4 dk inkübasyona bırakıldı. Görüntüleme kasetinin içerisinde iki adet asetat kağıdı arasına konulan membran üzerine film yerleştirerek değişik

sürelerde pozlama yapıldı. Film 1 dk developer solüsyonunda bekletildikten sonra fiksör solüsyonuna alınarak film üzerinde bantlar görüntülendi.

### 3.2.3. Transfeksiyon

Transfekte edilecek LNCaP hücreleri  $10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde poli-D lizin kaplı 96 kuyulu hücre kültürü kaplarında büyütüldü. Hücrelerin transfeksiyondan önce besi ortamı uzaklaştırılarak % 20 serum içeren antibiyotiksiz ortam ilave edildi. Plazmid transfeksiyonu yapmak için kuyu başına 0,1 µg DNA üzerine 0,3 µl FuGene reagent (1:3 DNA/FuGene oranı) olacak şekilde kullanıldı. Transfeksiyon yapmak için kullanılacak antibiyotik içermeyen serumsuz ortam ise transfeksiyon hacmi 100 µl'ye tamamlanacak şekilde hesaplandı. Öncelikle uygun hacimdeki (100µl) ortama eklenecek DNA miktarına bağlı FuGene eklendi. Hazırlanan karışım oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. Daha sonra bu karışımın içine 0,1 µg DNA ilave edilerek oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. En sonunda oluşan karışım mikropipet kullanılarak hücrelere damlatıldı. Hücreler 24 saat boyunca 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub>'li inkubatörlerde inkübasyon için bırakıldı.

### 3.2.4. Lüsiferaz reporter assay

Promega lüsiferaz assay kiti (E1500) kullanılarak yapıldı. Transfeksiyon ve gerekli madde uygulamaları yapılarak hazırlanan hücrelere 1X Pasif Lizis Buffer "PLB" eklenerek dijital mini orbital karıştırıcı üzerinde 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilerek lizis edildi. Lizatlar mikro santrifüj tübüne aktararak 13.200 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek süpernatant yeni mikro santrifüj tüpüne aktarıldı. Elde edilen lizatlardan protein konsantrasyonunu ölçmek için 1'er µl alındı. Kalan lizatlar 96 kuyulu opak 'mikroplate'e aktarıldı. İlgili kuyulara eklenen lizatların (lüsiferaz enzimi) her birine 100'er µl eklenecek şekilde substrat (lüsiferaz assay reagent; LARII) hesaplandı. -86 °C'de saklanan gerekli miktarda substrat (lüsiferaz assay reagent; LARII) oda sıcaklığına getirilerek ısıtıldı ve mikroplate okuyucunun 'dispenser'ına yerleştirildi. Lüminometrik ölçüm için 'measurement type: 'single'', 'integration time: 10.000 ms' ve 'filter: none' olarak seçilip okuma yapıldı.

### 3.2.5. Nükleer-Sitoplazmik protein izolasyonu

Nükleer-sitoplazmik protein izolasyonu yapmak için iki farklı tampon kullanıldı. Tampon A; 50mM HEPES (Ph:7,4), 10mM KCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA. Tampon B; 50mM HEPES (Ph:7,4), 400mM KCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, % 0,5 TritonX-100. Her iki tampon da kullanılmadan hemen önce 1x proteaz inhibitörü, 1x fosfataz inhibitörü, 1x NaVO<sub>3</sub>, 1x NaF, 1mM DDT, 1mM PMSF eklendi. 10<sup>6</sup> yoğunlukta ekilen LNCaP hücresine madde uygulamaları yapıldıktan sonra hücreler besi ortamı içinde kazıyıcı yardımıyla toplandı ve 4000 xg'de 5dk santrifüj edildi. 500 µl PBS ile yıkama yapıp tekrar santrifüj edildi. Hücrelerin üzerine 250 µl Tampon A eklendi ve yarım saat +4 °C'de karıştırmalı şekilde inkübe edildi. 4000 xg'de 30 dk santrifüj edildi ve süpernatant sitoplazmik lizat olarak saklandı. 500 ul Tampon A ile 4 kez süspanse edilerek yıkandı ve süpernatant atıldı (yıkama sayısı hücrenin tipine göre belirlenmelidir, fazla yıkama ile çekirdekler kaybedilmemelidir. Yıkama aralarında mikroskopta kontrol edilebilir). Santrifüjler 4000 xg'de 5 dk. yapıldı. Pelletin üzerine Tampon B eklendi ve pipetleme ile iyice karıştırıldıktan sonra 30 dk 4 °C'de karıştırmalı olarak inkübe edildi. 14000 xg 30 dk santrifüj edildi ve süpernatant nükleer lizat olarak ependorf tüpe aktarıldı. Lizatlar ve pellet -86 °C'de saklandı ve protein miktarları ölçüldü.

### 3.2.6. İmmünoflöresans yöntemi

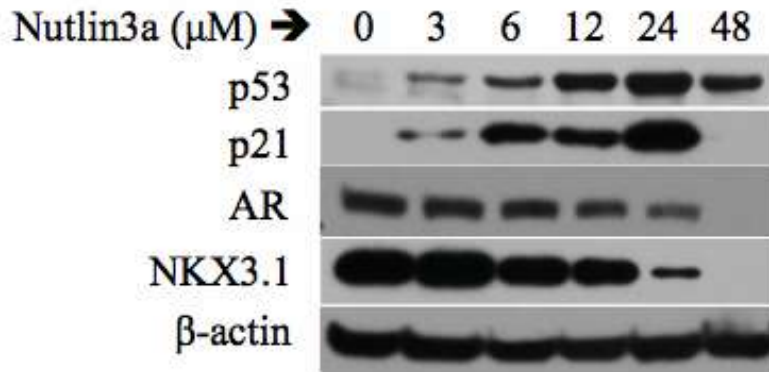
Hücreler, içine % 70 etanol ile yıkanarak steril edilmiş lamel konulan kültür kaplarına pasajlandı ve çoğalması için 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub>'li inkübatöre bırakıldı. Hücreler yeterince çoğaldıktan sonra ortamı çekilerek PBS ile bir defa yıkandı. Hücreler lamellere tespit (fiks) edilmesi için % 100 MetOH ortamına alındı ve -20 °C'de 30 dk bekletildi. Tespit edilen hücreler bir kez PBS ile yıkanmış ve % 0,2 Triton X-100 içeren PBS'li ortama alınmıştır. Geçirgenliğin sağlanması amacıyla hücreler bu ortamda oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 5 dk inkübe edildi. Hücreler 1 defa PBS ile yıkandı ve % 1 BSA içeren PBS (bloklama solüsyonu) ortamına alınarak oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 5 dk inkübasyona bırakıldı. Bloklama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra % 1 BSA'lı PBS içerisinde hazırlanan primer antikorlar lamelin yüzeyini kaplayacak miktarda (50 µl hacimde) hücrelerin

üzerine uygulandı. Lameller parafilmle kapatıldı. Ardından 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. Parafilmeler çekildi. 4 kez PBS ile yıkama yapıldı. Floresan boya ile konjuge sekonder antikor, % 1 BSA’lı PBS içerisinde 1:500 oranında hazırlandı ve her lamele uygun hacimde (50 µl) uygulandı. Lameller parafilmle kapatıldı. Ardından örnekler 37 °C’de 20 dk inkübe edildi. Parafilmeler uzaklaştırıldı ve 4 kez PBS ile yıkama yapıldı. Dehidrasyonun sağlanması amacıyla hücreler –20 °C’de saklanan % 70 EtOH ve % 100 EtOH ile sırasıyla 1’er dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra lameller kültür kaplarından çıkarıldı ve kurumaları için beklendi. Lamellerin üstüne DAPI’den [(4',6-Diamidino-2-Phenylindole) DNA’ya bağlanan bir boya] 15 µl eklendi. Daha sonra lameller ters çevirilerek lamaların üzerine kapatıldı. Hazırlanmış olan örnekler floresan mikroskobu ile incelendi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. MDM2 İnhibisyonunun p53 ve AR Yolağına Etkisi

MDM2'nin AR'ın ekspresyon seviyelerini ve transkripsiyonel aktivitesini kontrol edebildiği (Lin HK et al, 2002 ; Gaughan L et al, 2005), p53'ün AR ile etkileşebileceği ve AR aracılıklı transkripsiyonun baskılanmasına yol açtığı daha önceki yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Sengupta S et al,2004; Shenk JL et al, 2001). MDM2 inhibitörü olan nutlin3a'nın seçici olarak p53 stabilizasyonuna neden olduğu bilindiğinden (Tovar et al,2006; Anshu A. et al, 2006; Shenk JL et al, 2001), çalışmamızda p53 stabilizasyonunun özellikle AR yolağı üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla LNCaP hücrelerine 24 saat süreyle 3, 6, 12, 24 ve 48  $\mu\text{M}$  nutlin3a uygulandı. Nutlin3a uygulanmış lizatlarla p53, p21, AR ve NKX3.1 proteinlerinin seviyesel değişikliği immunoblot yöntemiyle gösterildi (Şekil 4.1). Nutlin3a'nın artan konsantrasyonlarına bağlı olarak p53 proteininin 3  $\mu\text{M}$ 'lık nutlin3a uygulamasıyla başlayarak artan konsantrasyonlarda stabilize olduğu görüldü. Bununla birlikte p53'ün transkripsiyonel hedefi olan p21 proteininin p53'ün doz bağımlı stabilizasyonuna bağlı olarak seviyesinde artış gözlemlendi.



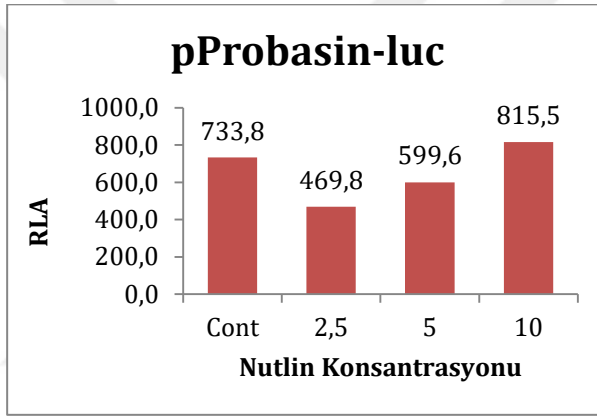
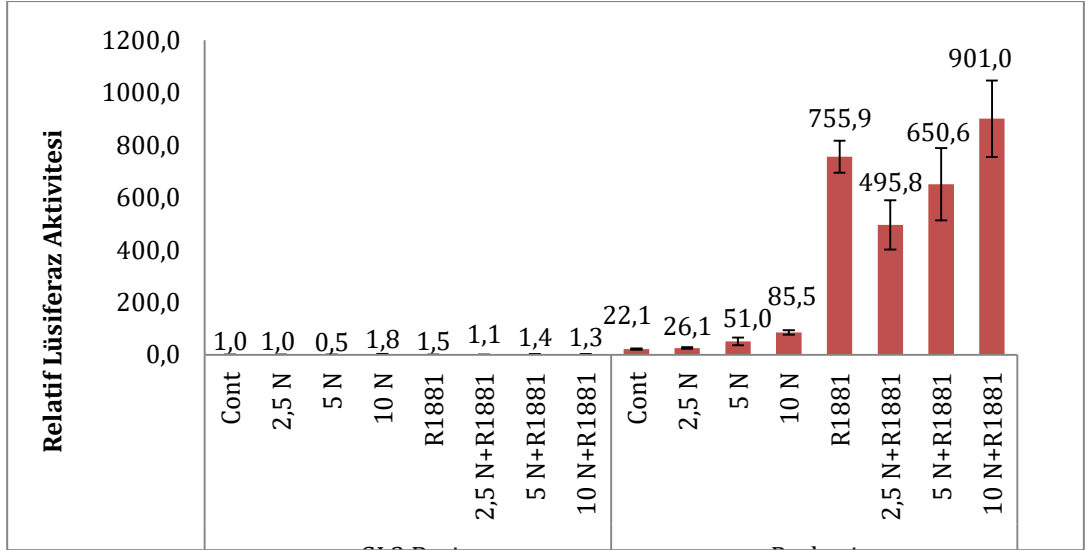
Şekil 4.1: LNCaP hücrelerine 24 saat süreyle 3, 6, 12, 24, 48  $\mu\text{M}$  nutlin3a uygulanmasıyla p53 ve AR sinyalizasyonundaki değişim.

Nutlin3a'nın 24 saat boyunca uygulanması, LNCaP hücrelerinde AR seviyelerinde doza bağlı önemli bir azalmaya neden oldu. AR seviyesindeki bu azalmanın bir sonucu olarak NKX3.1 protein seviyesi nutlin3a'nın artan konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak azaldığı gözlemlendi.

#### 4.2. Nutlin3a'nın AR Transaktivasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

p53 ve AR'nin MDM2 onkogeninin kodladığı E3 ubiquitin ligaz ile ubiquitinlendiği bilindiğinden (Logan et. al, 2007) nutlin3a'nın AR transaktivasyonu üzerindeki etkileri araştırıldı. Tasarlanan deneylerde promoter bölgesi içermeyen pGL3Basic reporter vektörü negatif kontrol olarak kullanıldı. Daha önceden pGL3Basic reporter vektörüne gen ifadesi androjen ile düzenlenerek prostatta eksprese olduğu bilinen (Yeung et al. 2003) probasin geninin promotör bölgesi klonlanarak elde edilmiş olan pProbasin reporter vektörü pozitif kontrol olarak kullanıldı. 96 gözlü hücre kültür kabının bir gözüne  $10^4$  LNCaP hücresi olacak şekilde 48 göze ekim yapıldı. Hem pozitif hem de negatif kontrol reporter vektörleri FugeneHD transfeksiyon ajanı kullanılarak transfekte edildi. 24 saat beklemenin ardından hücelere sentetik androjen olan R1881 (10nM, 6saat) varlığında ve yokluğunda 24 saat süre ile 2.5, 5 ve 10  $\mu$ M konsantrasyonlarda nutlin3a ile birlikte uygulandı. Ölçüm kitinin prosedürüne uygun olarak yapılan lüsiferaz deneyinde, uygulamanın ardından lüsiferaz aktivitesi (RLA) ölçüldü. Firefly aktivitesinin protein konsantrasyonuna bölünmesi ile normalizasyonu yapılan ve pGL3Basic ile transfekte edilen kontrol hücrelerine göre RLA'deki kat değişimi grafiklendi (şekil 4.2A).

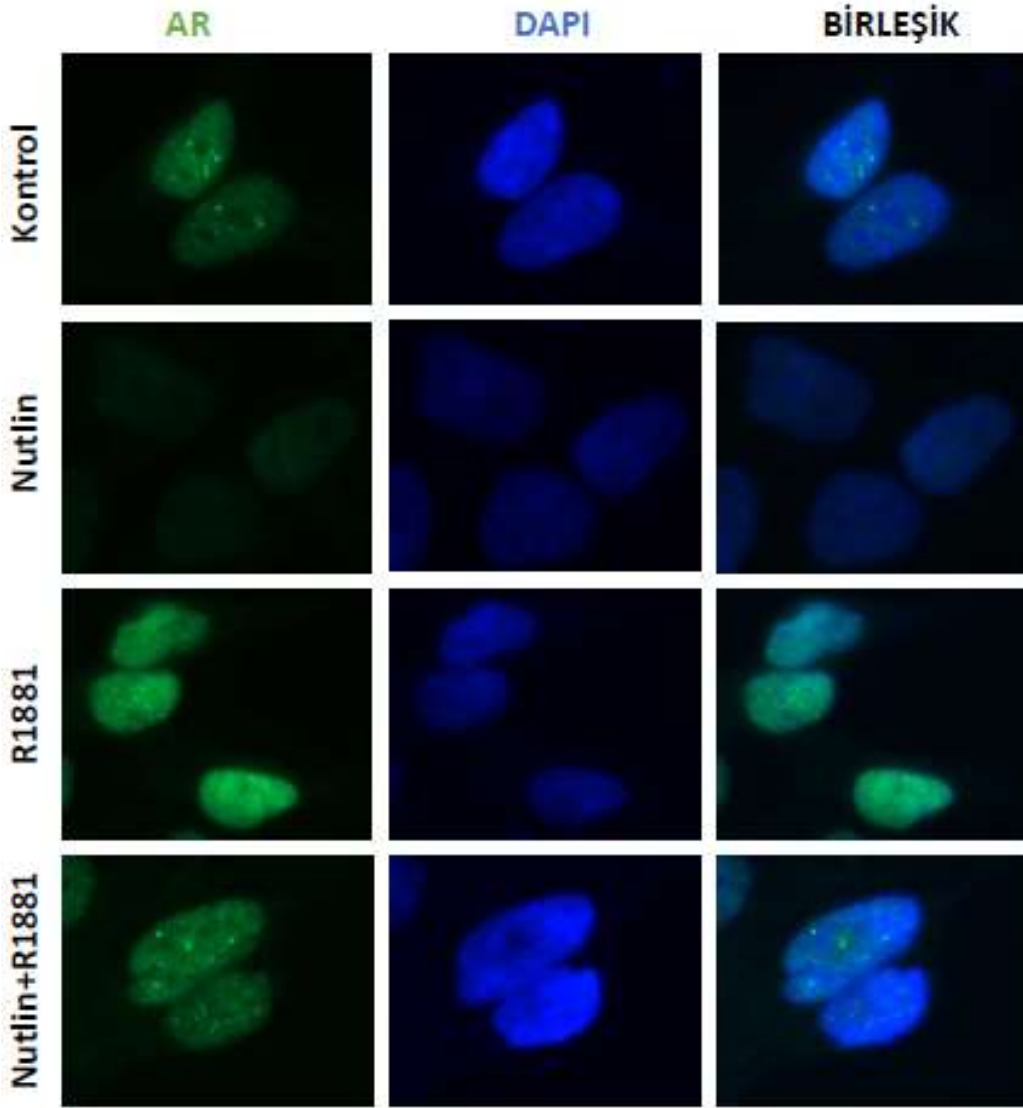
pGL3Basic reporter vektörü transfekte edilen LNCaP hücrelerinde anlamlı aktivite gözlenmezken pProbasin reporter vektörü transfekte edilmiş olan LNCaP hücrelerinde R1881 uygulanmamış olan hücre grubunda bir miktar aktivite gözlenmektedir. Bu bazal aktiviteyi temsil etmektedir. Pozitif kontrol grubunda kontrol hücrelerine göre R1881 uygulanan hücre grubunda androjenin etkisiyle yaklaşık 34 katlık artış gözlenmektedir. Bu sonuç reporter assay için kullandığımız araçların çalıştığını göstermektedir. pProbasin-luc lüsiferaz vektörü transfekte edilmiş LNCaP hücreleriyle hazırlanan deney grubunda androjen yokluğunda kontrol, 2.5, 5 ve 10  $\mu$ M nutlin3a uygulanmış hücrelerde lüsiferaz aktivitesi sırasıyla 22.1, 26.1, 51.0 ve 85.5 RLA iken 10nM androjen uygulaması ile lüsiferaz aktivitesi sırasıyla 755.9, 495.8, 650.6 ve 901.0 RLA olarak gözlendi. Pozitif kontrol grubu olan pProbasin transfekte edilen hücrelerden androjen uygulanmış hücrelerdeki aktiviteden androjen uygulanmamış olan bazal aktivite çıkarılarak androjenin etkisiyle gerçekleşen relatif lüsiferaz aktivitesi grafiklendi (Şekil 4.2B).



Şekil 4.2: A: Nutlin3a'nın LNCaP hücrelerinde AR transaktivasyonuna etkisi. B: pProbasin-luc transfekte edilmiş LNCaP hücrelerinde relative lüsiferaz aktivitesi. Cont: Kontrol, 2,5 N: 2,5  $\mu$ M nutlin3a, 5N: 5  $\mu$ M nutlin3a, 10N: 10  $\mu$ M nutlin3a

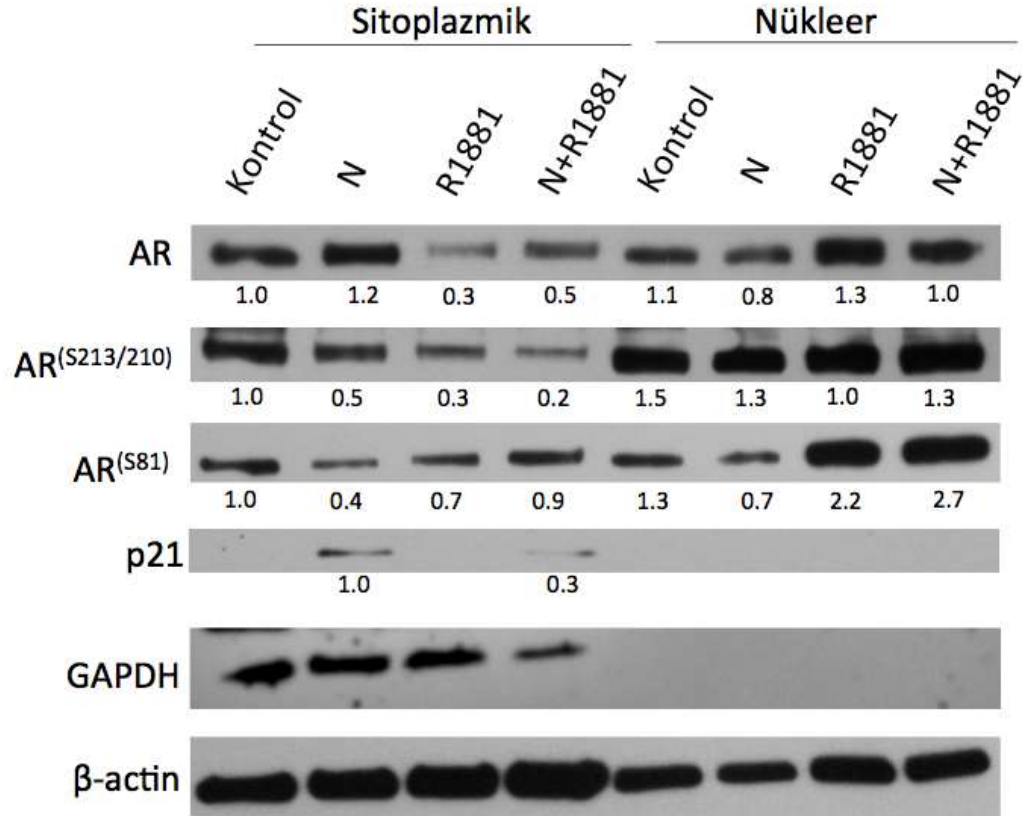
#### 4.3. Nutlin3a'nın AR Translokasyonuna Etkisi

Nutlin3a uygulanmış LNCaP hücrelerinde AR'nin hücre içi yerleşiminin araştırılması amacıyla androjen varlığında ve yokluğunda 2,5 $\mu$ M nutlin3a ile 24 saat süreyle muamele edildi. İmmünofloresan yöntemi ile araştırıldı. Kontrol hücrelerinde hem sitoplazmik hem nükleer olarak bulunabilen AR, nutlin3a uygulamasıyla nükleusta önemli ölçüde azalmıştır. Hücelere androjen uygulanmasıyla nükleusta önemli miktarda AR birikimi gözlenirken, androjen varlığında nutlin3a uygulamasıyla birlikte AR'nin nükleusta azaldığı sitoplazmada ise kontrole göre bir miktar arttığı görüldü (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: R1881 varlığında ve yokluğunda nutlin3a (2,5  $\mu$ M,24 saat) uygulanmış LNCaP hücrelerinde AR yerleşimi.

Nutlin3a uygulamasına bağlı olarak AR'nin sitoplazma ve nükleer yerleşimdeki değişikliğinin sebebinin belirlenmesi ve azalan transaktivasyonun doğrulanması amacıyla, androjen varlığında ve yokluğunda 2,5 $\mu$ M nutlin3a ile 24 saat süreyle muamele edilen LNCaP hücrelerinden sitoplazmik ve nükleer proteinler ayrı olarak izole edildi ve AR, p-AR ser-81, p-AR ser-213/210, p21, GAPDH ve  $\beta$ -actin proteinlerinin seviyeleri western blot tekniği ile karşılaştırıldı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: LNCaP hücrelerinde nutlin3a (2,5 µM, 24 saat) uygulaması sonucunda AR ve p21'in seviyesel değişimi ve hücre içi yerleşimi. N: Nutlin3a

Elde edilen sonuçlar imageJ programında β-actin'e göre normalize edilerek dansitometrik analizi yapıldı ve her proteinin sitoplazmik kontrolüne göre kat değişikliği olarak elde edilen değerler Şekil4.4'te görüldüğü gibi ilgili bandın altına yazıldı.

Total AR'nin sitoplazmada kontrole göre nutlin3a uygulanmış hücrelerde 0.8 kat (1.0/1.2) artarken nükleusta 1.4 (1.1/0.8) kat azaldığı gözlemlendi. AR'nin transkripsiyonel aktivitesini etkileyen fosforilasyonlarda da değişiklik olup olmadığını anlamak için AR ser-81 ve AR ser-213/210 fosforilasyonlarını da inceledik. AR ser-81 fosforilasyonu sonucunda nükleer lokalizasyonu artmış olup nutlin3a etkisiyle bu fosforilasyonda sitoplazmada kontrole göre 2.5 kat (1.0/0.4) azalırken, nükleusta 1.9 (1.3/0.7) kat azaldığı görüldü. AR ser-213/210 fosforilasyonu sitoplazmada kontrole göre 2 kat (1.0/0.5) azalırken nükleusta 1.2 kat (1.5/1.3) azaldığı görülmüştür. AR ser-213/210 fosforilasyonunun androjen uygulanan hücrelerde kontrole göre sitoplazmada 3 kat, nükleusta ise 1.5 kat

azaldığı görüldü. Androjen ile birlikte nutlin3a uygulanmış hücrelerde yalnız nutlin3a uygulanan hücelere göre sitoplazmada 2.1 kat azalırken nükleusta 1.2 kat arttığı görüldü.

LNCaP hücrelerinde nutlin3a uygulamasının apoptotik yanıtı incelendiğinde androjen varlığında ve yokluğunda nutlin3a uygulanan hücrelerde yalnızca sitoplazmada protein ekspresyonunda değişim gözlemlendi. Kontrol hücrelerinde p21 protein ekspresyonu gözlenmezken nutlin3a etkisiyle sitoplazmik seviyesinin arttığı gözlemlendi. Aynı şekilde yalnızca androjen uygulanan hücrelerde p21 protein ekspresyonu gözlenmezken androjen varlığında nutlin3a etkisiyle sitoplazmada sitoplazmik seviyesinin arttığı gözlemlendi.



## 5. TARTIŞMA

Prostat kanserinin progresyonu sırasında, kritik hücrel yolaklarda mutasyonlar meydana gelir ve böylece tümör antikanser tedavilerinden kurtulur. Ortaya çıkan önemli bir mutasyon, tümör baskılayıcı transkripsiyon faktörü p53 ile ilgilidir (Guseva NV., et al.) Metastatik prostat kanserlerde p53 mutasyonları sık görülürken primer prostat kanserinde p53 mutasyonları nadirdir. Fonksiyonel p53'e sahip tümör hücrelerinin aktive edilmesi tedavi için umut vericidir. Ayrıca Huggins ve Hodges, prostat kanserinin androjen yoksunluğuna duyarlılığını ilk kez gösterdiğinden prostat kanserinin büyüme ve sağkalım için AR aktivasyonuna bağlı olduğu açıktır (Davey R.A and Grossmann M., 2016). AR aktivitesini düzenleyen yollardan biri p53-MDM2 etkileşimidir. Androjen bağımlı prostat kanseri hücre hattı LNCaP hücrelerinde androjen sinyali, stabilize p53'ün AR geni promotörüne rekabet ederek bağlanmasını dolayısıyla da AR sinyalizasyonunun azaltılmasını kolaylaştırmaktadır. Yabanıl tip p53'ü eksprese eden kanser hücrelerindeki p53 yolağı, MDM2 spesifik inhibitörü olan nutlin3a ile aktive edilebilmektedir (Lin HK., et al., 2002).

Bu tez çalışmasında nutlin3a varlığında p53 stabilizasyonunun AR'ın transkripsiyonel hedeflerine bağlanma dinamiğini, hücre içi yerleşimini nasıl etkilediği ve AR transaktivasyonu üzerindeki etkisi androjene yanıt veren ve yabanıl tip p53'e sahip olan prostat kanseri hücre hattı olan LNCaP hücrelerinde araştırıldı.

Logan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada LNCaP hücrelerine 24 saat nutlin3a uygulaması yapıldıktan sonra western blot deneyi yapılmıştır. Deney sonuçlarına göre p53'ün korunduğu ve onun transkripsiyonel hedefi olan p21 proteininin stabilize olduğu, AR proteininin azaldığı görülmüştür. Ayrıca LNCaP hücrelerinde nutlin3a'nın apoptotik etkisini araştırmak amacıyla clv-kaspaz3, clv-kaspaz8, p53 proteinine bakılmış ve bu proteinlerin seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. (Logan I.R. at al). Bu tez çalışmasında transkripsiyonel aktivite, nutlin3a uygulanarak p53 ve/veya MDM2 aracılı AR seviyesel değişikliği artan konsantrasyonlarda uygulanarak araştırıldı. Nutlin3a varlığında p53 stabilizasyonunun özellikle AR yolağı üzerindeki etkisi için p53, p21, AR ve

NKX3.1 protein seviyelerine bakıldı. Logan'ın sonuçlarına benzer şekilde western blot sonuçlarımızda p53'ün korunduğu ve p21 proteininin de stabilize olduğu görüldü.

Daha önceki p53 stabilizasyonu çalışmalarından elde edilen veriler ile deney sonuçlarımız karşılaştırıldığında, nutlin3a'nın AR seviyesini değiştirerek transaktivasyonu baskılamış olabileceği düşünüldü. AR transaktivasyonunun bir sonucu olarak androjen duyarlı hücre hatlarında NKX3.1 ekspresyon değişikliklerinin kontrol olarak kullanılması ile sonuçlarımızda NKX3.1 seviyesinin azaldığı ve bu azalışın AR transaktivasyonunun baskılanması ile gerçekleştiği görüldü (Şekil 4.1).

Nutlin3a'nın AR transaktivasyondaki etkisinin doğrulanması amacıyla lüsiferaz reporter assayi yapıldı. pProbasin-luc transfekte edilen LNCaP hücrelerinde androjen uygulanmış olan kontrol, 2.5, 5 ve 10  $\mu$ M nutlin3a uygulanmış hücre grubunun lüsiferaz aktivitesinden androjen uygulanmamış hücrelerin bazal aktivitesi çıkarıldığında aktivitenin kontrol, 2.5, 5 ve 10  $\mu$ M nutlin3a konsantrasyonlarında sırasıyla 733.8, 469.8, 599.6, 815.5 olduğu görüldü (Şekil 4.2B). Elde ettiğimiz sonuçlara göre nutlin3a'nın 2.5 ve 5  $\mu$ M konsantrasyonunda AR transaktivasyonunun baskılandığı ancak ilginç bir şekilde artan doza bağlı olarak AR transaktivasyonunu artırdığı gözlemlendi. Çalışılan dozlar içinde en iyi baskılanma 2.5  $\mu$ M konsantrasyonda gerçekleştiği için daha sonraki tasarlanan deneylerde nutlin3a'nın 2,5  $\mu$ M kullanılmasına karar verildi.

2.5  $\mu$ M konsantrasyondaki nutlin3a aracılı AR transaktivasyonundaki baskılanma ile AR translokasyonu üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla immünofloresan deneyi yapıldı ve nutlin3a uygulanmış hücrelerde AR'nin nükleusta kontrol hücrelerine göre anlamlı miktarda azaldığı gözlemlendi. Androjen varlığında nutlin3a uygulanmış hücrelerde yalnızca androjen uygulanmış hücrelere göre AR'nin nükleusta azaldığı gösterildi ve bu azalmanın sebebinin sitoplazmik tutulum olabileceği düşünüldü. Bunu araştırmak amacıyla aynı deney seti ile sitoplazmik-nükleer fraksiyonlama yapıldı ve western blot analizi ile AR fosforilasyonları ile total AR, p21, GAPDH ve  $\beta$ -actin protein seviyeleri araştırıldı.

Total AR'nin sitoplazmada kontrole göre nutlin3a uygulanmış hücrelerde 0.8 kat (1.0/1.2) artarken nükleusta 1.4 (1.1/0.8) kat azaldığı gözlemlendi. Androjen ile birlikte nutlin3a uygulanmış hücrelerde yalnız androjen uygulanan hücrelere göre nükleusta 1.3 kat (1.3/1.0) azalma olurken sitoplazmada 0,6 kat (0.3/0.5) artış görüldü. Nutlin3a uygulanan örneklerde total AR seviyesi nükleusta azalırken sitoplazmada arttığı görüldü. Bunun üzerine AR fosforilasyonları incelendi. AR'nin, sadece steroid hormonu olan androjen ile değil, kinazlar da dahil olmak üzere diğer yollardan gelen sinyaller için de bir toplanma noktası olduğu açıktır (Gioeli D. et. al., 2002). Bilindiği gibi androjen aktivitesi çoklu fosforilasyon bölgelerinde fosforilasyon yoluyla düzenlenebilmektedir. Fosforilasyon ile modifikasyonlar hücrel lokalizasyonu, stabiliteyi ve transkripsiyonel aktiviteyi içeren AR fonksiyonunu değiştirebilmekte ve sonuçta hastalık ilerlemesinde değişikliklere sebep olabilmektedir (Daniels G. et al., 2013). Prostat kanseri hücrelerinde AR ser-81 fosforilasyonunun arttığı (Li Z. et al.,2006; Chen S. et al., 2006) ve AR'nin nükleer lokalizasyonunun arttığı bilinmektedir (Chen S. et al., 2012). Bizim sonuçlarımızda da ser-81 fosforilasyonu sonucunda nükleusta AR lokalizasyonu artmış olup nutlin3a etkisiyle bu fosforilasyonda sitoplazmada kontrole göre 2.5 kat (1.0/0.4) azalırken, nükleusta 1.9 (1.3/0.7) kat azaldığı görüldü. Androjen ile birlikte nutlin3a uygulanmış hücrelerde androjen uygulanan hücrelere kıyasla ser-81 fosforilasyonunun nükleusta 0.8 kat (2.2/2.7) arttığı görüldü. Benzer şekilde ser-213/210 fosforilasyonu androjenle birlikte nutlin3a uygulanmış hücrelerde yalnız androjen uygulanan hücrelere kıyasla nükleusta 0.8 kat (1/1.3) arttığı görüldü.

Nükleusta serin fosforilasyonlarının seviyesinin artmasına karşın total AR seviyesinde nükleusta azalma meydana gelirken sitoplazmada artış olması nutlin3a'nın AR fosforilasyonlarını etkilemediği ancak AR'nin sitoplazmada tutulumuna veya nükleustan sitoplazmaya taşınma neden olduğunu göstermektedir.

## 6. SONUÇ

Tez çalışması için prostat kanserinde önemli role sahip olan AR'ın p53 stabilizasyonu durumunda transaktivasyonu ve translokasyonunun nasıl etkilediği LNCaP prostat kanseri hücre hattında araştırıldı. p53 stabilizasyonu için spesifik MDM2 inhibitörü olan nutlin3a kullanıldı. İnhibitörün p53 stabilizasyonu sağladığı, p21 protein seviyesini artırarak apoptoza katkıda bulunduğu, AR yolağına etki ettiği AR protein seviyesinde azalma ve AR'ın transkripsiyonel hedefi olan NKX3.1 protein seviyesinde azalma meydana geldiği görüldü. AR yolağındaki bu değişim lüsiferaz reporter aktivitesine bakılarak da incelendiğinde nutlin3a'nın doz bağımlı olarak transaktivasyonu baskıladığı ve en etkili dozun düşük doz (2,5  $\mu$ M) olduğu görüldü. Düşük doz nutlin3a uygulanmasıyla yapılan hücre içi lokasyon ve fraksiyonlama deney sonuçlarına göre nutlin3a AR'nin sitoplazmik lokalizasyonunu arttırıp nükleer translokasyonunu azaltarak transkripsiyonel aktivitesini inhibe ettiği görüldü.

**KAYNAKLAR DİZİNİ**

- Alastair D. Lamb, Charlie E. Massie and David E. Neal.,** 2014, The transcriptional programme of the androgen receptor (AR) in prostate cancer. *BJU Int*, (113), 358–366.
- Agrawal A, Yang J, Murphy R.F., Agrawal D. K.,** 2006, Regulation of the p14ARF-Mdm2-p53 pathway: An overview in breast cancer. *Experimental and Molecular Pathology*, (81) 115–122.
- Arnold, J.T. and Isaacs, J.T,** 2002, Mechanisms involved in the progression of androgen-independent prostate cancers: it is not only the cancer cell's fault, *Endocr. Relat. Cancer*, (9) 61–73.
- Bairbe A. McNicholas an Matthew D. Griffin,** 2012, Double-edged sword: a p53 regulator mediates both harmful and beneficial effects in experimental acute kidney injury. *Kidney International* (81), 1161 – 1164.
- Bond GL, Hu W, Levine AJ,** 2005, MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting. *Curr Cancer Drug Targets*, (5), 3-8.
- Brown CJ, Goss SJ, Lubahn DB, Joseph DR, Wilson EM, French FS, et al.,** 1989, Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11–12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet*, (44), 264–9.
- Brown CJ, Lain S, Verma CS, Fersht AR, Lane DP.,** 2009, Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat Rev Cancer*, (9), 862-873.
- Chen S, Xu Y, Yuan X, Bublely GJ, Balk SP.,** 2006, Androgen receptor phosphorylation and stabilization in prostate cancer by cyclin-dependent kinase 1., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, (103), 15969–15974.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Chen S, Gulla S, Cai C, Balk SP.**, 2012, Androgen receptor serine 81 phosphorylation mediates chromatin binding and transcriptional activation. *J Biol Chem.* (287), 8571–8583.
- Chrisofos, M., Papatsoris, A.G., Lazaris, A. et al.**, 2007, Precursor lesions of prostate cancer. *Crit. Rev. Clin. Lab Sci.*, (44), 243–70.
- Daniels G., Pei Z, Logan S. K., Lee P.**, Mini-review: androgen receptor phosphorylation in prostate cancer, 2013, *Am J Clin Exp Urol.*, 1 (1), 25–29.
- Davey R.A. and Grossmann M.**, Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside, 2016, *Clin Biochem Rev* 37 (1).
- De Marzo, A.M., Marchi, V.L., Epstein, J.I. et al.**, 1999, Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis, *Am. J. Pathol.*, (155), 1985–92.
- De Marzo, A.M., Nelson, W.G., Isaacs, W.B. et al.**, 2003a, Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet*, (361), 955–64.
- De Marzo, A.M., Meeker, A.K., Zha, S. et al.**, 2003b, Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology*, (62), 55–62.
- Fowler JE, Whitmore WF.**, 1982, Considerations for the use of testosterone with systemic chemotherapy in prostate cancer. *Cancer*, (49), 1373–1377.
- Gaughan L, Logan IR, Neal DE and Robson CN.**, Regulation of androgen receptor and histone deacetylase 1 by Mdm2-mediated ubiquitylation. 2005, *Nucleic Acids Res.*, 33(1), 13-26.
- Gelmann EP.**, Molecular biology of the androgen receptor, 2002, *J Clin Oncol*, (20), 3001–15.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Guseva NV, Rokhlin OW, Bair TB, Glover RB, Cohen MB.,** Inhibition of p53 expression modifies the specificity of chromatin binding by the androgen receptor, 2012, *Oncotarget*, (3), 183-94.
- Harris SL, Levine AJ.,** The p53 pathway: positive and negative feedback loops, 2005 *Oncogene*, (24), 2899-2908.
- Hoffman RM.** Clinical practice. Screening for prostate cancer, 2011, *N Engl J Med*, (365) 2013–9.
- Honda R, Tanaka H, Yasuda H.,** 1997, MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53, *Oncoprotein*, *FEBS Lett* (420) 25-27.
- Ian R. Logan, Hesta V. McNeill, Susan Cook, Xiaohong Lu, John Lunec, and Craig N.,** Analysis of the MDM2 Antagonist Nutlin-3 in Human Prostate Cancer Cells, 2007, *The Prostate*, (67), 900-906.
- Lee D.,** High androgen receptor levels are predictive of decreased survival in prostate cancer, 2003, *Clin Prostate Cancer*, (2), 13–14.
- Levine A. J.,** p53, the cellular gatekeeper for growth and division, 1997, *Cell*, (88), 323–331.
- Li Z, Szabolcs M, Terwilliger JD, Efstratiadis A.,** 2006, Prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma in mice expressing a probasin-Neu oncogenic transgene. *Carcinogenesis*. (27), 1054–1067.
- Lin HK, Wang L, Hu YC, Altuwajri S, Chang C.,** 2002, Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *EMBO J*, (21), 4037-4048.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Logan IR, McNeill H.V., Cook S., Lu X, Lunec J., Robson C.N.,** 2007, Analysis of the MDM2 Antagonist Nutlin-3 in Human Prostate Cancer Cells, *The Prostate*, (67), 900-906.
- Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM.,** 1988, Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome, *Science* (240), 327–30.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al.,** The nuclear receptor superfamily: the second decade, 1995, *Cell*, (83), 835–9.
- Mariotto AB, Yabroff KR, Shao Y, Feuer EJ, Brown ML.,** Projections of the cost of cancer care in the United States: 2010–2020. 2011, *J Natl Cancer Inst* (103), 117–28.
- McNeal, J.E.,** 1969, Origin and development of carcinoma in the prostate, *Cancer*, (23) 24–34.
- McNeal, J.E.,** 1988, Normal histology of the prostate. *Am. J. Surg. Pathol.*, (12), 619–33.
- MH Eileen TAN, Jun LI, H Eric XU Karsten MELCHER, Eu-leong YONG.** Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. 2015, *Acta Pharmacologica Sinica* (36), 3–23.
- Migeon BR, Brown TR, Axelman J, Migeon CJ.,** 1981, Studies of the locus for androgen receptor: localization on the human X chromosome and evidence for homology with the Tfm locus in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (78), 6339–43.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- MV, Schulz WA, Burchardt T, Ackermann R, Burchardt M.**, Inhibition of p53 function diminishes androgen receptor-mediated signaling in prostate cancer cell lines, 2004, *Oncogene*, (23), 3541-3549.
- Nesslering NJ, Shi XB, deVere White RW.**, Androgen-independent growth of LNCaP prostate cancer cells is mediated by gain-of-function mutant p53, 2003, *Cancer Res*, (63), 2228-2233.
- Rinker-Schaeffer, C.W., Partin, A.W., Isaacs, W.B. et al.**, 1994, Molecular and cellular changes associated with the acquisition of metastatic ability by prostatic cancer cells, *Prostate*, (25), 249–65.
- Ruijter, E.T., van de Kaa, C.A., Schalken, J.A. et al.**, 1996, Histological grade heterogeneity in multifocal prostate cancer. Biological and clinical implications. *J. Pathol.*, (180), 295–9.
- Sasaki M, Kaneuchi M, Sakuragi N, Fujimoto S, Carroll PR, Dahiya R.**, The polyglycine and polyglutamine repeats in the androgen receptor gene in Japanese and Caucasian populations, 2003, *Biochem Biophys Res Commun*, (312), 1244–7.
- Schatzl G, Madersbacher S, Gsur A, Preyer M, Haidinger G, Haitel A, Vutuc C, Micksche M, MarbergerM.**, Association of polymorphisms within androgen receptor, 5 $\alpha$ -reductase, and PSA genes with prostate volume, clinical parameters, and endocrine status in elderly men. 2002, *Prostate*, (52), 130–138.
- Schoenmakers E, Verrijdt G, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W, Claessens F.**, Differences in DNA binding characteristics of the androgen and glucocorticoid receptors can determine hormone-specific responses, *J Biol Chem* 2000, (275) 12290-7.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Sengupta S, Wasylyk B.**, 2004, Physiological and pathological consequences of the interactions of the p53 tumor suppressor with the glucocorticoid, androgen, and estrogen receptors. *Ann N Y Acad Sci*, (1024), 54–71.
- Shenk JL, Fisher CJ, Chen SY, Zhou XF, Tillman K, Shemshedini L.**, 2001, p53 represses androgen-induced transactivation of prostate-specific antigen by disrupting hAR amino- to carboxyl-terminal interaction. *J Biol Chem*, (276) 38472-38479.
- Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, et al.**, 2012, Cancer treatment and survivorship statistics, *CA Cancer J Clin*, (62), 220–41.
- Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, Higgins B, Kolinsky K, Hilton H, Zhao X, Vu BT, Qing W, Packman K, et al.**, 2006, Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:1888-1893.
- Tovar C., Higgins B., Kolinsky K., Xia M., Packman K., Heimbrook D. C. and Vassilev L.T.**, 2011, MDM2 antagonists boost antitumor effect of androgen withdrawal: implications for therapy of prostate cancer. *Molecular Cancer*, 10:49.
- Untergasser, G., Madersbacher, S. and Berger, P.**, 2005, Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling, *Exp. Gerontol.*, (40), 121–8.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ.**, 2000, Surfing the p53 network. *Nature*, (408), 307-310.
- Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ.**, 1993, The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop, *Genes Dev*, (7), 1126-1132.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Yeung LHY, Read JT, Sorenson P, Nelson CC, Gleave M, Jia W & Rennie PS.**, Identification and characterization of a prostate-specific androgen-independent protein-binding site in the probasin promoter, 2003, *Biochem J*, (371), 843-855.

**Zetter, B.R.**, 1990, The cellular basis of site-specific tumor metastasis, *N. Engl. J. Med.*, (322), 605–12.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı: Gülseren Özduman

Uyruk: Türkiye Cumhuriyeti

Doğum tarihi: 20.07.1991

Doğum yeri: İzmir / TÜRKİYE

Tel: 0-554 777 7509

e-mail: gulserenozduman238@gmail.com

### Eğitim

Lisans (2009-2015)

Biyoloji Bölümü - Moleküler Biyoloji ve Genetik alt dalı

Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

Yüksek Lisans (2016-2018)

Biyoteknoloji Anabilimdalı, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

### Araştırma Deneyimleri

Yüksek lisans araştırması (2016-2018)

**Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye**

Biyomühendislik Bölümü, Kanser Moleküler Biyolojisi Laboratuvarı,

Prof. Dr. Kemal S. Korkmaz;

*Androjen Reseptörünün olası hedeflerine bağlanma dinamiğinin çalışılması*

Lisans araştırması (2013-2014)

**Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye**

Biyomühendislik Bölümü, Kanser Moleküler Biyolojisi Laboratuvarı,

Prof. Dr. Kemal S. Korkmaz;

*GSK3 $\beta$  inhibisyonuna bağlı olarak değişen sentrozom yapılarının çalışılması*

Yaz stajı (2013)

**İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye**

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Maya Laboratuvarı

Prof. Dr. Ahmet Koç

*Mayada yaşlılık genlerinin çalışılması amacıyla yapılan Plasmid DNA izolasyonu, PCR, Agaroz Jel Elektroforezi gibi moleküler biyolojik yöntemlerin öğrenilmesi*

Yaz stajı (2012)

**Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye**

Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı

Prof. Dr. Cumhuri Gundüz

*Moleküler tanı amacıyla kit yardımıyla kandan DNA ve RNA izolasyonu yöntemlerinin öğrenilmesi*

### **Bilimsel Bildiri**

Gulseren Ozduman, Bilge Debelec Butuner, Kemal Sami Korkmaz, Nutlin3a contributes to the cytoplasmic retention of Androgen Receptor, 2018 Dec 6, 10.3390/proceedings2251580, MDPI.

### **Bilimsel Makale**

*Bilge Debelec Butuner, PhD; Mustafa Kotmakci; Ezgi Oner; Gulseren Ozduman; Ayse Gulden Kantarci, Nutlin3a Loaded Nanoparticles Show Enhanced Apoptotic Activity on Prostate Cancer Cells (Proofreading)*

### **Bilimsel Kurs ve Etkinlikler**

1. Gastroenterolojide Uygulamalı Temel Hücre Kursu, 5 Ekim 2018, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir.
2. 2<sup>nd</sup> International Cell Death Research Congress, 01-04 November 2018, Wyndham Grand İzmir Özdilek, İzmir.
3. Akan Hücre Ölçer Çalıştayı, 13 Kasım 2018, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir.

