



T.C.

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İLAÇ ARAŞTIRMA ve GELİŞTİRME ANABİLİM DALI

**PROSTAT KANSERİNDE ENDOPLAZMİK RETİKULUM ARACILI YIKIM
(ERAD) YOLAĞININ VİTAMİN D ve VİTAMİN D RESEPTÖRÜ ARACILI
REGÜLASYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN

Esra AYDOĞDU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Yalçın ERZURUMLU

ISPARTA-2022

KABUL VE ONAY SAYFASI

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **İlaç Araştırma ve Geliştirme Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05/09/2022

Danışman : **Dr. Öğr. Üyesi Yalçın ERZURUMLU**
Süleyman Demirel Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı

Üye : **Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Tilahun MUHAMMED**
Süleyman Demirel Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı

Üye : **Doç. Dr. Sinem Ezgi TURUNÇ ÖZOĞLU**
İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı

ONAY: Bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'na belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY
Enstitü Müdürü

BEYAN

“Prostat Kanserinde Endoplazmik Retikulum Aracılı Yıkım (ERAD) Yolağının Vitamin D ve Vitamin D Reseptörü Aracılı Regülasyonunun Araştırılması” adlı Yüksek Lisans tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tezi Hazırlayan

Esra AYDOĞDU

İmza

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Yalçın ERZURUMLU

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesini benimle paylaşarak beni başarılı olmam yönünde destekleyen, çalıştığım alanda tecrübe kazanmamı sağlayan, araştırmanın her aşamasında bana rehberlik eden ve öğrencisi olmaktan onur duyduğum danışman hocam *Dr. Öğr. Üyesi Yalçın ERZURUMLU*'ya,

Tez çalışmamda kullandığım İnsan prostat adenokarsinoma LNCaP hücre hattını armağan eden *Prof. Dr. Fahri SAATÇIOĞLU* (Oslo Üniversitesi Biyolojik Bilimler Bölümü, Norveç)'na,

Süleyman Demirel Üniversitesi iç fonları (TSG-2021-8302, TAB-2020-8253) tarafından destek sağlayan *Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü ve Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi*'ne,

Makine-Teçhizat alt yapısından faydalandığımız *Süleyman Demirel Üniversitesi- Yenilikçi Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (YETEM)*'ne,

Araştırma olanaklarından faydalandığım *Süleyman Demirel Üniversitesi Eczacılık Fakültesi*'ne

Çalışmaya katılımlarıyla destek sağlayan değerli arkadaşlarım *Hatice Kübra DOĞAN* ve *Deniz ÇATAKLI* ya,

Hayatımın her anında hep yanımda olan, sevgilerini ve desteklerini her zaman hissettiğim *aileme*,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Esra AYDOĞDU

ISPARTA, 2022

ÖZET

Prostat Kanserinde Endoplazmik Retikulum Aracılı Yıkım (ERAD) Yolağının Vitamin D ve Vitamin D Reseptörü Aracılı Regülasyonunun Araştırılması

Prostat kanseri erkeklerde en sık teşhis edilen kanser türlerinden biridir. Steroid hormon sinyali, tümör ilerlemesinde ve prostat kanserinde Endoplazmik retikulum aracılı yıkım (ERAD) ve katlanmamış protein yanıtı (UPR) gibi moleküler sinyal ağlarının düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir. $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, steroid hormon olarak sınıflandırılan D vitamininin aktif metabolitidir. $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 'ün anti-tümör aktivitesi çok sayıda çalışmada rapor edilmiştir. Tümör gelişimi ile ilişkili mekanizmaları inhibe ederek anjiyogenez ve hücre döngüsü ilerlemesinin baskılanması dahil olmak üzere anti-tümör etkiler sergiler. Ayrıca, prostat kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde giderek azalan VDR ekspresyon seviyeleri gözlemlendiği rapor edilmiştir.

Bu çalışmada ilk kez $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ aracılı VDR sinyalinin Hrd1, gp78, p97/VCP, Ufd1 ve Npl4 dahil olmak üzere ERAD bileşenlerinin protein ekspresyon seviyesini negatif olarak düzenlediğini gösterdik. Ayrıca $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ uygulamasının Hrd1, gp78, p97/VCP, Ufd1, Npl4, Ufd2 ve Derlin1 gibi çok sayıda ERAD geninin mRNA ifade düzeylerini negatif olarak düzenlediğini, ERAD'ın endojen inhibitörü olan SVIP mRNA ifadesinin ise pozitif düzenlendiğini belirledik. $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ uygulamasının UPR'nin IRE1 α ve PERK kollarının farklı şekilde kontrol ettiğini bulduk. Ek olarak, verilerimiz $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 'ün etkisinin LNCaP hücreleriyle sınırlı olmadığını gösterdi. Tutarlı bir şekilde, diğer prostat kanseri hücresi olan 22Rv1 hücrelerinde de benzer sonuçlar elde edildi. Son olarak transkripsiyonel ve translasyonel inhibitörler ile gerçekleştirdiğimiz çalışma bulguları $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 'ün ERAD ve UPR bileşenlerini transkripsiyonel düzeyde düzenlediğini gösterdi.

Toplu olarak, sonuçlarımız $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ aracılı sinyal mekanizmasının prostat kanseri hücrelerinde ERAD ve UPR mekanizmalarını sıkı bir şekilde düzenlediğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, D vitamini, D Vitamini Reseptörü (VDR), Prostat Kanseri, Endoplazmik Retikulum Aracılı Yıkım (ERAD), Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR)

ABSTRACT

Investigation of Vitamin D And Vitamin D Receptor-Mediated Regulation of The Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation (ERAD) Pathway in Prostate Cancer

Prostate cancer is one of the most common types of cancer diagnosed in men. Steroid hormone signaling is critical in tumor progression and regulating molecular signaling networks such as Endoplasmic reticulum-mediated degradation (ERAD) and unfolded protein response (UPR) in prostate cancer. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ is the active metabolite of vitamin D, which is classified as a steroid hormone. The anti-tumor activity of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ has been reported in numerous studies. It exhibits anti-tumor effects by inhibiting mechanisms associated with tumor development such as suppression of angiogenesis and cell cycle progression. In addition, it has been reported that gradually decreasing VDR expression levels are observed in many cancer types, including prostate cancer.

Here we first time showed that $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mediated VDR signaling negatively regulates the protein expression level of ERAD components including Hrd1, gp78, p97/VCP, Ufd1, and Npl4. Also, we determined that $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ administration negatively regulated the mRNA expression levels of numerous ERAD genes such as Hrd1, gp78, p97/VCP, Ufd1, Npl4, Ufd2 and Derlin1, while SVIP mRNA expression, which is the endogenous inhibitor of ERAD, was positively regulated. Moreover, we found that $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ administration differentially controls the IRE1 α and PERK arms of the UPR. Additionally, our data indicated that the effect of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ is not limited to the LNCaP cells. Consistently, 22Rv1 cells, which is other prostate cancer cells, exhibited similar results. Finally, the findings of our study with transcriptional and translational inhibitors showed that $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regulates ERAD and UPR components at the transcriptional level.

Collectively, our results suggest that $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -mediated signaling strictly regulates ERAD and UPR mechanisms in prostate cancer cells.

Keywords: $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, Vitamin D, Vitamin D Receptor (VDR), Prostate cancer, Endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD), Unfolded Protein Response (UPR)

İÇİNDEKİLER

BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Endoplazmik Retikulum (ER)	4
2.2. Endoplazmik Retikulum Kalite Kontrol Sistemleri	5
2.2.1. ER Aracılı Yıkım (ER associated degradation, ERAD) Mekanizması	8
2.2.1.1. ERAD Komponentleri	11
2.2.1.1.1. Hrd1 (HMG-KoA reductase degradation protein 1)	11
2.2.1.1.2. gp78 (Glycoprotein 78)	13
2.2.1.1.3. UFD1L (Ubiquitin Fusion Degradation 1 Like)	14
2.2.1.1.4. Npl4 (Nuclear Protein Localization 4 Homolog)	16
2.2.1.1.5. p97/VCP (Valosin Containing Protein)	17
2.3. Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR)	18
2.4. D Vitamini	22
2.4.1. Kalsitriol (1,25-dihidroksivitamin D ₃)	23
2.4.2. Vitamin D Reseptörü (VDR) ve Sinyal Mekanizması	26
2.5. Prostat Kanseri	30
2.5.1. Prostat Kanseri ve D vitamini	35
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	39
3.1. GEREÇ	39
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	39
3.1.2. Sarf Malzemeler	41
3.1.2.1. Kitler	41
3.1.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	42
3.1.2.3. Kullanılan Antikorlar	42
3.1.2.4. Kullanılan Primerler	42

3.1.2.5. Kullanılan Diğer Malzemeler.....	43
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler.....	44
3.1.3.1. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez) ve İmmunoblotlama Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler	44
3.1.3.1.1. 2X RIPA (Radyoimmünopresipitasyon Assay) Lizatlama Tamponu	44
3.1.3.1.2. 10X PBS (Phosphate Buffer Saline).....	44
3.1.3.1.3. 4X SDS-PAGE Ayırma Tamponu (Resolving Buffer).....	44
3.1.3.1.4. 4X SDS-PAGE Yığınlama Tamponu (Stacking Buffer)	44
3.1.3.1.5. 4X Protein Yükleme Tamponu	45
3.1.3.1.6. 10X SDS-PAGE Yürütme Tamponu	45
3.1.3.1.7. 10X Transfer Tamponu	45
3.1.3.1.8. 1X Yıkama Tamponu	45
3.1.3.1.9. %10 AP (Amonyum persülfat) Çözeltisi	45
3.1.3.1.10. %5’lik Yağsız Süt Bloklama Ajanı	45
3.1.3.1.11. Ponceau S Çözeltisi	46
3.2. YÖNTEM.....	46
3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	46
3.2.1.1. Hücre Hattı Seçimi	46
3.2.1.2. Hücre Kültürü Koşulları.....	46
3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması.....	47
3.2.1.4. Hücre Sayım İşlemi.....	48
3.2.1.5. Hücrelerin Stoklanması.....	48
3.2.2. Hücrelere Kimyasal Madde Uygulanması.....	49
3.2.2.1. Hücrelere 1,25(OH) ₂ D ₃ Uygulanması.....	49
3.2.2.2. Diğer Ajanların Uygulanması	49
3.2.3. İmmünoblotlama (Western Blot).....	50
3.2.3.1. Protein İzolasyonu.....	50
3.2.3.2. Protein Miktarının Belirlenmesi.....	51
3.2.3.3. Proteinlerin SDS-PAGE ile ayrılması	52
3.2.3.4. PVDF Membrana Transfer.....	53
3.2.3.5. Bloklama ve Primer Antikor ile İşaretleme	53
3.2.3.6. Sekonder Antikor ile İşaretleme.....	54
3.2.3.7. Kemiluminesans Görüntüleme.....	54

3.2.4. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve qRT-PCR Çalışmaları	54
3.2.4.1. Total RNA İzolasyonu	54
3.2.4.2. RNA Kalite Kontrolü, Konsantrasyon ölçümü	55
3.2.4.3. cDNA Sentezi.....	56
3.2.4.4. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR.....	57
3.2.4.4.1. qRT-PCR sonuçlarının analiz edilmesi.....	58
3.2.4.5. İstatistiksel Analiz.....	58
4. BULGULAR.....	59
4.1. Farklı dozlarda uygulanan 1,25(OH) ₂ D ₃ 'ün LNCaP hücreleri üzerinde ERAD mekanizması ile ilişkili protein ifadelerine olan etkilerinin incelenmesi.....	59
4.2. Farklı zaman aralıklarında 1,25(OH) ₂ D ₃ uygulanan LNCaP hücrelerinde ERAD mekanizması ile ilişkili protein düzeylerinin incelenmesi	60
4.3. Farklı dozlardaki 1,25(OH) ₂ D ₃ uygulamasının UPR'nin IRE1α ve PERK kolu proteinleri üzerine olan etkilerinin LNCaP hücrelerinde incelenmesi	62
4.4. Farklı zaman aralıklarında uygulanan 1,25(OH) ₂ D ₃ 'ün UPR'nin IRE1α ve PERK kolu proteinleri üzerine olan etkilerinin LNCaP hücrelerinde incelenmesi.....	63
4.5. 1,25(OH) ₂ D ₃ 'ün ERAD üyelerini kodlayan genlerin mRNA ifade düzeyleri üzerine olan etkisinin incelenmesi	65
4.6. 1,25(OH) ₂ D ₃ uygulamasının ERAD ve UPR ile ilişkili proteinler üzerine olan etkilerinin LNCaP prostat kanseri hücreleri dışında 22Rv1 prostat kanseri hücrelerinde incelenmesi.....	67
4.7. ERAD bileşenlerinin 1,25(OH) ₂ D ₃ aracılı regülasyonunun transkripsiyonel ya da translasyonel düzeyde olup olmadığının incelenmesi	70
5. TARTIŞMA	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	80
7. KAYNAKLAR	81
8. EKLER.....	99

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmalara yer alan hedef genlerin NCBI gen kimlik numaraları ve primer dizi bilgileri	43
Tablo 2. SDS-PAGE Ayırma ve Depolama Jelinin Hazırlanması	53
Tablo 3. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı	56
Tablo 4. cDNA sentezinde kullanılan PCR programı	56
Tablo 5. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Reaksiyon Karışım Miktarları	57
Tablo 6. Gerçek zamanlı PCR programı	57
Tablo 7. Erime eğrisi analizi programı	58



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. ER Kalite Kontrol Mekanizması	7
Şekil 2. Endoplazmik Retikulum Aracılı Yıkım (ERAD) Basamakları.	9
Şekil 3. Katlanmamış protein yanıtı (UPR) sinyal yoluna genel bakış	21
Şekil 4. Kalsitriol moleküler 3D yapısı	24
Şekil 5. Vitamin D Metabolizması	25
Şekil 6. Hedef DNA'sı ile tam insan RXR/VDR nükleer reseptör heterodimerik kompleksinin yapısı	27
Şekil 7. D vitamininin etki mekanizması.....	29
Şekil 8. Farklı dozlarda uygulanan 1,25(OH) ₂ D ₃ , prostat kanseri hücrelerinde ERAD bileşenleri üzerine olan etkilerinin immüno blotlama ile incelenmesi	59
Şekil 9. Farklı sürelerde uygulanan 1,25(OH) ₂ D ₃ 'ün prostat kanseri hücrelerinde ERAD bileşenleri üzerine olan etkilerinin incelenmesi.	61
Şekil 10. Farklı dozlarda uygulanan 1,25(OH) ₂ D ₃ , prostat kanseri hücrelerinde UPR bileşenleri üzerine olan etkilerinin immüno blotlama ile incelenmesi..	62
Şekil 11. Farklı sürelerde uygulanan 1,25(OH) ₂ D ₃ 'ün prostat kanseri hücrelerinde UPR bileşenleri üzerine olan etkilerinin incelenmesi.	64
Şekil 12. 50 ve 100nM 1,25(OH) ₂ D ₃ uygulanan LNCaP hücrelerinde ERAD ile ilişkili olan üyeler ve CYP3A5 mRNA ifadesi değişimlerinin qRT-PCR ile incelenmesi.....	66
Şekil 13. LNCaP ve 22Rv1 hücrelerinde VDR gen ifadesi düzeylerinin değerlendirilmesi.....	68
Şekil 14. 1,25(OH) ₂ D ₃ 'ün ERAD ve UPR proteinleri üzerine olan etkisinin LNCaP ve 22Rv1 hücrelerinde immüno blotlama ile incelenmesi.....	69
Şekil 15. 1,25(OH) ₂ D ₃ 'ün ERAD ve UPR proteinleri üzerine olan etkilerinin transkripsiyon inhibitörü ve translasyon inhibitörü olan ActD ve CHX uygulamaları ile incelenmesi.	71

KISALTMALAR DİZİNİ

1,25(OH)₂D	: 1,25 dihidroksikolekalsiferol
25(OH)D	: 25- hidroksi vitamin D
ADT	: Androjen ablasyon tedavisi
AMFR	: Otokrin Motilite Faktörü Reseptörü
AP	: Amonyum Persülfat
AR	: Androjen Reseptörü
ATF4	: Transkripsiyon Faktörü 4
ATF6	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6
ATM	: Serin-Protein Kinaz Atm
ATPase	: Adenosin Trifosfataz
BPH	: Bening Prostatik Hiperplazi
BRCA1	: Meme Kanseri Tip 1 Duyarlılık Proteinini
BRCA2	: Meme Kanseri Tip 2 Duyarlılık Proteinini
Ca²⁺	: Kalsiyum
CC	: Kolon Kanseri
CHEK2	: Serin/treonin-protein kinaz Chk2
CHOP	: C/EBP-Homolog Protein
CLR	: Kalretikulin
CNX	: Kalnekin
CO₂	: Karbondioksit
DBD	: DNA Bağlanma Alanı
dH₂O	: Distile Su
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DRE	: Dijital Rektal Muayene
Dsk2	: Ubikitin Etki Alanı İçeren Protein DSK2
DU-145	: İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı
DVBP	: D Vitamini Bağlayıcı Proteinler

E1	: Ubikitin Aktive Edici Enzim
E2	: Ubikitin Konjuge Edici Enzim
E3	: Ubikitin Ligaz
eIF2α	: Ökaryotik Başlama Faktörü 2 α
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERAD	: Endoplazmik Retikulum Aracılı Yıkım
Erlec1	: Endoplazmik Retikulum Lektin 1
ERpQC	: ER Stresi ile İndüklenen Önleyici Kalite Kontrolü
ERQC	: Endoplazmik Retikulum Kalite Kontrol
FBS	: Fetal Sığır Serumı
FGF 23	: Fibroblast Büyüme Faktörü 23
GADD34	: Büyüme Durması ve DNA Hasarı İndüklenebilir Protein-34
gp78	: Glikoprotein 78
GPI	: Glikosilfosfatidilinositol
GRIP1	: Glutamat Reseptör Etkileşimli Protein 1
GRP78	: İmmüoglobulin Ağır Zincir Bağlayıcı Protein/BiP
HEPUD1	: Ubikuitin Benzeri Alan 1 ile Homosistein İndüklenebilir ER Proteini
HOXB13	: Homeobox B13
Hrd1	: HMG-CoA Redüktaz Bozunma Proteini 1
Hrd3p	: HMG-Koa Redüktaz Bozunma Proteini 3
Hsp40	: Isı Şok Protein 40
Hsp70	: Isı Şok Protein 70
HSPA5	: Isı Şok Proteini 5
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGFBP-3	: IGF Bağlayıcı Protein-3
IGF-IR	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 Reseptörü
IncRNA	: Uzun Kodlamayan RNA
IRE1	: İnositol Gerektiren Enzim 1
KAI1/CD82	: Kangai 1 Tümör Baskılayıcı Protein

LBD	: Ligand Bağlama Alanı
Lys48	: Lizin 48
miRNA	: mikroRNA
MLH1	: MutL Homologu 1
MMP-2	: Matriks Metalloproteinazlar-2
MMP-9	: Matriks Metalloproteinazlar-9
MSH2	: MutS Homologu 2
MSH6	: MutS Homologu 6
NcoR-1	: Nüklear Reseptör Ko-Baskılayıcı-1
NcoR-2	: Nüklear Reseptör Ko-Baskılayıcı-2
NGly1	: N-Glikanaz Enzimi 1
Npl4	: Nükleer Protein Lokalizasyonu 4
OS-9	: Osteosarkom Güçlendirilmiş 9 Proteini
p53	: Tümör Protein 53
p97/VCP	: Valosin İçeren Protein
PBS	: Fosfat Tampon Salın
PCa	: Prostat Kanseri
PDI	: Protein Disülfid İzomerazları
PERK	: Pankreatik Er Kinaz (PKR) Benzeri ER Kinaz
PMS2	: PMS1 Homologu 2
PP1	: Protein Fosfataz 1
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
PVDF	: Poliviniliden Diflorür
RAD51D	: RAD51 Paralog D
RIDD	: Düzenlenmiş Ire1 Bağımlı Bozunma
RIPA	: Radyoimmunopresipitasyon Assay
RNASEL	: Ribonükleaz L
RXR	: Retinoik Asit X Reseptörü
S1P	: Site 1 Proteaz

S2P	: Site 2 Proteaz
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat Sodyum Tuzu
SEL1L	: Lin-12 Benzeri Süpresör
SMURF1	: SMAD'ye Özgü E3 Ubikitin Protein Ligaz 1
SRC-1	: Steroid Reseptörü Koaktivatörü 1
SRP	: Sinyal Tanıyan Partikül
SUG1	: <i>gal</i> 1'in Baskılayıcısı
SVIP	: Küçük p97/VCP Etkileşimli Protein
SYVN1	: Sinovyal Apoptoz İnhibitörü 1
TFIIB	: Transkripsiyon Faktörü IIB
TIF-1	: Transkripsiyonel Aracı Faktör 1
TMD	: Transmembran Alanı
TRUS	: Transrektal Ultrason
UbxD2	: UBX Alanı İçeren Protein 2
UbxD8	: ER'ye Bağlı Ubikitin-X Etki Alanı Bağdaştırıcısı 8
Ufd1	: Ubikitin Füzyon Bozunma 1 Proteini
Ufd2	: Ubikitin Füzyon Bozunma 2 Proteini
UPR	: Katlanmamış Protein Yanıtı
UPS	: Katlanmamış Protein Stresi
VDR	: D Vitamini Reseptörü
VDRE	: D Vitamini Cevap Elemanı
VIMP	: VCP-Etkileşen Membran Proteini
XPB1s	: X Box Bağlayıcı Protein 1 Transkripsiyon Faktörü
XTP3-B	: XTP3 ile Transaktive Edilmiş Gen B Prekürsörü

1. GİRİŞ

Endoplazmik retikulum (ER), sahip olduğu karmaşık ağı yapılarında lokalize olan proteinler aracılığıyla hücrelerde karbonhidrat metabolizması, kalsiyum homeostazisi, lipit ve steroid sentezi, protein sentezinin gerçekleştirilmesi, protein katlanması ve transportu, protein kalite kontrol süreçleri gibi birçok önemli biyokimyasal süreçleri gerçekleştirmektedir (1).

Ökaryotlarda yeni sentezlenen biyolojik proteomun yaklaşık üçte biri sekretuar yolağa hedeflenmekte ve salgı yolunun diğer organellerine, plazma zarı veya hücre dışı alana yönlendirilmektedir. Bu süreçte ER'ye bağlı ribozomlardan sentezlenen polipeptit dizileri translokon adı verilen, ER membranında lokalize olan Sec61 kanal kompleksi aracılığıyla eş zamanlı olarak ER içerisine aktarılmaktadır (2,3).

ER'de gerçekleşen protein katlanması, oligomerizasyonu, olgunlaşması, glikozilasyon ve disülfid bağı oluşumunu içeren translasyon sonrası modifikasyonlar ile karakteristik yapılarını elde eden olgunlaştırılan proteinler sürekli olarak ER kalite kontrol mekanizması aracılığıyla ER içerisinde kontrol edilmektedir. Karakteristik formuna ulaşan proteinler ER lümeninden dışarıya sevk edilirken, katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlerin doğru form ve modifikasyonlara sahip olmaları için tekrarlayan katlanma sürecine teşvik edilmektedir (4–6).

ER'de meydana gelen Ca^{2+} homeostazındaki bozulmalar, redoks dengesizliği, değişmiş protein glikozilasyonu veya protein katlama kusurları gibi çeşitli hücrel süreçler ER lümeninde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olmaktadır. Ayrıca bu duruma ER'nin protein katlama kapasitesinin çeşitli nedenlerle aşılması da neden olabilmektedir. Bu süreçte “ER stresi” olarak bilinen hücrel stres durumu meydana gelmektedir (7–9). Hücreleri bu stresten korumak veya yanıt vermek için katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak ifade edilen hücrelerin değişen fizyolojik koşullara adaptasyonuna yardımcı olan karmaşık mekanizma aktive edilmektedir. Hücrede bu sürecin uyumlu aktivitesi ile, ER stresi düzeyine bağlı olmak üzere hücrel homeostazın yeniden oluşturulması için UPR sinyalinin aktivasyonu ve ER protein kalite kontrol (ERQC) genlerinin transkripsiyonel indüksiyonu, global protein sentezinin seçici olarak translasyonel zayıflaması ya da hücre ölüm programlarının aktive edilip edilmeyeceği belirlenmektedir (6,10).

Proteinlerde gerçekleşen katlanma sürecinin hatasız olmadığı ve yeni sentezlenen proteinlerin yaklaşık 1/3'ünün hatalı olarak katlandığı bilinmektedir. Tekrarlayan katlanma süreçlerinde de istenilen forma ulaşamayan proteinler ER aracılı protein yıkımı (ERAD) adı verilen mekanizma ile yıkıma uğratılmaktadır (11). ERAD'da meydana gelen bozuklukların sonucu olarak nörodejeneratif hastalıklar, kistik fibrozis, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve kanser gibi yetmiş aşkın hastalığın gelişimine neden olduğu bilinmektedir (12–15).

ERAD mekanizması, hücrelerde yalnızca katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlerin proteozomal yıkıma yönlendirilmesi ve hücrenin olası proteotoksisteden korumasından sorumlu değildir. Bu görevlerinin yanı sıra hücrelerde monooksijenaz sitokrom p450, kolesterol metabolizması düzenleyici proteini olan HMG-KoA redüktaz ve metastaz baskılayıcı protein olan KAI1 (Kangai 1)/CD82'in, nörodejeneratif hastalık proteinleri süperoksit dismutaz-1 (SOD1) ve ataksin-3, insüline bağlı gen-1 ve apolipoprotein B (ApoB) gibi fizyolojik öneme sahip çok sayıdaki proteinin endojen düzeylerinin kontrolü ve tamamen olgunlaşmış proteinlerin işlev bölgelerine ulaşması için de ERAD'ın gerekli olduğu bilinmektedir (16,17).

Fizyolojik şartlar altında hücrelerdeki birçok moleküler mekanizmanın hormonal olarak sıkı şekilde düzenlendiği bilinmektedir. Son zamanlarda ise aslında bir sekosteroid hormon olan D vitamininin birçok kanser türünün oluşma riskini azaltmak için önerildiği bilinmektedir. D vitamininin en temel işlevi fizyolojik olarak kalsiyum ve fosfat düzeylerinin korunması üzerinedir. Fakat bu temel fonksiyonunun yanında, D vitamini beyin gelişimi, hücre büyümesi ve nöromusküler fonksiyonların düzenlenmesinde de işlev görmektedir (18–21).

D vitamininin, ergokalsiferol olarak adlandırılan vitamin D₂ ve kolekalsiferol olarak adlandırılan vitamin D₃ olmak üzere iki önemli formu bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar kalsitriol (1,25(OH)₂ D₃) ve analoglarının, otuzdan fazla dokuda bulunduğu bilinen D Vitamini Reseptörü (VDR) aracılığı ile insan kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (22,23). Yapılan çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar sonucunda D vitamini eksikliğinin kanser, diyabet,

hipertansiyon, otoimmün ve kardiyovasküler hastalık riskinin artırabildiğini gösterilmiştir (24).

Yapılan çalışmalar sonucunda artan kanıtlar, D vitamininin ve D vitamini reseptörünün prostat kanserinin gelişiminde de önemli olduğunu göstermektedir (25,26). Bu bilgiler ışığında ilerlenen bu tez çalışmasında prostat kanseri hücrelerinde $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ aracılı VDR sinyallemesinin ERAD ve UPR mekanizmaları üzerine olan olası düzenleyici rolünün aydınlatılması ve literatüre önemli katkılar sağlanması hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endoplazmik Retikulum (ER)

Endoplazmik Retikulum (ER), hücrenin hayatta kalması ve normal hücresel fonksiyonları için gerekli olan çok sayıdaki görevi yerine getiren özelleşmiş sofistike bir organelidir. ER hücre için kalsiyum homeostazisi, lipid sentezi, proteinlerin işlenmesi ve katlanması gibi birçok biyokimyasal süreçte önemli rollere sahiptir ve bu hücresel süreçleri, karmaşık ağısı tübüler yapılarında lokalize olan proteinler aracılığıyla yerine getirmektedir (1,5,27).

ER hücrenin en büyük organeli olmakla birlikte ER membranları tüm hücresel membranların yaklaşık yarısını oluşturmaktadır. Büyük boyutunun yanı sıra, ER'nin heterojen ve dinamik morfolojisi birçok farklı işlevini yansıtmaktadır ve sahip olduğu bu mikromimarideki değişimler doğrudan hücresel fizyolojinin bir yansımasını sergilemektedir (28).

Sitoplazma içerisinde çok kıvrımlı bir yapıda bulunan ER, elektron mikroskopuyla incelendiğinde bazı bölgelerde granüllü yapılarının olduğu görülmektedir. Elektron mikroskobu görüntülerine dayanarak ER granüllü (kaba) ve granülsüz (düz) olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır (28).

Görüntülerinin farklı olduğu gibi işlevleri de farklı olan bu iki yapıdan tabakaları düz ve ribozomlardan yoksun olan pürüzsüz ER, hücresel lipid metabolizması ile ilişkilidir. Anahtar lipid metabolizması enzimlerinin çoğu düz ER'de bulunduğundan, lipid biyosentezi ve taşınmasındaki rolü vazgeçilmezdir (3). Dahası, ER, hücre içi Ca^{2+} depolaması için ana bölgedir ve bu nedenle Ca^{2+} aracılığı olarak sinyal sergilenmesinde kritik öneme sahiptir. Taşıdığı 40'tan fazla enzim sayesinde midenin asit, testis-ovaryum ve böbrek üstü bezlerinin steroid hormon salgılamasında, çizgili kas kasılmasında, barsak epitel hücrelerinin lipid metabolizması gibi çok çeşitli fizyolojik görevi yerine getirebilmektedir (29).

Tabakaları çok sayıda ribozom içeren granüllü ER ise integral membran veya sekresyon için tasarlanan proteinlerin biyosentezini ve kalite kontrolünü gerçekleştirmektedir. ER yalnızca protein biyosentezinde değil, aynı zamanda proteinlerin doğru katlanmalarına da yardımcı olan kompleks protein gruplarının yer

aldığı sistemleri içermektedir. ER'nin bir başka görevi ise, doğru katlanmış proteinlerin uygun hücrel hedeflerine yönlendirmektir (30,31).

ER' de lipit ve protein biyosentezi, protein katlanması ve transferi için uygun koşullar sağladığı için ER homeostazı hücrenin sağ kalımı için hayati öneme sahiptir. Bu nedenle oksidatif stres, hipoksi, hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonlarındaki değişiklikler, ER'nin kapasitesinin aşılması, patojen istilası veya inflamasyon gibi dış veya iç uyaranlar ER homeostazını bozabilir ve bu durum ER stresine yol açan katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin ER lümeninde birikimine neden olmaktadır (7–9).

ER'de bu stres durumunda fonksiyonunu ve homeostazını korumak için, katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılan evrimsel olarak korunmuş olan oldukça kompleks sinyal ağları ile regüle edilen bir mekanizma geliştirmiştir. UPR genel translasyonun seçici olarak inhibisyonu, protein katlanması ve hatalı katlanmış proteinlerin yıkımı ile ilişkili protein gruplarının hücre içi düzeylerinin artırılması yoluyla ER homeostazisini tekrar sağlamaya çalışmaktadır. ER homeostazisinin yeniden kurulamadığı ve uzun süreli ER stresine mağruziyet oluşan durumlarda ise programlanmış hücrel ölüm mekanizmasının UPR aracılı olarak uyarılmasına bağlı hücreler apoptotik hücre ölümüne yönlendirilmektedir (32).

ER'nin hücrel fonksiyonların devamlılığında üstlenmiş olduğu proteinlerin biyosentezi ve kalite kontrolü, lipit sentezi, homeostazisin sağlanması, hücre ölüm mekanizmasına yönlendirme gibi kritik görevler göz önüne alındığında, hastalıkların patogenezinin anlaşılması ve teşhisinde çok önemli olduğu ve ER'deki bu kompleks süreçlerin hastalıklarla olan ilişkisi ve olası yeni regülasyon modellerinin bilinmezliklerinin ve ER ile bağlantılarının araştırılması son derece değerlidir.

2.2. Endoplazmik Retikulum Kalite Kontrol Sistemleri

Yeni sentezlenen proteomun yaklaşık üçte biri ER'ye hedeflenmekte ve salgı yolunun diğer organellerine, plazma zarı veya hücre dışı alana yönlendirilmektedir. ER'ye hedeflenen proteinler ribozomlar üzerinde sentezi sürerken ya translasyon sırasında yer değiştirme işlemi ile ya da ribozomlar tarafından sentezin

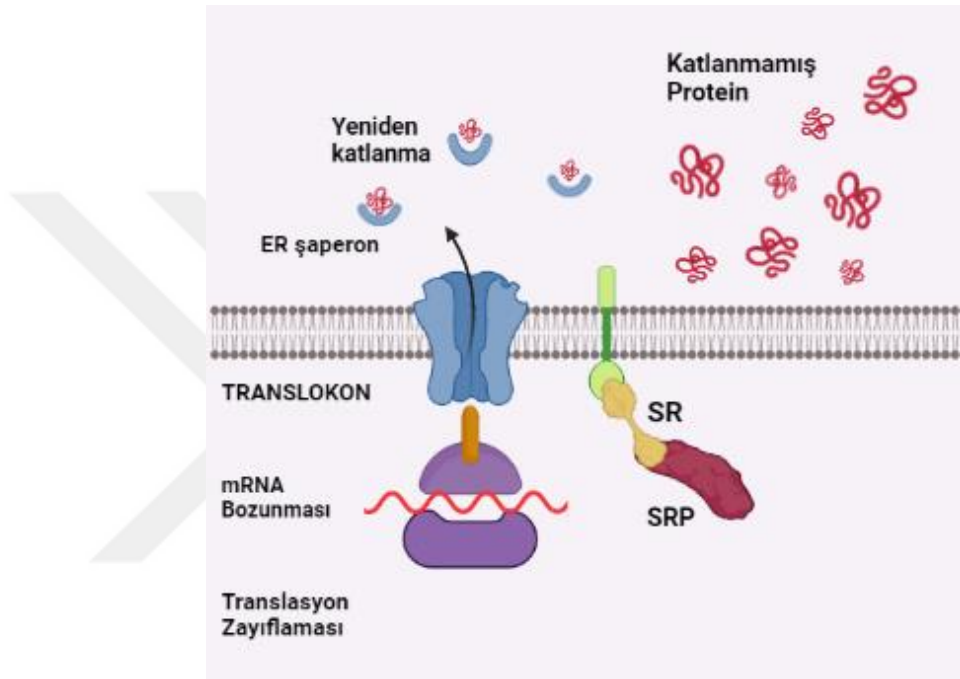
tamamlanmasından sonra ER içine taşınabilmektedirler. ER'ye aktarım yolunda ilk işlem ribozom-mRNA kompleksinin ER'ye tutunmasıdır ve bu işlem translasyon sırasında gerçekleşmektedir. ER'ye hedeflenme işlemi uzayan polipeptit zincirinin amino ucunda bulunan hidrofobik aminoasitlerden oluşan sinyal dizisinin ER lümenine aktarımı sırasında kesilerek uzaklaştırılması ile gerçekleşmektedir (33,34).

ER kalite kontrol sistemi ile salgı proteinlerinin translasyonda ER'ye hedeflenmesi işlemi birkaç ana basamak üzerinden gerçekleşmektedir. Çok adımlı işlemlerin ilki ise ribozomda sentezlenen sinyal dizisinin sinyal tanıyan partikül (SRP) tarafından tanınıp bağlanmasıdır. 2. Adım olarak SRP, bağlandığı polipeptit zincirini ER membranına yönlendirmesidir. ER membranına yönlendirilen polipeptit zinciri SRP reseptörüne bağlanır. 3. Adımda, SRP reseptörü serbest hale gelir ve ribozomun translokona bağlanmasıyla sinyal dizisi kanala yerleştirilir ve translokunun açılması sağlanır. 4. Adımda translasyon devam eder ve sinyal peptidaz enzimi tarafından sinyal dizisi uzaklaştırılır. 5. Adım devam etmekte olan translasyonda uzayan polipeptid zincirinin ER lümenine nakledilmesi işlemidir. 6. ve son adımda ise sentezi tamamlanmış olan polipeptit zinciri ER lümeninde serbestleşmektedir (35).

Hem memelilerde hem mayalarda Sec61 proteinleri adı verilen üç transmembran proteinden oluşan SRP, translokasyon işleminde görev almaktadır. Sec61 kanal kompleksi proteini ileten translokasyonlarını veya lipid çift tabakasına yerleştirilmesini yönlendiren hidrofobik sinyaller içermektedir. Translasyon sonrasında ER içerisine alınacak olan polipeptid zincirinin katlanmamış formda tutulması, sitozolde bulunan Hsp70 (heat shock protein 70) ve Hsp40 (heat shock protein 40) şaperonları ile gerçekleşmektedir. Böylece Sec61 kompleksi tarafından oluşturulan dar bir kanal vasıtasıyla bu proteinlerin, ER'ye translokasyonu gerçekleşmektedir (2,3). Ayrıca, sinyal dizisi ile birlikte ribozoma da bağlanarak translasyonun daha fazla ilerlemesini durdurur ve ER zarında bulunan SRP reseptörüne bağlanarak tüm kompleksin (SRP, ribozom ve uzayan polipeptid zinciri) ER'ye hedeflenmesini gerçekleştirir.

Translokon içerisine sinyal dizisinin aktarılması, kanalı kapatan tıkaç görevi üstlenen proteinin uzaklaştırılmasıyla sağlanmaktadır. Ribozomun SRP'den translokona aktarılmasıyla birlikte baskılanmış olan translasyon kaldığı yerden

devam eder ve uzayan polipeptid zinciri translokon kanalı aracılığıyla ER zarından iç boşluğa geçer. Translokasyon gerçekleştikçe sinyal peptidaz enzimi ile sinyal dizisi kesilir. BiP/GRP78 proteini ise, polipeptid zincirinin translokon kanalından ER içine çekilmesi için gereklidir. Çok sayıdaki polipeptit zincirine BiP proteininin bağlanması ve ATP hidrolizi ile polipeptit zincirinin serbestleşmesi için gerekli enerjiyi sağlar ve böylelikle polipeptid ER lümenine aktarılır (36,37).



Şekil 1. ER Kalite Kontrol Mekanizması. Kadowaki ve ark. (2015)'den modifiye edilmiştir (35).

Proteinlerin ER'nin oksitleyici ve kalsiyum açısından zengin ortamında, katlanma, glikozilasyon, disülfid bağı oluşumu ve glikosilfosfatidilinositol (GPI) ankorajı gibi translasyon ile eş zamanlı ve sonrası modifikasyon işlemleri de translokasyon ile senkronize olarak gerçekleşmektedir. Yeni sentezlenen her protein, biyolojik olarak işlevsel hale geçebilmesi için yeni oluşan polipeptit zincirinin katlanmış ve karakteristik 3 boyutlu yapısına ulaşması gerekmektedir. Yeni ortaya çıkan polipeptitlerin katlanması translokasyon sırasında başlar ve bu süreç proteinlerin katlanmasına yardımcı olmak için ER lümeninde bulunan çeşitli şaperonlar tarafından desteklenmektedir. Bu katlanma işlemi sırasında, kalnexin (CNX) veya kalretikulin (CLR) gibi lektin tipi moleküler şaperonlar, HSP70 benzeri

şaperon BiP/GRP78 gibi çok sayıda protein ve protein disülfid izomerazları (PDI) gibi enzimler eş zamanlı olarak birlikte çalışmaktadır (38). Bu şaperonlar, yeni oluşan polipeptit zincirleriyle etkileşime girerek protein katlanmasını, oligomerizasyonunu, olgunlaşmasını ve glikozilasyon ve disülfid bağı oluşumunu içerebilen translasyon sonrası modifikasyonları kolaylaştırmaktadır. Katlanarak karakteristik yapılarını elde eden proteinler ER şaperonlarından salınır. Nihai formuna ulaşan proteinler ER lümeninden dışarıya sevk edilirken katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlerin doğru form ve modifikasyonlara sahip olmaları bu süreçte teşvik edilmektedir (4–6).

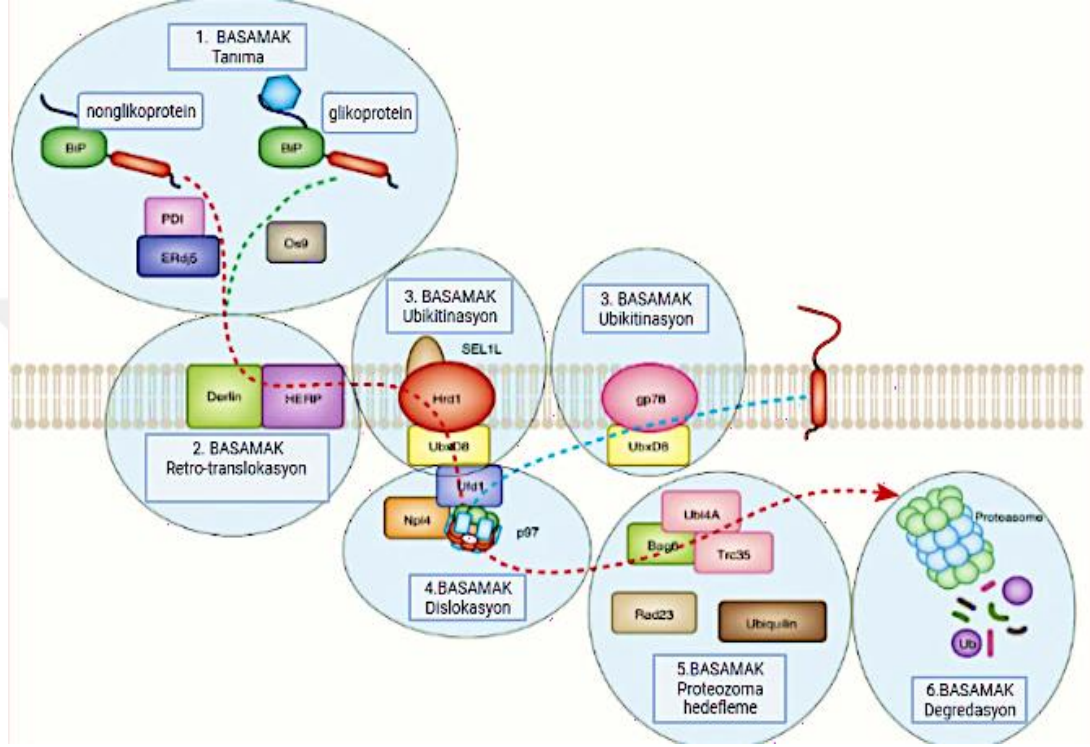
Protein katlanması hatasız işleyen bir süreç olmadığı ve yeni sentezlenmiş olan proteinlerin yaklaşık üçte birlik bölümünün hatalı katlandığı bilinmektedir. Tekrarlayan katlanma süreçlerinde de nihai formuna ulaşamayan proteinler, ER aracılı yıkım (ERAD) adı verilen mekanizma ile proteozomal yıkıma hedeflenmektedir (11).

2.2.1. ER Aracılı Yıkım (ER associated degradation, ERAD) Mekanizması

Hücrede hatalı katlanmış proteinlerin ER lümeninde birikimiyle, “ER stresi” olarak ifade edilen süreç tetiklenmektedir. Hücrenin ER stres durumuyla başa çıkabilmesi, ER protein katlama kapasitesinin geliştirilebilmesi veya hatalı katlanan proteinlerin hızlı bir şekilde protein yıkım sürecine yönlendirilerek etkisiz hale getirilmesi ile mümkün olmaktadır. Hidrofobik kalıntıları gizlenmemiş agregat olmaya yatkın katlanma problemlili olan proteinler ERAD adı verilen mekanizmayla tanınır ve işaretlenerek proteozomal yıkıma hedeflenir (4,11,39).

Çok sayıda karmaşık basamaktan oluşan ERAD mekanizması, hücre içerisindeki istenmeyen proteinlerin tanınması ve integral membran E3 ligazları tarafından ubiquitinasyonunu takiben hücrenin sitoplazmasına retrotranslokasyonu, dislokasyonu, substrat deglikozilasyonu ve proteozoma transferi ve yıkımı ile sonlanmaktadır. Bu adımlar çok sayıdaki protein üyesinin senkronize bir şekilde çalışmasıyla gerçekleşmektedir.

Hedeflenen substrat molekülüne bağlı olarak yıkımda görevli olan protein üyeleri çeşitlilik göstermektedir. Bununla birlikte ERAD substratları öncelikli olarak, ER lümeninde yer alan hem protein katlanması hem de protein yıkımında görev alan moleküler şaperon sistemi tarafından tanınmakta ve ER membranında bulunan multiprotein kompleksinden oluşan ERAD kompleksine sevk edilmektedir (17,40).



Şekil 2. Endoplazmik Retikulum Aracılı Yıkım (ERAD) Basamakları. Christianson ve ark. (2014)'den modifiye edilmiştir (41).

Proteinlerin kaderini ve işlevini değiştirerek hemen hemen tüm hücrel süreçlerde düzenleyici bir role sahip olan protein ubiquitinasyonu, çok enzimli bir süreçtir ve bu süreçten E1-ubikitin aktive edici enzim, E2-ubikitin konjuge edici enzim ve E3-ubikitin ligaz olmak üzere üç enzim sorumludur. Hücrede protein kalite kontrolü, hücre döngüsü, endositoz, hücre sinyalizasyonu, otofaji, transkripsiyonel regülasyon ve DNA hasar cevaplarının düzenlenmesi gibi birçok hücrel sürecin ayarlanmasında görev almakta olan ubiquitinasyonun en iyi bilinen rollerinden birisi ERAD substratlarını 26S proteazom tarafından parçalanmak üzere hedeflemektir. Proteinleri proteazoma hedeflemenin en etkili yolu ise, onları ubikitin zincirleri ile etiketlemektir (42).

Proteozom tarafından ubiquitin bağımlı bozunma işlemi bir dizi enzimatik reaksiyon ile gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonlardan ilki, ubiquitin aktive edici enzim olan E1'in ATP'yi hidrolize edip aktif bölgesindeki bir sistein kalıntısı ile ubiquitin C-terminali arasında yüksek enerjili bir tioester bağı oluşturduğunda gerçekleşir. Daha sonra elde edilen aktive edilmiş ubiquitin, ubiquitin-konjuge edici bir enzim olan E2'ye geçirilir. Daha spesifik olarak başka bir enzim grubu olan E3 adı verilen ubiquitin protein ligazları, yanlış katlanmış proteine bağlanarak proteini ve E2'yi hizalamakta, böylece ubiquitin yanlış katlanmış proteinin lizin kalıntılarına bağlanmasını kolaylaştırmaktadır. Önceden bağlanmış ubiquitin lizin kalıntılarına art arda ubiquitin moleküllerinin eklenmesiyle, bir poliubikitin zinciri oluşur. Bu protein 26S proteozomun 19S komplekslerindeki spesifik alt birimleri tarafından tanınır. Bundan sonra polipeptit zinciri, proteolitik olarak aktif bölgeleri içeren 20S çekirdek bölgesinin merkezi bölmesine beslenir (43).

ERAD mekanizması hem ubiquitinasyon hem de proteazomal degradasyon ile sıkı bir şekilde birleştirilmektedir (44,45). Çoğu durumda ise, ubiquitinasyonun inhibe edilmesi hem bozulmayı hem de ER substratlarının ER lümeni içindeki başlangıçtaki konumlarından veya ER zarına gömülü olarak bulunduğu konumlarından sitoplazmik yıkım alanlarına hareket etme işlemini (retrotranslokasyonu) önlemektedir (5).

Proteinlerin doğru katlanması kalite kontrolü büyük ölçüde ER'de, mümkün olan en erken aşamada ve erken katlanan ara ürünlerin terminal olarak yanlış katlanmış türlerle karıştığı bir ortamda gerçekleşmektedir. ER'de yer alan moleküler şaperon ve lektin proteinleri aracılığı ile tanınan hatalı katlanmış proteinler ER'den sitozole retrotranslokasyon yoluyla eliminasyona teşvik edilmektedir ve bu süreç ER stresinin aşılmasında fizyolojik olarak önemli bir adaptasyon mekanizmasıdır (46).

Bu işlem sırasında ER lümeninde yer alan retrotranslokasyon kompleksi ve sitozolik yüzde yer alan bir tip II AAA+ (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPaz proteini olan p97/VCP (valosin-containing protein) aracılı olarak hedef proteinler ER lümeninden sitozolik yüze ATP enerjisi harcanarak çekilmektedir (47).

Retrotranslokasyon sırasında kanal oluşumuna destek veren Derlin1, Derlin 2 ve Derlin 3, ERAD sırasında yanlış katlanmış proteinlerin retrotranslokasyonu için gerekli olan p97/VCP ve UbxD2 (UBX domain-containing protein 2), UbxD8 (ER-

tethered ubiquitin-X domain adaptor 8), VIMP (VCP-Interacting Membrane Selenoprotein), Ufd1 (Ubiquitin fusion degradation protein 1) ve Npl4 (Nuclear protein localization protein 4 homolog) gibi p97/VCP adaptör proteinleri ve N-glikan zincirinin uzaklaştırılmasından sorumlu N-Glikanaz enzimi 1 (NGly1) gibi birçok protein mekanik olarak eş güdümlü olarak çalışmaktadır (48–50). Ek olarak bu mekanizma içerisinde SVIP (Small VCP/p97-interacting protein) proteinin iyi bilinen bir E3 ligaz olan gp78 (Glycoprotein 78)'in yer aldığı gp78-p97/VCP-Derlin1 kompleksinin etkileşimini düzenleyerek ERAD'ı negatif regüle eden endojen bir ERAD inhibitörü olarak işlev gördüğü bilinmektedir (51,52).

26S proteozom kompleksi ile yıkıma uğratılmadan önce polipeptit zinciri üzerindeki ubiquitin molekülleri, 19S alt birimi ile etkileşim halindeki izopeptidaz adı verilen deubikitinleyici enzimler aracılığıyla uzaklaştırılmaktadır. Deubikitinasyon işlemi sonrası hedef proteinlerin yıkıma uğratılması gerçekleştirilmektedir (48).

2.2.1.1. ERAD Komponentleri

2.2.1.1.1. Hrd1 (HMG-KoA reductase degradation protein 1)

Synovial apoptosis inhibitor 1 (SYVN1) olarak da adlandırılan Hrd1 (HMG-KoA reductase degradation protein 1), bir RING parmak motifi ile bir ubiquitin ligaz (E3) görevi gören, ER stresi ile indüklenebilen ERAD substratlarının taşınmasına aracılık eden bir ER membran proteinidir (53). Çoğu kanıt, Hrd1 E3 ubiquitin ligazının, ERAD substratlarını sitozole taşımak için bir retrotranslokon veya dislokon olarak işlev görebileceğini ve ERAD'ı yürütmek için diğer proteinlerle bir kompleks oluşturduğunu göstermektedir (50).

Memeli Hrd1 proteini, ER lipid çift katmanını kapsayan en az altı transmembran alanı (TMD'ler), Hrd1'in sitoplazmik C-terminali, bir veya daha fazla E2 ubiquitin-konjuge edici enzim bağlanma alanı ve substratlara ubiquitin transferini kolaylaştıran bir RING alanı içermektedir. Büyük bir ER lümen alanı taşıyan tek bir membran geçişli glikoprotein olan kofaktörü SEL1L (mayada Hrd3p) proteini ile işlevsel olarak korunmuş 1:1 stokiyometrik ERAD kompleksinin çekirdeğini oluşturmaktadır (54,55). SEL1L (Suppressor/Enhancer of Lin-12-like), ER lektinleri OS-9 (Osteosarcoma amplified 9), XTP3-B/Erlec1 (XTP3-transactivated gene B

precursor) ve EDEM1 (ER Degradation Enhancing Alpha-Mannosidase Like Protein 1) dahil olmak üzere hatalı katlanmış lümen ve membran proteinlerini tanıyan, yakalayan ve Hrd1'e yönlendiren yardımcı faktörleri oluşturmakta olup Hrd1-SEL1L kompleksi, ERAD için gerekli olan maya Hrd1p-Hrd3p (HMG-KoA reductase degradation protein 3) HRD ligaz kompleksinin memeli homoloğudur (54). Hrd1 ayrıca, daha yüksek dereceli ERAD komplekslerini birleştirmek için iki entegre membran proteini kofaktörü olan HERPUD1 (Homocysteine Inducible ER Protein With Ubiquitin Like Domain 1) ve FAM8A1 (Family With Sequence Similarity 8 Member A1) ile benzersiz etkileşimler oluşturur (55).

Hrd1'in önemi nedeniyle, çeşitli kanser türleri üzerinde Hrd1'in işlevi hakkında daha fazla araştırma yapılmıştır. E3 ubiquitin ligaz olarak işlev gören Hrd1'in prostat kanseri dokularında yukarı regüle olduğu ve Hrd1'in ekspresyonunun geçici olarak susturulmasının ise LNCaP hücrelerinin hücre büyüme hızında önemli bir azalmaya neden olduğunu göstermiştir (16).

İnsan kolon kanserinde (CC) Hrd1'in ekspresyon paternini ve fonksiyonlarını araştırmak için yapılan bir çalışma sonucunda Hrd1 ekspresyonunun insan CC dokularında önemli ölçüde arttığını ve aşırı ekspresyonunun evreleme sistemlerinden en yaygın olarak kullanılan evreleme sistemi olan TNM evresine göre, tümör farklılaşması, tümör invaziv derinliği ve uzak metastaz ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca Hrd1'in susturulması, CC hücre göçü ve istilasını için kritik olan MMP-2 (Matrix metalloproteinases-2) ve MMP-9 (Matrix metalloproteinases-9)'un ifadesini azaltmıştır (56).

Meme kanserinde ise Hrd1, IGF-IR (Insulin-like growth factor 1 receptor) ile etkileşime girerek ubiquitinasyonuna ve bozulmaya yol açtığı böylece meme kanserinde Hrd1'in azalmış ekspresyonunun meme kanseri hastalarında ilerleme ve kötü sağkalıma eşlik ettiği belirlenmiştir (57). Ayrıca Hrd1'in üçlü negatif meme kanserinde (TNBC) aşağı regüle edilen, tümörigenez ve metastaza yol açan uzun kodlamayan RNA'ların (lncRNA'lar) bir türü olan circNR3C2'nin aşırı ekspresyonun Hrd1'in yukarı regülasyonuna neden olduğu böylece Hrd1'in, meme kanserinde tümör hücrelerinin istilasını ve metastazını kısıtlayan Vimentin'i hedefleyerek bir tümör baskılayıcı görevi gördüğü belirlenmiştir (57).

2.2.1.1.2. gp78 (Glycoprotein 78)

AMFR (autocrine motility factor receptor) olarak da adlandırılan gp78 (glikoprotein 78) geni, 16. kromozomun q kolunun, 12.2 pozisyonunda lokalizedir. 14 ekzonik bölge tarafından kodlanan gp78, 643 aminoasitten oluşmakta ve moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 73 kDa' dur. gp78, ER'de lokalize olan politopik bir RING parmak proteindir. Hem ubiquitinasyon hem de retrotranslokasyon komplekslerinin bileşenleri ile doğrudan etkileşime giren çoklu korunmuş alanlara sahiptir. Bu nedenle bilinen tüm ERAD ubiquitin ligazları arasında benzersizdir. Hücre içerisinde mitokondri ilişkili düz ER membranlarında lokalizasyon gösteren gp78'in, tahmin edilen beş transmembran alanı bulunmaktadır. Ubikitin ligaz fonksiyonu için gerekli olan bir RING finger domaini, bir oligomerizasyon bölgesi (OS), bir ubiquitin bağlanmasından sorumlu CUE alanına, bir UBE2G2 bağlayıcı bölge (G2BR) ve bir p97/VCP etkileşimli motif (VIM) domaini içermektedir (58).

ERAD mekanizmasının en iyi karakterize edilen ubiquitin ligaz enzimlerinden biri olan gp78 hedef proteinlerin tanınması, ubiquitinasyonu, sitoplazmaya retrotranslokasyonu ve proteozom sistemine hedeflenmesi için gerekli olan anahtar bir proteindir. Hatalı katlanan proteinlerin retrotranslokasyonu için gp78-p97/VCP etkileşimi oldukça önemlidir. Kanıtlar, gp78-p97/VCP etkileşiminin, ubiquitinasyonu retrotranslokasyonla birleştirmek için kritik rollere sahip olabileceğini göstermektedir (59). gp78, iyi bilinen p97/VCP-Ufd1-Npl4 kompleksi yerine retrotranslokasyon için p97/VCP-Npl4 kompleksini kullanmaktadır (59,60).

Ayrıca proteazomal tarafından bozunmayı hedefleyen gp78, hızla artan ER stresi altında otoubikitinasyonu bastırılarak stabilize olarak ERAD'ı güçlendirmektedir. E3 ligaz enzimlerinin otoubikitinasyonunun inhibisyonu hücrelerin ER'de yanlış katlanmış proteinlerin birikimine hızla yanıt verdiği genel bir mekanizma olabilmektedir (59). ERAD genlerinin prostat kanseri dokularında yukarı düzenlendiği bilinmektedir ve gp78, Hrd1 ve ERAD yolu inhibitörü olan SVIP'in susturulmasının LNCaP hücrelerinin *in vitro* hücre göçünü ve malign dönüşümünü azalttığı rapor edilmiştir (16).

gp78 proteininin, meme kanserlerinde önemli ölçüde yukarı regüle edildiği ve ek olarak Afrika kökenli Amerikalı kadınların tümörlerinde Avrupa kökenli olanlara

kıyasla gp78 ekspresyonunun önemli ölçüde daha yüksek olduğunu belirlenen çalışmada, gp78 ekspresyonunun daha agresif meme kanseri alt tiplerinde daha yüksek olduğunu ve kötü prognoz sergileyerek meme kanseri hastalarının sağ kalımını düşürdüğü önerilmiştir (61).

Bununla birlikte gp78'in normal prostat dokularında düşük düzeyde ifade edildiği ancak özellikle prostatın tümör dokularında yüksek düzeylerde ifade edildiği bilinen gp78'in, tümörün farklı evrelerinde ifade düzeylerinin değiştiği, evre I tümörlerde (%66,7) ve evre II tümörlerde (%69,2) nispeten daha yüksek eksprese edildiğini belirlenmiştir. Evre III ve evre IV tümörlerde ise, evre I ve evre II tümörlerden çok daha düşük olan gp78 pozitif belirlenmiştir. Bu sonuçlar, gp78'in tümör ilerlemesinin nispeten erken evresinde işlev görebileceğini ve bu nedenle agresif prostat kanserinin erken bir belirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir (62).

gp78'in, metastazı teşvik etmek de dahil olmak üzere kanser ilerlemesinde önemli bir rolere sahip olan ısı şok proteini 5 (HSPA5)'in C-terminal bölgesi ile etkileşime girdiğini, ubiquitinasyon ve degradasyonuna aracılık ettiği rapor edilmiştir. Ayrıca gp78'in düzeylerindeki düşüşün HSPA5 ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı ve meme kanseri hücrelerinin göç/invaziv kabiliyetini arttırdığı gözlemlenmiştir (63).

2.2.1.1.3. UFD1L (Ubiquitin Fusion Degradation 1 Like)

22. kromozomun q kolunun 11.21 pozisyonunda organize olan Ubikitin füzyon bozunma 1 (Ufd1) proteini, 12 ekzon tarafından kodlanan 307 aminoasitlik bir peptit dizisinden oluşmaktadır ve yaklaşık 44 kDa'luk moleküler ağırlığa sahiptir (64).

E2 bileşeni olarak ERAD kompleksinin temel bileşenlerinden biridir ve yanlış katlanmış/katlanmamış proteinlerin ER'den elimine edilmesinde anahtar bir rol oynamaktadır (65). Yanlış katlanmış proteinlerin ERAD yoluyla temizlenmesini kolaylaştırdığı ve uzun süreli ER stresinin, ERAD'a katkıda bulunan hücre döngüsü gecikmesini tetiklemek için Ufd1 ekspresyonunu baskıladığı bilinmektedir. Ufd1, Npl4 ile birlikte, ERAD'da AAA+ ATPaz Cdc48 (p97/VCP maya formu)

/p97/VCP'ye özgü aktivite sağlayan bir adaptör proteini olarak karakterize edilmiştir. Yanlış katlanmış proteinleri, ubiquitin-proteazom sistemi bağımlı bozunma için ER'den sitozole aktarmada yapısal olarak işlev gören bir bileşendir (66).

Esas olarak mayada sürdürülen ERAD analizleri, Ufd1-Npl4-p97 kompleksi için, yanlış katlanmış poliubikitin proteinlerin ER'den çıkarılmasında rol üstlendiğini göstermiştir. Fakat memeli hücrelerinde ilginç bir şekilde, Ufd1'in, p97 ve Npl4'ten bağımsız olarak gp78'in aktivitesini doğrudan arttırabildiği belirlenmiştir. Yapılan bazı çalışmalar sonucunda Ufd1'den yoksun olan hücrelerde bozulmuş ERAD mekanizması belirlenmiştir (66–68). Ufd1'in ERAD'daki rolünün dışında nukleusa protein lokalizasyonunda pozitif regülatör olarak görev aldığı, telomeraz aktivitesinin negatif yönde regülasyonunda ve işlevsiz rRNA'ların yıkımında görev üstlendiği bildirilmiştir (69).

Yapılan bir çalışmada mide kanseri dokularında Ufd1 ekspresyon seviyesinin önemli ölçüde artmış olduğu ve hastalığın ilerlemesi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (70).

Ufd1'in ifadesinin baskılanmasının hidrosikamptotesine (HCPT) dirençli kolon kanseri hücre hattı SW1116/HCPT'yi HCPT'nin sitotoksik etkisine duyarlı hale getirip getiremeyeceğini araştırıldığı çalışmada, Ufd1'in SW1116/HCPT'nin HCPT direncinde kilit bir rol oynadığı ve Ufd1'in baskılanmasının kaspaz-3 yolunun aktivasyonunu güçlendirerek ve ER fonksiyonlarını bozarak SW1116/HCPT'yi HCPT'nin sitotoksik etkisine duyarlı hale getirebildiği belirlenmiştir (71).

İnsan hasta numunelerinin genomik ve biyokimyasal analizlerinin gerçekleştirildiği bir çalışma sonucunda ise, Ufd1'in T-hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL)'de önemli ölçüde yukarı regüle edilen MYC (MYC Proto-Oncogene) ile aktive olan bir protein olduğu belirlenmiş ve Ufd1'in, işlevinin bozulmasının *in vivo* olarak MYC kaynaklı lösemi ilerlemesini baskıladığı ve insan MYC'ye bağımlı T-ALL hücrelerini *in vitro* olarak öldürdüğü belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda Ufd1, MYC güdümlü T-ALL ilerlemesinin kilit bir aracı olarak tanımlanmıştır (65).

2.2.1.1.4. Npl4 (Nuclear Protein Localization 4 Homolog)

NPLOC4 ve nuclear protein localization 4 homolog isimleri ile de bilinmekte olan Npl4, 17. kromozomun q kolonun 25.3 pozisyonunda lokalizasyon göstermektedir. Npl4, 21 ekzonun kodladığı 608 aminoasitten oluşan yaklaşık olarak 68 kDa'luk moleküler ağırlığa sahip bir proteindir (72).

Npl4, substrat molekülüne bağlı ubiquitin zincirinin tanınmasından sorumludur ve bu nedenle ubiquitin zinciriyle ilişkili reaksiyon adımı aracılık etmektedir. Npl4'ün, mayada proteazomal bozunma yolundaki Lys48 (Lysine 48)'e bağlı poliubikitinlenmiş substratları tanıyan en yukarı akış faktörü olduğu bilinmektedir. Npl4, Ufd1 ile birlikte bir heterodimer (UN) oluşturur ve Cdc48 ATPaz/p97/VCP için bir kofaktör olarak işlev görmektedir (73).

Memeli Npl4 proteini p97/VCP ile etkileşimini sağlayan ubiquitin-benzeri Domain (UBXL) alanı, çinko-parmak alanı, Mpr1/Pad1 N-terminali (MPN) alanı, C-terminali alanından (CTD) ve C-terminalinde ubiquitin ile etiketlenen hedef proteinlere bağlanmadan sorumlu korunmuş çinko parmak motifi (NZF) alanından oluşmaktadır (73). Cdc48–Ufd1–Npl4 kompleksi, birkaç poliubikitin etiketli proteinin tanınmasında işlev görür ve bozunma veya daha spesifik işleme için substrat molekülünün 26S proteazoma aktarımını kolaylaştırır (74,75).

Npl4, çeşitli hastalıklarda önemli roller oynamaktadır. Mesane kanseri dokusunda yapılan bir çalışmada Npl4'ün yukarı regüle edilmesi kötü prognoz ile korelasyon gösterdiği belirlenmiş ve Npl4'ün yukarı regülasyonu ise hücre çoğalmasını teşvik ederken, Npl4'ün baskılanması mesane kanseri hücre çoğalmasını azaltmıştır (76).

60 yılı aşkın süredir klinikte anti-alkolizm için kullanılan bir ilaç olan ve ayrıca kanser kök hücre benzeri özelliklere sahip kanser hücrelerini hedefleyebildiği bilinen disülfiram (DSF), Npl4 aracılı olarak ubiquitin-proteazom yoluyla antikanser etkileri gösterdiği yapılan birçok çalışmayla belirlenmiştir (77–79).

2.2.1.1.5. p97/VCP (Valosin Containing Protein)

9. kromozomun p kolunun 13.3 pozisyonunda yer almakta olan p97 (valosin içeren protein / mayada Cdc48), 17 ekzonun kodladığı 806 aminoasitten oluşmakta ve yaklaşık 97 kDa'luk moleküler ağırlığa sahiptir.

p97/VCP tip II AAA+ ATPaz ailesinin önemli bir üyesidir ve bir N-terminal alanı, ikili olarak paketlenmiş heksamerik halkalar oluşturan iki ATPaz alanı (D1 ve D2), kısa bir C-terminal kuyruk bölgesi içermektedir (80). Toplam hücresel proteinin ~%1'ini temsil eden en bol hücresel proteinler arasında yer alan p97, ER ile ilişkili degradasyon, hücre döngüsü regülasyonu, apoptozis, DNA hasar yanıtı, mitokondriyel kalite kontrol mekanizması ve otofaji gibi çeşitli hücresel süreçlerde yer almakta ve farklı adaptör proteinlerle etkileşim yoluyla substratları ER'den ATPaz aktivitesi ile sitoplazmaya taşınmasında görev aldığı bilinmektedir (59,80,81). p97/VCP için en iyi karakterize edilen iki adaptör, p97'yi membran füzyon olaylarına yönlendiren- protein yıkımında rol oynadığı gösterilen p47 ve Ufd1-Npl4 (nükleer protein lokalizasyonu 4) kompleksidir (81).

p97/VCP ile kompleks oluşturan Ufd1 yapısındaki UBX domaini ile, Npl4 ise UBD domaini aracılığıyla ile etkileşmektedir. p97/VCP-Ufd1-Npl4 kompleksinin mitoz bölünme esnasında iğ ipliklerinin ayrışmasının düzenlenmesinde rol aldığı, nükleer kılıfın yapılanmasında ve ERAD mekanizmasının retrotranslokasyon basamağında görev aldığı bilinmektedir (82,83).

p97/VCP, ERAD substratının çıkarılması için ana itici gücü sağlamaktadır. p97/VCP; gp78, Derlin, VIMP (VCP-interacting membrane protein), ubx2 (UBX domain-containing protein 2), Hrd1 ve UBXD8 (ER-tethered ubiquitin-X domain adaptor 8) gibi ER-lokalize proteinlerle etkileşimler sağlayarak ERAD mekanizmasının düzenlenmesine katkı sağlar. Substrat molekülünün ER lümeninden ekstraksiyonu sırasında, hatalı katlanmış proteinler ubiquitin ligaz enzimleri tarafından poliubikitin zinciri ile etiketlenir. Substrat moleküllerinin üzerine aktarılan ubiquitin zincirinin uzunluğu, p97/VCP'ye bağlanarak ERAD kompleksine alınan Ufd2 (ubiquitin fusion degradation-2) tarafından düzenlenir. Ufd2, her ikisi de ubiquitin ile ilişkili (UBA) ve ubiquitin benzeri (UBL) alanları içeren Dsk2 (ubiquitin domain-containing protein DSK2) olmak üzere ek faktörü bağlar. Bu ek faktör, ubiquitine

edilmiş substratın proteazoma degradasyon için transferinde rol oynayan mekik faktörü olarak işlev görmektedir (84).

p97/VCP insan kanserlerinde metastaz ve prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir ve kanser hücrelerinde p97/VCP ekspresyon seviyesinin hepatoselüler karsinom ve mide karsinoması olan hastaların nüks oranı ve prognozu ile korele olduğu yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir. Konservatif tedavi uygulanan prostat kanserli hastalarda p97/VCP 'nin nüks ve prognoz ile ilişkisinin incelendiği çalışmada, PSA seviyesi, Gleason skoru ve artmış kanser hacminin p97/VCP ekspresyon seviyesi ile anlamlı bir korelasyon gösterdiği ortaya koyulmuştur (85).

p97/VCP'nin meme kanseri kök hücrelerinde, artmış ifade profili sergilediği ve UPR yoluyla kısmen kanser kökünü kontrol ettiği gösterilmiştir (86). Bunun yanı sıra, kolorektal kanser, kolon kanseri, pankreas kanseri, karaciğer kanseri, mide ve özofagus kanseri, akciğer kanseri olmak üzere birçok kanser türünde p97/VCP'nin yüksek ifade düzeylerine sahip olduğu belirlenmiştir (87–92).

2.3. Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR)

ER'de meydana gelen Ca^{2+} homeostazındaki bozulmalar , redoks dengesizliği, değişmiş protein glikozilasyonu veya protein katlama kusurları gibi çeşitli hücresel stresler ER lümeninde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olmaktadır. Hatalı katlanan proteinlerin ER lümeninde birikimi sonucu ER'nin protein katlama kapasitesi aşarak “ER stresi” olarak bilinen hücresel stres durumu tetiklenmektedir (7–9).

Bu hücresel stresten hücreleri korunmak veya hücre homeostazisini yeniden inşa etmek için UPR olarak ifade edilen hücrelerin değişen fizyolojik koşullara adaptasyonuna yardımcı olan gelişmiş bir mekanizma aktive edilmektedir. Hücrede bu sürecin uyumlu aktivitesi ile ER stresinin düzeyine bağlı olarak hücreler yeniden programlanarak UPR genlerinin transkripsiyonel indüksiyonunu, global protein sentezinin translasyonel olarak zayıflatılarak ER'deki yükün azaltılması, ERAD genlerinin ifadesinin uyarılması ya da uzun süreli ER stresi sürecine ya da aşılamayan stres durumlarına cevaben hücre ölüm programlarının aktivasyonuna karar verilmektedir (6,10).

UPR mekanizmasında ER şaperonu olan BiP/GRP78, üç proksimal ER stres sensörünün aktivasyonunun ana düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır. ER membranında lokalize bu stres sensör proteinleri; Protein kinaz R (PKR) benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK/ Protein Kinase RNA-Like ER Kinase), aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6/ activating transcription factor 6) ve inositol gerektiren enzim 1 α (IRE1 α /inositol-requiring enzyme 1)'dir (10). Bu 3 transmembran proteini, BiP/GRP78 (Binding immunoglobulin protein) ile etkileşime giren bir lümen alanına sahiptir ve bu proteinlerin inaktif tutulmasından sorumludur. Fizyolojik koşullar altında BiP/GRP78 IRE1 α , PERK ve ATF6'nın aktivasyonunun negatif düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır. Ancak hücrelerde ER stresinin indüksiyonuna bağlı olarak ER lümeninde yanlış katlanmış proteinlere bağlanan şaperonlar ER'deki serbest şaperon düzeylerinin düşmesine neden olur takiben bu 3 transmembran proteinini stabilize eden ve inaktif formda tutan BiP/GRP78'lerin ayrılarak ER lümeninde katlanmamış proteinlerin varlığını algılaması sensör proteinlerinin sonraki aktivasyonlarına izin vererek UPR'nin aktivasyonuna yol açmaktadır (10,93,94).

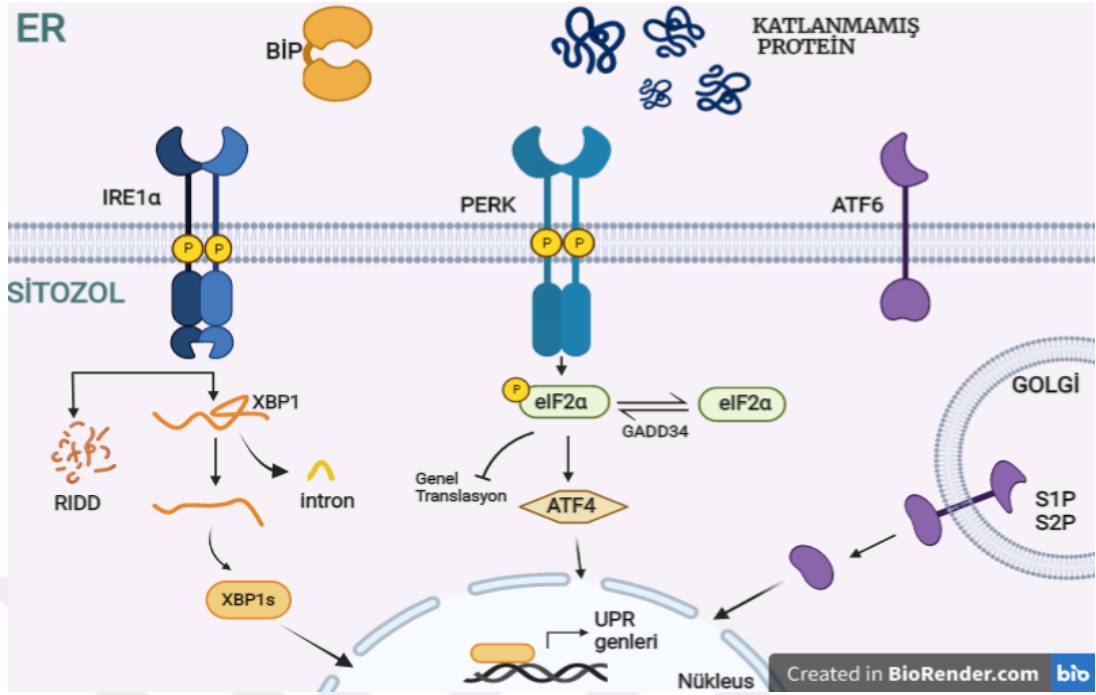
PERK, ER membranında yerleşik bir transmembran proteindir. BiP/GRP78'in PERK sinyal sensöründen ayrılması sonrasında homodimerleşerek oto-fosforilasyon yolu ile aktive olmaktadır. Aktive olan PERK, ökaryotik başlatma faktörü 2 α (eIF2 α / eukaryotic initiation factor 2)'yı serin 51 pozisyonundan fosforile etmektedir. Bu tersine çevrilebilir kovalent modifikasyon, mevcut mRNA'ların ribozomal translasyonunu inhibe ederek ER'nin protein katlama yükünü sınırlamaktadır (95). Eşzamanlı olarak, fosforile edilmiş eIF2 α , 5' çevrilmemiş bölgelerinde bir veya daha fazla yukarı akış açık okuma çerçevesini barındıran bir dizi özelleşmiş mRNA'nın translasyonuna izin vermektedir. Bunlardan biri redoks homeostazı, amino asit metabolizması, protein sentezi, apoptoz ve otofajide yer alan genlerin ekspresyonunu gibi önemli düzenleyici görevleri olan bir transkripsiyon faktörü olan ATF4 (Activating transcription factor 4) proteindir. Bu seçici translasyon hücrel homeostazisinin yeniden kurulması için gerekli protein üyelerinin sentezine izin vermektedir. Bu süreçte eşlik eden ATF4, birçok hücre tipinde yüksek düzeyde ifade edilmekte fakat etkili bir şekilde translasyonunun gerçekleşmesi için eIF2 α 'nın fosforile olması gerekmektedir. Bu nedenle PERK

sinyali aracılı olarak güçlü şekilde uyarılan ve bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapan ATF4 UPR cevap genlerini yukarı regüle ederek hatalı katlanan proteinlerin ER'deki birikiminin önüne geçilmesi için gerekli proteinlerin transkripsiyonlarını düzenler (96). Bununla birlikte ATF4, protein fosfataz 1 (PP1) düzenleyici alt birimi GADD34 (Growth arrest and DNA damage-inducible gene 34) 'ün yukarı regülasyonu yoluyla eIF2 α 'yı defosforile etmek için bir geri besleme döngüsüne katılır (97,98).

ATF4 tarafından transkripsiyonel olarak aktive edilen bir diğer transkripsiyon faktörü ise, CHOP (C/EBP Homologous Protein) proteindir. CHOP, ER aracılı apoptozisi güçlendiren proapoptotik bir transkripsiyon faktörüdür. ER stresine yanıt olarak güçlü bir şekilde uyarılır ve uzun süreli ER stresinde artan düzeyleri hücrelerin proliferasyonunda duraklamaya ve apoptotik hücre ölümünün tetiklenmesine neden olmaktadır (99).

Tip 1 ER transmembran protein kinaz/endoribonükleaz olan IRE1 α , PERK sinyal sensörü ile benzer şekilde çalışmaktadır. Normal şartlar altında BiP/GRP78 ile entegre halde inaktif durumda bulunan IRE1 α , ER stresi esnasında BiP/GRP78'in ER lümenine salınımı ile RNaz aktivitesini ortaya çıkarmak için otofosforile yoluyla aktifleşir. IRE1 α 'nın aktivasyonu üzerine mayada HAC1 (ATF/CREB1'e homolog) ve ökaryotlarda XBP1 (X-Box Binding Protein 1) olarak bilinen proteini kodlayan mRNA'lar kanonik olmayan bir şekilde, 26-nükleotidlik küçük bir intronun çıkarılması ER protein translokasyonu, katlanması ve salgılanmasında rol oynayan genleri yukarı regüle eden aktif bir XBP1 transkripsiyon faktörü olan XBP-1 splicing (XBP1s) ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır. XBP-1s; BiP/GRP78 ve GRP94 (Glucose-regulated protein 94) gibi ER şaperonları gibi protein katlama yardımcılarını kodlayan birçok geni yukarı regüle eder ve ER katlama kapasitesini yükselterek ER stresine karşı hücreyi yeniden programlamaya çalışır (98–100).

Ek olarak IRE1 α , düzenlenmiş IRE1 bağımlı bozunma (RIDD, regulated IRE1-dependent mRNA decay) olarak bilinen bir süreçte küçük bir mRNA setini veya öncü mikroRNA'ları (miRNA'lar) sahip olduğu RNaz aktivitesi ile parçalayabilmekte ve bunların bozulmasına neden olabilmektedir (100).



Şekil 3. Katlanmamış protein yanıtı (UPR) sinyal yoluna genel bakış. Adams ve ark. (2019)'dan modifiye edilmiştir (6).

UPR' da görev alan bir diğer sinyal sensörü olan ATF6 ise, tip2 transmembran proteinidir. ER'de katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesiyle meydana gelen ER stresi koşulları altında ER'den Golgi aygıtına taşınır. Golgi' de yerleşik proteazlar tarafından önce S1P (site 1 proteaz) ve ardından bir intramembran bölgesinde S2P (site 2 proteaz) tarafından proteolitik bölünmeye uğramaktadır. Sitozolik DNA bağlayıcı kısmı çekirdeğe hareket ederek aktif bir transkripsiyon faktörü olarak çalışır ve ER şaperon düzeylerini arttırmak için hedef genlerin transkripsiyonlarını düzenler (98,99,101).

Hücrelerde meydana gelen ER stres durumunun aşılmasında görev alan UPR'nin iki temel işlevi vardır: 1) Protein translasyonunu durdurmak ve protein katlanmasında rol oynayan moleküler şaperonların artan üretimine yol açan sinyal yollarını aktive ederek hücrenin normal işlevini eski haline getirmektir. 2) Belirli bir zaman aralığı içinde ilk hedeflere ulaşamadığında veya bozulma uzadığında stresli hücreleri uzaklaştırmak için pro-apoptotik CHOP proteini aracılı hedef genlerin transkripsiyonlarını yukarı regüle ederek hücre ölümünü gerçekleştirmektedir (6,93).

Genellikle köken aldığı hücrelerden daha hızlı büyüyen ve artmış glikolitik aktiviteye sahip olan kanser hücreleri glikoz kaybı, asidoz ve kanser progresyonuna katkıda bulunduğu bilinen hipoksi durumuyla da ilişkilendirilen, tümörün etkileşim içerisinde olduğu hücresel bir mikroçevre oluştururlar. ER stresine neden olduğu için bu mikro ortamın kanser hücreleri için olumsuz olduğu bilinmektedir. Hem iç hem de dış faktörlerle ER stresine maruz kalan tümör hücreleri bu hipoksik strese uyum sağlamak ve üstesinden gelmek için hücresel adaptasyonu düzenleyen ve hücrenin hayatta kalmasında düzenleyici rol oynayan UPR'yi aktive etmektedirler.

UPR' de değişiklik oluşturabilmelerinden dolayı birçok kanser türünün kronik strese uyum sağlayabildiği ve hücre ölümünden kaçınabildiği bilinmektedir. Bu nedenle UPR kanser hücrelerinin hayatta kalmasında bir avantaj sağlamakta ve geleneksel kemoterapiye direnci arttırmaktadır (102–104).

Bu nedenle, UPR bileşenlerinin kanser tedavilerinde bir terapötik hedef haline gelebileceği öne sürülmektedir.

2.4. D Vitamini

D vitamini; yağda eriyen vitaminler arasında yer alan, vücutta çok sayıda fonksiyonu bulunan ve uygun biyolojik ortamda sentezlenebildikleri için de hormon ve hormon öncülleri olan bir grup steroldür (105).

Temel olarak D vitamini, bağırsak epitel hücrelerinde kalsiyum bağlayıcı proteinlerin artmasını sağlamakta ve kalsiyum emilimini arttırmaktadır. Bu nedenle mineral dengesinin korunmasında da önemli roller üstlenmektedir. Bebeklerin ve büyüme çağındaki çocukların, dişlerinin ve kemik gelişiminin sağlıklı bir şekilde gelişmesini sağlamaktadır. Alınan D vitamini kasların güçlenmesini sağlar ve düşme sonucu oluşacak olan kırılmaları azaltması ve kemik sağlığını koruması açısından yaşlılar için özellikle önemlidir (106). Ayrıca enfeksiyonlara karşı vücudu koruyarak, direncini artırır. Yeni deri hücrelerinin oluşmasını ve kalp kasının güçlenmesini sağlar. Tiroid bezi fonksiyonları ve kan pıhtılaşması için de oldukça önemlidir (107–109).

D vitamininin dolaşımdaki düzeyi 25-hidroksivitamin D [25(OH)D] düzeyleriyle ölçülmektedir. Bu düzeylerin 20 ng/mL'den düşük olması D vitamini eksikliği, 21 ile 29 ng/mL arasında olması D vitamini yetersizliği, 30 ng/mL'den

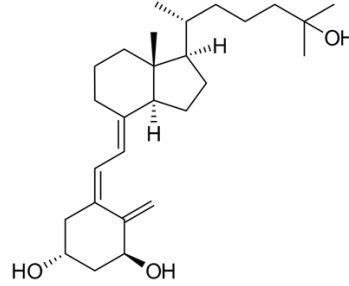
yüksek olması yeterli düzey ve 150-200 ng/mL'den yüksek olması ise D vitamini intoksikasyonu olarak kabul edilmektedir (105,110).

Vitaminlerin uzun süre yetersiz düzeyde alınması sonucunda, spesifik olmayan bazı belirtiler görülmekte ve bu durum hipovitaminoz olarak adlandırılmaktadır. D hipovitaminozu durumu ise önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir. Bu sağlık sorunları arasında kronik yorgunluk, depresyon, otoimmün hastalıklar, solunum yolu enfeksiyonları, tip 1 ve tip 2 Diyabetes Mellitus, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalık, nöromusküler bozukluklar ve kanser gibi çeşitli hastalıklar bulunmaktadır (24,111). İlişkili olduğu bilinen bu hastalıklar düşünüldüğünde, D hipovitaminozundan korunmanın ne kadar önemli olduğu açıkça görülmektedir. D hipovitaminozundan korunmak için ise, tüm yaş gruplarının haftada iki kez olmak üzere saat 10.00-15.00 arasında 5 ila 30 dakika arasında güneş ışığına maruz kalmalarının yeterli olduğu belirlenmektedir. Vücutta D vitamininin sentezlenebilmesi amacıyla güneşlenirken, güneş ışığına fazla maruz kalmanın da cilt kanseri riskini meydana getirdiği göz önünde bulundurmak önemlidir. Bu nedenle güneşten kaçınılması gerektiği belirtilen zaman dilimlerinde ise, güneşlenmek yerine vücut için gerekli olan D vitamininin besin ve diyet takviyeleri yolu ile alınması gerektiği önerilmektedir (111). D vitamini kaynaklarının arasında güneş ışınları en bilineni olsa da sığır karaciğeri, yumurta sarısı, karides, tavuk, kırmızı et, çeşitli yağlı balıklar ve doğada güneş gören mantarlar (shiitake) gibi D vitamini açısından zengin gıdalar ve D vitamini takviyeleri de kullanılabilmektedir (112).

2.4.1. Kalsitriol (1,25-dihidroksivitamin D3)

D vitamini, diyetle veya kolesterol benzeri bir öncü olan 7-dehidrokolesterolden elde edilmektedir. İnsanlar için önemli olan iki ana D vitamini formu bulunmaktadır. Bunlar; besinlerle alınan vitamin D₂ (ergokalsiferol) ve deride sentezlenen vitamin D₃ (kolekalsiferol)'dür (23). Her iki D vitamini formu da aynı yolla metabolize oldukları için her ikisi de D vitamini olarak adlandırılmaktadır. Normal şartlarda güneş ışınlarının etkisi ile %90-95'i deride sentezlenmekte olan D vitamini, insan derisinin güneş ışığına maruz kalmasıyla UV-B fotonlarının (290-315 nm arasında) fotokimyasal olarak 7-dehidrokolesterol ile etkileşime girmesiyle

gerçekleşmektedir. 7-dehidrokolesterol'ün fotolize ve steroid yapısının B halkasının bölünmesine neden olmasıyla termoizomerizasyon üzerine bir sekosteroide dönüşmektedir (113–115).

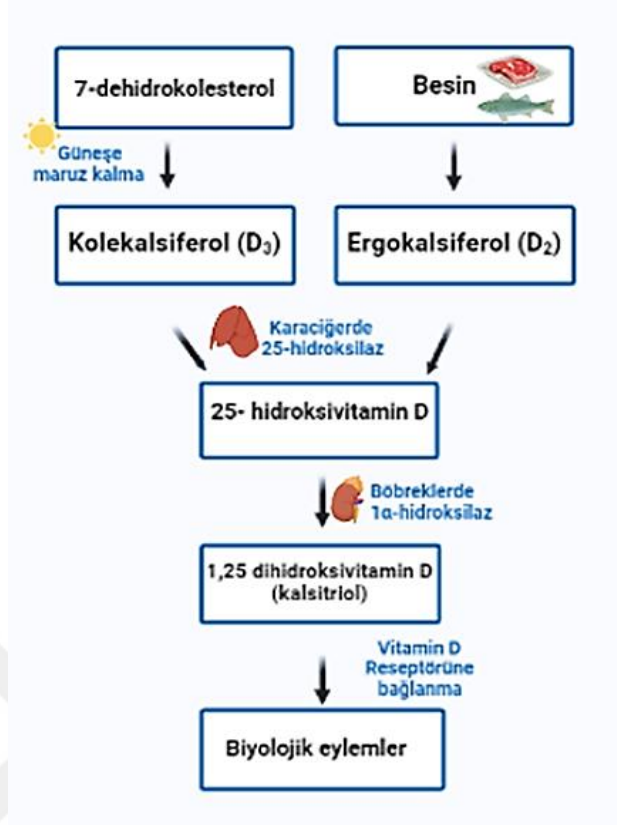


Şekil 4. Kalsitriol moleküler 3D yapısı

D vitamini ister endojen olarak vücutta sentezlensin isterse de diyet ile alınsın biyolojik olarak aktif değildirler. Bu nedenle bağırsaklardan emildikten sonra D₂ ve D₃ vitamini, D vitamini bağlayıcı proteinler (DVBP) aracılığıyla dolaşıma geçmektedir (116). Bağlayıcı proteinler ile karaciğere taşınan D vitamininin aktif olabilmesi için ilk olarak, karaciğerde D vitamini sentezindeki en önemli enzim olan 25-hidroksilaz (CYP27A1) enzimi aracılığıyla 25- hidroksi vitamin D'ye [25(OH)D] dönüştürülmesi gerekmektedir. 25-hidroksi vitamin D₃ karaciğer, iskelet kası ve yağ dokusunda en fazla depolanan form olduğu için vücuttaki vitamin deposu şekli olarak da bilinmektedir (115).

İkinci aşamada ise böbreklerde 1 α -hidroksilaz (CYP27B1) enzimi aracılığıyla D vitamininin aktif formu olan kalsitriol olarak da adlandırılan 1,25 dihidroksikolekalsiferol'e [1,25(OH)₂ D] dönüşmesi gerekmektedir (117–119).

D vitamini sentezinde, 25-hidroksi vitamin D'nin aktif D vitamini olan kalsitriol'e dönüşmesinde anahtar enzim olarak rol oynayan 1- α hidroksilaz enziminin düzenlenmesinde parathormon (PTH), kalsiyum (Ca), fosfor ve FGF 23 (Fibroblast growth factor) rol oynamaktadır (105).



Şekil 5. Vitamin D Metabolizması

Steroid hormonlar sentezlendikleri yerlerden kan yoluyla hedef organlarına taşınan, sitoplazmada veya nukleusta bulunan spesifik reseptörlerine bağlanarak gen transkripsiyonunu düzenlemek üzere reseptörleri aracılığıyla DNA'ya bağlanan hormon grubudur. D vitamini bu özelliklere sahip olduğu ve cildin ultraviyole ışınlarına maruz kalmasıyla endojen olarak sentezlenebildiği için aslında gerçek bir vitamin olmanın ötesinde hormon olarak işlev görmektedir (120,121).

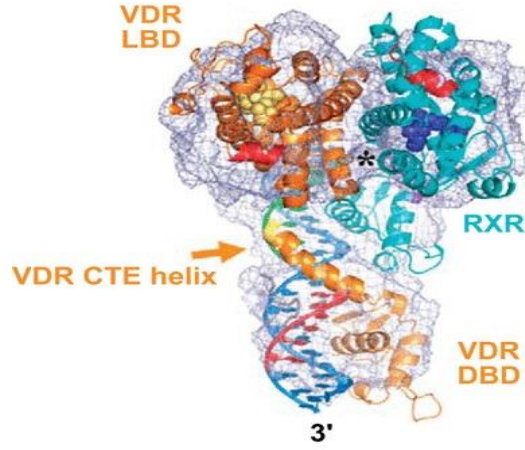
D vitamininin hormonal olarak aktif formu olan $[1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3]$, ince barsak, böbrek ve diğer dokularda bulunan ve öncelikle proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler dahil olmak üzere çok sayıda genin transkripsiyonunu düzenleyen nükleer D vitamini reseptörüne (VDR) bağlanarak etkisini göstermektedir. Ayrıca $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 'ün genomik etkileri VDR ile etkileşime giren proteinlerin endojen düzeylerine ve aktivitesine de oldukça bağlıdır (105,122). D vitamini kalsiyum homeostazının ana düzenleyicisidir ve bu nedenle kemik oluşumunda oldukça kritiktir. VDR nakavt farelerde yapılan çalışma sonucunda raşitizm benzeri fenotip

gözlemlenmiş ve VDR'nin D vitamini etkisinin ana aracısı olduğu da gösterilmiştir (123,124).

2.4.2. Vitamin D Reseptörü (VDR) ve Sinyal Mekanizması

VDR; steroidler, retinoik asit ve tiroid hormon 11 reseptörlerini kapsayan transkripsiyon düzenleyici faktörleri ve gen promotörlerindeki yanıt elemanları ile etkileşime girerek hedef genlerin transkripsiyonunu düzenleyen nükleer steroid hormon reseptörü ailesinin üyesidir. VDR, D vitamininin biyolojik eylemleri için merkezi bir rol üstlenmektedir (116,125). 30'dan fazla doku ve organda VDR bulunmasının ve yakın zamanda yüzlerce geni kontrol ettiği bilinen VDR bağlama bölgesinin keşfiyle, D vitamini ve D vitamininin biyolojik süreçler üzerinde meydana getirdiği etkileri ilgi odağı olmuştur (22).

Yapılan çalışmalarda VDR'nin insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) sinyalleşmesinde, inflamasyon ve östrojenle ilişkili yollarda, D vitamini-kalsiyumun aktivasyonunda ve düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (22,126). VDR'nin kofaktör etkileşimi için önemli olan reseptörün DNA'ya bağlanmasını sağlayan yüksek oranda korunmuş NH₂-terminal DNA bağlama alanı (DBD), daha değişken olan COOH terminali ligand bağlama alanı (LBD) ve bunları birbirine bağlayıp kararlı halde tutan birer çinko atomu olmak üzere 3 yapısal alanı bulunmaktadır. DBD ve LBD bölümleri bir menteşe bölgesi (Hinge) aracılığıyla birbirine bağlanmaktadır (127).



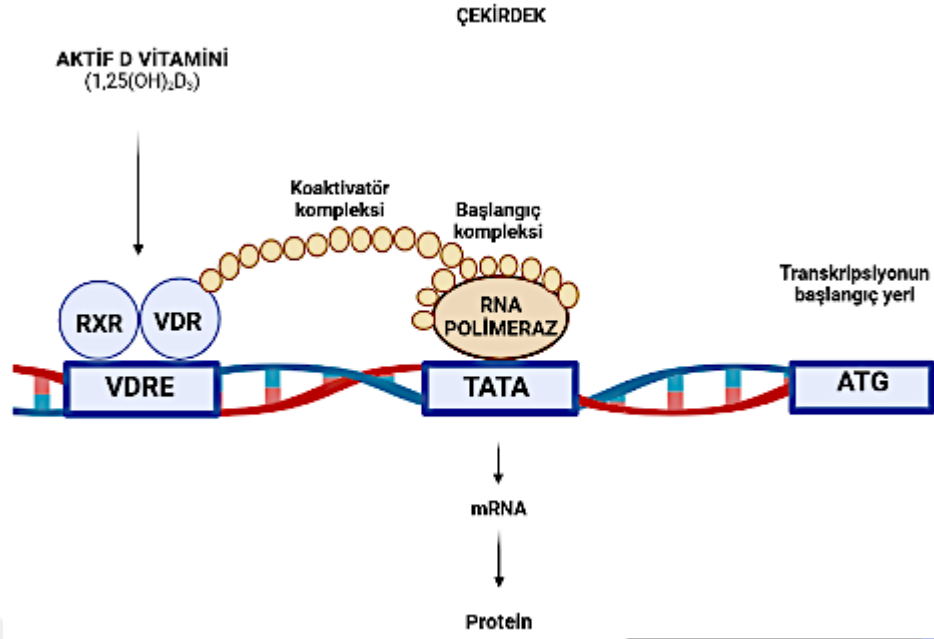
Şekil 6. Hedef DNA'sı ile tam insan RXR/VDR nükleer reseptör heterodimerik kompleksinin yapısı (128).

Aktif D vitamini olan kalsitriol, hedef hücre membranını kat ettikten sonra VDR'nin hormon bağlayıcı domainine bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonu için gerekli olan retinoik asit X reseptörü (RXR) ve çekirdek düzenleyici kompleksler ile etkileşimi kolaylaştıran bir seri konformasyonel değişikliği indükler. VDR'nin LBD'sindeki diğer ortak aktifleştirici ara yüzleri tanımlanmış olmasına rağmen, $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ bağlanmasından sonra VDR C-terminal aktivasyon sarmalının (H12 veya aktivasyon fonksiyonu 2 alanı) yeniden konumlandırılmasının, koaktivatör protein alımı için kritik olduğu rapor edilmiştir (128).

VDR'nin hedef genlerin ifadesini düzenleyebilmesi için RXR ile bir heterodimer oluşturması gerekmektedir. Aktif D vitamininin de içinde bulunduğu bu kompleks, DNA üzerinde bulunan D vitamini cevap elemanı (vitamin D responsive element, VDRE) olarak bilinen bölgeye bağlanır. RXR'nin yokluğunda ise VDR'nin, D vitamini hedef genlerindeki çoğu VDRE'ye bağlanamadığı bildirilmiştir (129). DNA'ya bağlanan VDR, RXR'nin yanı sıra, GRIP1 (Glutamate Receptor Interacting Protein 1), SRC-1 (steroid receptor coactivator 1), TIF-1 (transcriptional intermediary factor 1), ACTR (Nuclear Receptor Coactivator) gibi çeşitli yardımcı aktivatörler veya yardımcı baskılayıcılarla da etkileşime girmektedir. Bu düzenleyici kompleksler, VDR-RXR heterodimerinin gen transkripsiyonunu uyarması veya baskılaması için gereklidir. Ko-aktivatörlerin çoğu, VDR'ye bağlanarak VDR'ye bağlı transkripsiyonel aktivasyonu kolaylaştırır da diğerlerinin transkripsiyonu

etkinleştirmek için VDR'den salındığı gösterilmiştir. Genlerin VDR susturulmasında rol oynayan nükleer reseptör ko-baskılayıcı-1 (nuclear receptor co-repressor-1, NcoR-1), nükleer reseptör ko-baskılayıcı-2 (nuclear receptor co-repressor-2, NcoR-2) ve Hairless gibi ko-baskılayıcı proteinler histon deasetilaz aktivitesi yolu ile kromatin sıkışmasına neden olarak hedef genlerin ifadesinin baskılanmasına neden olabilmektedir (130). VDR'nin transkripsiyonel kontrolüne ek olarak, VDR'nin bozulmasını arttırmak yolu ile VDR düzeylerini modüle edebilen eş düzenleyici proteinlerde bulunmaktadır. Bazı hücrel sinyal olaylarının, VDR-1,25(OH)₂D₃'ün ubiquitinasyon ve ardından VDR'yi hedef alan proteoliz için proteazom kompleksinin SUG1 (suppressor of *gal* 1) ile fiziksel etkileşimini uyardığı, bu nedenle RXR ve diğer ko-düzenleyicilerin ifade düzeylerinin düzenlenmesinin VDR'nin aktivitesini modüle etmek için önemli olduğu bilinmektedir (122).

Sonuç olarak; 1,25(OH)₂D₃-VDR-RXR-VDRE etkileşimi sonucunda D vitamininin geleneksel genomik fonksiyonlarını ortaya çıkaran proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunu modüle eder (116,126,131). VDR'nin, çok çeşitli işlevleri yerine getiren proteinleri kodlayan bu genlerin transkripsiyonunu uyarması veya baskılaması için hedef genlerin promotör bölgesinde bulunan doğrudan tekrar yanıt elemanları olarak ifade edilen DR-3 bölgesine bağlanması gerekmektedir. VDR'nin bir DR-3 bölgesine bağlanması, RXR reseptörleri grubunun varlığını gerektirmektedir. RXR yanıt elemanının 5' koluna bağlanırken, VDR ise yanıt elemanının 3' kolu ile etkileşmektedir. Ek olarak, RXR'nin bağlanmasından sonra, D vitamini sinyal iletim zincirinde bir sonraki hedefin bazal transkripsiyon faktörü IIB (Transcription Factor IIB, TFIIB)'nin olduğu ve VDR'yi bağladığı gösterilmiştir (132).



Şekil 7. D vitamininin etki mekanizması. Özkan ve ark. (2011)'den modifiye edilmiştir (104).

VDR'deki ortak genetik varyantların prostat kanseri riski ile de ilişkilendirilmesi yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir ve yapılan bu çalışmalarda temel olarak beş polimorfizme odaklanılmıştır. Bunlar; FokI (ekson 2'de rs10735810), BsmI (intron 8'de rs1544410), ApaI (intron 8'de rs7975232) ve TaqI (ekson 9'da rs731236) kısıtlama bölgeleri ve poli-a mikrosatellitir. Farklı polimorfizmler, sahip olduğu konumuna bağlı olarak farklı işlevlere sahip olabilmektedir. Fok1 polimorfizmi, genin DNA bağlama alanı içindeki 5'-UTR bölgesine yakinken, diğer polimorfizmler 3'-UTR bölgesine ve ligand bağlama alanına yakın konumlarda bulunmakta ve sahip oldukları lokasyonlara bağlı olarak Fok1'den farklı işlevlere sahip olabilmektedir. Genin 3'-UTR bölgesi yakınında incelenen polimorfizmlerin bağlantı dengesizliği içinde olduğu ve bu polimorfizmlerin allel frekanslarının ırka göre değiştiği belirlenmiştir (22).

1,25(OH)₂ D₃'ün kanserdeki rolünü incelerken, 1,25(OH)₂ D₃'ün lokal doku seviyelerini kontrol eden potansiyel yolları incelemek de zorunludur. Bunlar doğrudan D vitamini metabolizmasında rol oynayan 1- α hidroksilazı kodlayan CYP27B1 geni ve 24-hidroksilazı kodlayan CYP24A1 genleridir (22,133). Ayrıca,

VDR potansiyel olarak birçok yolla yer aldığından VDR ile diğer diyet, yaşam tarzı ve çevresel faktörler arasındaki ilişkileri kanserle ilgili olarak değerlendirmek önemlidir. Gelecekteki araştırmaların önemli bir unsuru, VDR geninin işlevselliğinin daha iyi anlaşılması olduğu düşünülmektedir.

In vitro çalışmalar sonucu, D vitamininin meme bezleri dahil olmak üzere kültürde kanser hücrelerinin farklılaşmasını ve apoptozunu arttırdığını ortaya koymuş ve daha fazla VDR ifade eden meme tümörlerinin daha iyi prognoza sahip olduğu gösterilmiştir (22,133). Ingles ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, poli(A) genotipinin 20'den fazla tekrarı olan erkeklerde prostat kanseri riskinin 4 kattan fazla arttığı belirlenmiştir (134). Mittal ve arkadaşlarının Hintli bir popülasyonda yaptığı çalışmada, FF genotipini taşıyan kişilerde mesane kanseri riskinin 2 kat arttığına ilişkin veriler elde etmiştir (135). Li ve arkadaşları, VDR'de meydana gelen genetik TaqI polimorfizminin t koruyucu aleli olan bireylerde melanom riskinin önemli ölçüde azaldığını ve FokI polimorfizminin f risk alelini taşıyan bireylerde ise melanoma riskinin arttığını gözlemlemiştir (136).

Genetik polimorfizmlerin yanı sıra kalsiyum, D vitamini ve toplam enerji alımının da VDR ve kanser arasında önemli bir etkileşim içerisinde olduğu ve düşük kalsiyum ve düşük yağ alımı varlığında meydana gelen Fok1 polimorfizmi ile kolorektal kanser arasında daha güçlü bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir (137).

Literatürden vitamin D ve VDR'nin kanser hücreleri üzerindeki etkilerine odaklanan çok sayıda veriye ulaşılabilmektedir. Açıkça görülmektedir ki VDR sinyalinin kanser progresyonu üzerinde önemli düzenleyici rolleri bulunmaktadır. Buradan hareketle çalışmalarımızda 1,25(OH)₂ D₃ ve VDR sinyalinin prostat kanseri hücrelerinde ERAD ve UPR üzerindeki olası düzenleyici rollerinin tanımlanması amaçlanmıştır.

2.5. Prostat Kanseri

Prostat kanseri (PCa) erkek bireylerde 65 yaş üstü her dokuz erkekten birini etkileyen, cilt kanserinden sonra en sık rastlanan ve kansere bağlı ölümle sonuçlanan ikinci kanser türüdür (138). Prostat kanserinin dünya çapındaki insidans ve mortalitesine bağlı olarak, tanı anındaki ortalama yaş>65'tir. 50 yaşın altındaki erkeklerde prostat kanseri tanısı nispeten nadirdir, ancak bu yaştan sonra insidans ve

mortalite oranları katlanarak artmaktadır. İlerleyen yaşa ek olarak prostat kanseri geliştirme riski, pozitif aile öyküsü, Afrika-Amerikalı etnik köken, diyet ve diğer faktörlerden de etkilenebilmektedir. Afrikalı-Amerikalı erkekler için insidans oranlarının beyaz erkeklerle kıyasla daha yüksek olduğu bilinmekte ve bu eşitsizliğin nedenlerinin sosyal, çevresel ve genetik faktörlerdeki farklılıklardan meydana gelebileceği ileri sürülmektedir (139).

Baba ve erkek kardeşin prostat kanserine yakalanması, erkek bireylerde prostat kanserine yakalanma riskinin 2 kat artışına neden olmaktadır. Bu oran birden fazla birinci dereceden akrabaların prostat kanseri olması risk faktörüne bağlı olarak artmaktadır. Kansere yatkınlık geninin bulunması prostat kanseri aile kümelenmesini meydana getirebilmektedir. Fakat yaygın çevresel faktörlere maruz kalınması, bu malignitenin yüksek insidansı veya henüz bilinmeyen sebeplerden dolayı da kaynaklanabilmektedir (140).

Prostat kanserinde görülen belirtiler, hastalığın ilerleme durumuna bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle prostat kanseri erken evrede asemptomatik olabilmekte ve genellikle sadece aktif gözetim gerektirebilecek sakin bir seyir gösterebilmektedir. Prostat kanseri belirtilerinde en sık rastlanan şikayetler idrara çıkmada güçlük, idrar akışında kuvvet azalması ve noktüridir. Bunun yanı sıra menide ya da idrarda kan görülmesi, kasık bölgesinde rahatsızlık hissi, ileri evrelerde kemik metastazları ve buna bağlı olarak kemik ağrıları gibi çeşitli belirtilerde görülebilmektedir. Ancak tüm bu belirtiler halk diliyle iyi huylu prostat büyümesi olarak bilinen benign prostat hipertrofisinden kaynaklanabilmektedir. Düzenli olarak yapılan doktor kontrolleri hastalığın erken tedavisi için oldukça önemlidir.

Erken tanı için tarama, herhangi bir semptom veya belirti olmadan önce kanseri tespit etmek için yapılan testlerdir. Dijital rektal muayeneyi (DRE), prostata özgü antijen (PSA) kan testini ve transrektal ultrason (TRUS) kılavuzluğunda biyopsi tespit için kullanılan testlerdir (141).

Dijital rektal muayene prostat kanseri tespiti için prostatın makattan parmakla muayenesidir. Prostat organı parmak mesafesinde hissedilebilen bir organdır ve prostatın sertliği ve prostatın yüzeyinin pürüzlü olması prostat kanseri için önemli muayene bulgularındandır.

Hedefe yönelik prostat MR-TRUS füzyon biyopsisi hastada var olan benign prostatik hiperplazi (BPH), kanser veya diğer medikal problemlerin belirlenmesi için ileri teknoloji olan cihaz ve yazılımla, milimetrik hassasiyetle biyopsi yapılmasını sağlayan standart bir yöntemdir. Biyopsi sırasında, iğne yardımıyla rektumdan girilmesi prostat dokusundan birkaç ufak biyopsi örneği alınması ve bu doku örneklerin mikroskop altında incelenerek kanser hücrelerinin tespit edilmesine dayanmaktadır (142). Fakat hastalık şüphesinin, prostat bezine yapılan birden fazla biyopsi sonucu ile onaylanması gerekmektedir.

Prostat androjene bağımlı bir organdır ve bu nedenle prostat kanseri ise androjene bağımlı bir hastalıktır. Androjen etkisi, steroid ve peptid hormonları tarafından düzenlenen bir transkripsiyon faktörü olan androjen reseptörü (AR) aracılığıyla gerçekleşmektedir. Primer prostat kanserinde ve metastazlarda eksprese edilen AR, çoklu hücrel olayları, çoğalmayı, apoptozu, göçü, istilayı ve farklılaşmayı düzenlemektedir (143,144).

Prostat kanseri vakalarının ilk tanı anında yaklaşık %80-90'ının androjenlere bağımlı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, metastatik prostat kanseri için birincil tedavi olarak serum androjenlerinde azalmaya ve AR inhibisyonuna yönelik androjen ablasyon tedavisi (ADT) kullanılmaktadır. Tümörler çoğunlukla ADT'ye yanıt vermektedir, fakat prostat kanseri vakalarının %20-30'u iki yıl içerisinde kastrasyona dirençli prostat kanseri (CRPC) hale geldiği bilinmektedir (144,145)

Bu tür erken tarama testlerinin, kanserleri erken ve tedavi edilebilir bir aşamada tanımlamayı ve dolayısıyla başarılı tedavi şansını artırmayı, aynı zamanda hastanın gelecekteki yaşam kalitesini iyileştirmeyi amaçlamaktadır (141).

Prostat kanseri tanısı koymak için kan örneğiyle yapılan bir tarama çeşidi olan PSA (prostat spesifik antijen) Kan Testi, Prostat kanserinin erken teşhisi, tedavi olanaklarının artması, cerrahi müdahale ve radyasyon tedavisi için geliştirilmiş prosedürler ve ölüm sayısının azalması açısından oldukça önemlidir (138).

Prostat kanseri tanısında, evrelemesinde ve hastaların izleminde kullanılan en önemli tümör belirleyicisi olan PSA, prostatta bulunan hücreler tarafından üretilen ve 33 kDa ağırlığında, kallikrein gen ailesinden olan bir serin proteazdır (146,147). Kandaki PSA düzeyinin artmasının prostat kanseri ilerlemesi ile bağlantılı olduğu ve PSA'nın ırka ve prostat hacmine göre de değişebilmekte olduğu bilinmektedir.

Ayrıca aynı yaş grubunda bulunan siyahi erkeklerin, beyaz erkeklere göre daha yüksek PSA değerlerine sahip olduğu bilinmektedir (148).

Kandaki PSA seviyesi, kanser gelişiminin dışında BPH (benign prostat hiperplazisi), prostatit (prostat iltihabı), idrar yolu enfeksiyonu, cinsel ilişki sonrası, rektal muayene sonrası, biyopsi sonrası, idrar yolu girişimleri (sonda takmak) ve ameliyatları sonrası yüksek çıkabilir. PSA prostat dokusuna spesifiktir fakat prostat kanseri için spesifik değildir. Bu nedenle kanda bulunan yüksek PSA seviyesinin kanserle ilişkili olduğu anlamına gelmezken, düşüklüğü de kanseri ekarte etmek için yetersiz kalabilmektedir. Prostat kanseri tarama ve teşhisinde PSA testine ek olarak prostat muayenesi de yapılabilmektedir (146).

PSA için yaygın taramaların başlatılmasından ardından prostat kanseri insidansında önemli bir artış gerçekleşmiştir. Ancak PSA taramasının, erken evre hastalık teşhisi ve verilen tedavi sürecinin takibinde yardımcı olduğu bilinmektedir (140,149).

Diğer kanserlerde olduğu gibi prostat kanserinin de nasıl geliştiğine ilişkin kesin bir bilgi yoktur. Prostatta oluşan kontrolsüz hücre büyümesi ve çoğalması sonucunda prostat kanseri meydana gelmektedir. DNA'daki hataları onaran, hücre büyümesini kontrol eden, hücrelerin doğru zamanda ölmesine neden olan tümör baskılayıcı genlerde veya hücrelerin büyümesi, bölünmesi ve hayatta kalmasına yardımcı olan bazı onkojenik genlerde meydana gelen DNA mutasyonlarının prostat kanseri gelişmesine neden olduğu düşünülmektedir. Prostat kanserlerinin yaklaşık %10'unun ise bu tür meydana gelen kalıtsal gen değişikliklerinden meydana geldiği bilinmektedir (150,151).

BRCA1 (Breast cancer type 1 susceptibility protein) ve BRCA2 (Breast cancer type 2 susceptibility protein) gibi tümör baskılayıcı gen grubunda ve CHEK2 (Serine/threonine-protein kinase Chk2), ATM (Serine-protein kinase ATM), PALB2 (Partner And Localizer Of BRCA2) ve RAD51D (RAD51 Paralog D) gibi diğer tümör baskılayıcı DNA onarım genlerinde meydana gelen mutasyonlar, bazı kalıtsal prostat kanserlerinden de sorumlu olabilmektedir. Bir hücrenin 2 yeni hücreye bölünmeye hazırlanması sırasında DNA'da meydana gelen hataları (uyumsuzlukları) düzeltmeye yardımcı olan MSH2 (MutS Homolog 2), MSH6 (MutS Homolog 6), MLH1 (MutL homolog 1) ve PMS2 (PMS1 Homolog 2) gibi DNA uyumsuzluğu

onarım genlerinden birinde meydana gelen kalıtsal mutasyonlara sahip erkeklerde, prostat ve diğer bazı kanserlerin riskinde artışa neden olduğu bilinmektedir (150).

Tümör baskılayıcı genlerden olan RNASEL (Ribonuclease L, eski adıyla HPC1)' de meydana gelen kalıtsal mutasyonlar, prostat kanseri riskinin artmasına neden olabilmektedir (152,153). Prostat bezinin gelişiminde önemli olan HOXB13 (Homeobox B13) geninde nadir olarak meydana gelen mutasyon erken başlangıçlı prostat kanseri ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca prostat kanserini meydana getiren mutasyonların genellikle kişinin yaşamı sırasında meydana gelen edinilmiş gen mutasyonları olduğu belirlenmiş ve bu edinsel mutasyonların ne sıklıkla meydana geldiği, hangi faktörlerden etkilendiği tam olarak bilinmemektedir. Fakat prostat hücrelerinin hızlı büyüyüp bölünme hızına göre meydana gelebilecek mutasyon oranları da o hızda artmaktadır. Bu nedenle prostat hücresi büyümesini destekleyen testosteron gibi androjen seviyesinin aşırı yüksekliği, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (Insulin-like Growth Factor 1, IGF-1) gibi hormona sahip olma, prostattaki iltihaplanma yoluyla normal hücrenin kanser hücresine dönüşmesine katkı sağlaması gibi çeşitli faktörlerin kanser oluşum sürecini hızlandırdığı ve erkeklerin prostat kanserine yakalanma olasılığını artırdığı bilinmektedir.

Prostat biyopsisi sonucu adenokanser saptandığında hastalık saldırganlık derecesine göre sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırma Gleason skoru adı verilen bir yöntemle gerçekleştirilmektedir. Prostat kanseri derecelendirilmesi için kullanılan Gleason skoru prostat kanseri hücrelerinde farklılaşma derecesi, tümörün büyüme ve metastaz yapma hızları hakkında fikir vererek tümörün derecesini (grade) belirlemede kullanılan derecelendirme şemasıdır. Prostat biyopsisinin patolojik incelemesi sonucunda, kanser hücrelerinin mikroskop altında anormal görüntüsü ve saldırganlık görüntüsüne bağlı olarak 1'den 5'e kadar derecelendirilmektedir. Kanserli hücre normal prostat dokusuna çok benziyorsa, derece 1 olarak adlandırılmaktadır. Daha anormal görülen ve daha hızlı büyüyen kanserler daha yüksek derecelidir. 1. ve 2. dereceler pek kullanılmazken, neredeyse tüm prostat kanserleri 3. derece veya daha yüksek derecelerle ilişkilendirilmiştir (154,155).

Farklı derecelerde alanlara sahip olan prostat kanserlerinde, en yoğun görülen farklı iki grup dereceleri belirlenmesi ve bu derecelerin toplanmasıyla kanserin Gleason skoru (Gleason toplamı olarak da adlandırılır) belirlenir. Belirlenen

Tümörde en yaygın olan derece, ilk derece olarak belirlenmektedir. Örneğin, tümörün çoğunun 4. derecede olduğu ve daha azının 3. dereceden oluştuğu durumlarda $4+3=7$ olarak hesaplanır ve Gleason skorunun 7 olduğu anlamına gelir. Kanserler Gleason skorunun 6 veya daha düşük olması durumunda düşük dereceli olarak, Gleason skorunun 7 olması durumunda orta derecede farklılaşmış veya orta derece olarak, 8 ila 10 derece arasında olan kanserler ise, kötü farklılaşmış veya yüksek dereceli olarak adlandırılabilir (156).

Hasta yönetimini planlamak, yeni tedavileri test eden klinik araştırmaların uygunluğunun belirlenmesinde kullanılan bu derecelendirme sistemi, tüm analizlerde güçlü ve bağımsız prognostik olarak kullanılmaktadır. PSA için serum testi yoluyla erken teşhis, cerrahi müdahale ve radyasyon tedavisiyle ölüm oranı önemli ölçüde azaltılmış olmasına rağmen ilerlemiş hastalığı olan erkek bireyler için henüz etkili bir tedavi yaklaşımı bulunmamaktadır (138).

2.5.1. Prostat Kanseri ve D vitamini

D vitaminin antikanserojen etkisi ilk olarak, Kuzey Amerika'da kanser mortalitesi ve solar radyasyon arasındaki ilişkisinin araştırıldığı Apperly'nin çalışmasıyla ortaya çıkarılmıştır (157). Yapılan birçok çalışma sonucunda kuzey kutbunda yaşayan popülasyonda görülen kanser oranının, güney kutbunda yaşayan popülasyondan daha yüksek olduğu bilinmektedir. Antikanserojen etkisinin ortaya çıkabilmesi için serum 25(OH)D değerinin 30 ng/mL'dan daha yüksek olması gerektiği bilinmektedir (116,158).

Erkeklerde kanser ölümlerinin başlıca nedenlerinden olan Prostat kanserinin, 1990 yılında Schwartz ve Hulka'nın yaş, siyah ırk ve kuzey enlemleri dahil olmak üzere prostat kanserini meydana getirebilecek başlıca risk faktörlerinin tümünün D Vitamini sentezinin azalmasıyla ilişkili olduğu ve D vitamini eksikliğinin prostat kanseri riskini artırdığına dair yaptıkları ilginç hipotezleri sonucunda ortaya çıkarılmıştır. Bu hipotez sonucunda birçok epidemiyolojik çalışmalar yapılmıştır (159). Bu epidemiyolojik çalışmalar sonucunda ise, prostat kanseri için risk faktörleri ile D vitamini düzeylerinin düşmesine neden olabilecek durumlar arasında korelasyonlar olduğu gösterilmektedir.

Daha yakın tarihli çalışmalarda $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'nin büyüme engelleyici etkilerinin altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen, LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ve analoglarının ağırlıklı olarak hücre döngüsü durmasıyla antiproliferatif aktivite gösterdiği ve az düzeyde olsa da apoptozu indüklediği belirlenmiştir. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ büyümenin durdurulmasına, IGF bağlayıcı protein-3'ün (insulin like growth factor binding protein 3, IGFBP-3) uyarılması aracılık eder, bu da hücre döngüsü inhibitörü p21'in ekspresyonunu artırarak büyümenin durmasına yol açmaktadır. Aynı zamanda proliferasyon etkilerinin teşvik edilmesini ve tümör hücresi istilasının, metastazın ve anjiyogenezin inhibisyonunu da içermektedir (18,19,21).

Vitamin D ve VDR aracılı gerçekleşen özelleşmiş sinyal iletim mekanizmasının çok sayıdaki normal ve başta kanserli dokular olmak üzere çeşitli patolojik özellikteki dokulardaki etkilerine ilişkin literatürde çok sayıda bilgi yer almaktadır.

Küçük klinik deneyler, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün prostat kanseri hastalarında PSA artış hızını yavaşlatabildiğini göstererek, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ veya analoglarının prostat kanserinde klinik olarak etkili olacağına dair kavramın kanıtını ortaya koymuştur. Sonuç olarak; prostat kanseri için geliştirilen tedavi ve/veya korunma stratejilerinde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün rolü olduğu ortaya koyulmuştur. Bu sonuçlara ek olarak, normal veya kanser kaynaklı prostat epitel hücrelerinin birincil kültürlerinin $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sentezini katalize eden enzim olan 1 α -hidroksilazı eksprese ettiği ve bu seviyelerin kanser kaynaklı hücre dizilerinde çok daha düşük olduğu bulunmuştur. Bu bulgu sonucunda, prostat kanserinde 25-hidroksivitamin D_3 [$25(\text{OH})\text{D}_3$]'ün kimyasal önleyici bir ajan olarak kullanma olasılığını artırmaktadır (19).

Yapılan bir popülasyona dayalı vaka kontrol çalışması ile, VDR geninin tamamındaki polimorfizmler ile CYP27B1 ve CYP24A1 kodlayan genler arasındaki ilişki araştırılmış ve ortak varyantları tahmin etmek için tek nükleotid polimorfizmleri seçilerek genotiplendirilmiştir. Genotip analizinde ise, iki VDR lokusundaki (rs2107301 ve rs2238135) homozigotlar, homozigot ortak allel ile karşılaştırıldığında 2 ila 2.5 kat daha yüksek prostat kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir. İlişkili iki VDR tek nükleotid polimorfizminin tanı yaşı, prostat kanseri agresifliği, birinci derece aile prostat kanseri öyküsü veya D vitamini alımı

ile değiştirildiğine dair hiçbir kanıt bulunamamıştır. Yapılan çalışmanın bulguları doğrultusunda, VDR genindeki polimorfizmlerin prostat kanseri riski ile ilişkili olabileceği ve dolayısıyla D vitamini yolunun prostat kanseri gelişiminde etiyolojik bir rolü olabileceğini düşündürmektedir (133). Bu nedenle VDR aracılı olarak kontrol edilen yeni sinyal iletim yollarının ve fizyolojik öneme sahip hücre içi mekanizmaların karakterize edilmesi son derece önemlidir.

VDR geninde genetik değişikliklerin protein sekansında meydana gelen değişikliklere neden olmasından dolayı Ca^{+2} metabolizması yanında hücre proliferasyonu ve immün fonksiyonların etkilendiği önemli bozuklukların da meydana gelmesine sebep olabileceği bilinirken, VDR geninin 3'-ucundaki alelik varyasyonun da prostat kanseri gelişme riskinin 3-5 kat artması ve kemik mineralizasyonundaki farklılıklar ile de ilişkilendirilmiştir (116,160).

D vitamini aktif formu olan kalsitriolün VDR'ye bağlanarak hücre proliferasyonunu inhibe eden çeşitli genleri düzenlediği ve kanserli hücrelerin büyümesini inhibe ettiği yapılan *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında gözlemlenmiştir.

Kalsitriol, hücre döngüsünde yer alan p21 ve p27 ekspresyonunu uyarıp, tümör progresyonu ve metastazı ile ilişkili olduğu bilinen e-kaderin ekspresyonunu uyardığı gözlenirken, DNA hasarının tamirini ve tümör protein 53 (p53) miktarını arttırdığı yapılan çalışmayla gösterilmiştir (161).

Caenorhabditis elegans'ta yapılan bir diğer önemli çalışmada ise, Vitamin D uygulaması sonrasında VDR aracılı olarak stres tepki yolu genlerinin (*skn-1*, *ire-1*, ve *xbp-1*) etkilendiği ve *C. elegans*'ta diyetle D vitamini eksikliğinin yaşlanmaya bağlı olarak hücrelerdeki protein kaybını hızlandırdığı, yaşam süresini kısalttığı gözlemlenmiştir. Bu fikri destekleyen VDR nakavt farelerin ise bazı erken yaşlanma fenotiplerini sergilediği ancak hipervitaminoz D'nin fare modellerinin de erken yaşlanmasının söz konusu olduğu görülmüştür (162,163).

Bu veriler doğrultusunda; vitamin D ve VDR aracılı indüklenen sinyal mekanizmasının son yıllarda prostat kanseri moleküler biyolojisinde çok daha dikkat çekici hale gelen ER stresi, UPR ve protein kalite kontrolü ile ilişkili üyeler üzerinde düzenleyici rollere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde bu konuya ilişkin herhangi bir mekanistik veri bulunmamaktadır. Yürütülen bu tez çalışmasında,

prostat kanserinde kritik öneme sahip olduğu bilinene UPR ve ERAD sistemleri üzerinde 1,25(OH)₂ D₃'ün olası düzenleyici rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. GEREÇ

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında temel olarak;

Dijital vorteks	: Biosan vortex V-1 plus
Güç kaynağı	: Bio-Rad Powerpac Basic
Dikey elektroforez	: Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Cell
Yatay elektroforez sistemi	: Bio-Rad
Rocker çalkalayıcı	: Biosan MR12
Orbital Çalkalayıcı	: Biosan PSU-20i
Karıştırmalı blok ısıtıcı	: Biosan TS-100C
Blok ısıtıcı	: Biosan TDB-100
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	: IKA C Mag HS7
Membran transfer sistemi	: Bio-Rad
CO ₂ İnkübatörü	: ESCO
Mikropipet seti	: Thermo Scientific
Cam jel kasetler/taraklar	: Bio-Rad
Çok kanallı mikropipetler	: Thermo Scientific
Sonikatör	: Bandelin 4000
Ultrasonik su banyosu	: Elma P70H

Vakum pompası	: Rocker Chemker 400
Etüv	: BINDER
Laminer Hava Akışlı Kabin	: ESCO typeA2 E-series
-86°C derin dondurucu	: BINDER
Hassas Terazı	: SHIMADZU AP224W
Analitik terazı	: Precisa 321 LX3200C SCS
Mikrodalga fırın	: Bosch
Masaüstü Soğutmalı Santrifüj	:SL8R Thermo Scientific
Masaüstü Santrifüj	: TG16 Ying Tai
Mini spin	: MySPIN6 Thermo Scientific
Mikro santrifüj	: V12 Fisher Brand
Su banyosu	: Biosan WB-4MS
Spektrofotometre	: BioTek Epoch2
Su banyosu	: Thermomac
+4 °C Buzdolabı	: Vestel
-20 °C Derin dondurucu	: Vestel
Otoklav	: Hirayama HV-50
Ultrasaf su cihazı	: BLUELAB-Blueaqua-P
Distile su cihazı	: BLUELAB-Blueaqua-B
Saf su cihazı	: NUVE-ND12
Konvansiyonel PCR cihazı	: Bio-Rad T100

Gerçek zamanlı PCR cihazı	: Bio-Rad CFX96
Mikrospektrofotometre	: MySPEC – VWR
İnvert mikroskop ve Kamera	: Sunny SopTop ICX41
GelDoc Gel Documentation System	: Bio-Rad
Buz makinesi	: Scotsman AF80
pH Metre	: Thermo Orion Star A211
Hemositometre Lamı	: Marienfeld Superior
Mikro Spektrofotometre	: Allsheng
Görüntüleme sistemi	: Thermo Fisher Scientific
	iBright CL1000

Yukarıda listelenen ekipmanlardan faydalanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Sarf Malzemeler

3.1.2.1. Kitler

Bikinkoninik asit (BCA) protein miktar tayini tahlil Kit (Pierce), Monoarch™ Total RNA izolasyonu Kiti (New England Biolabs), SYBR Green I Master mix kiti (Bio-Rad), Clarity Western ECL Substrat kiti (Bio-Rad), iScprit cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad), PCR Master mix (Gene Mark), MycoAlert® Mycoplasma Detection kit (Lonza) parantez içerisinde belirtilen firmalardan temin edilmiştir.

3.1.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sodyum Azid, Tween-20, Triton X-100, Amonyum Persülfat (AP), Ponceau S Stain, 2- Merkaptoetanol (2-ME), sodyum deoksikolik asit, Nonidet P-40, gliserol, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), etilenglikoltetraasetikasit (EGTA), Akrilamit-Bisakrilamit Solüsyonu, etidyum bromür, Agarose, sodyum klorür, sodyum fosfat monobazik phosphate anhidrus, sodyum fosfat dibazik phosphate anhidrus, N,N',N'-tetramethylenediamine, Tris, glisin, memeli proteaz inhibitörü, memeli fosfotaz inhibitörü Serva firmasından temin edilmiştir. 1,25(OH)₂ D₃ (#D1530) Sigma Aldrich firmasından satın alınmıştır.

3.1.2.3. Kullanılan Antikorlar

Çalışmalarda kullanılan tavşan poliklonal antikorları anti-PERK (#24390-1-AP), anti-Ire1α (#27528-1-AP), anti-XBP-1s (#24868-1-AP), anti-Ufd1 (10615-1-AP), anti-p97/VCP (10736-1-AP), anti-Npl4 (11638-1-AP), anti-gp78 (16675-1-AP), anti-BiP/GRP78 (11587-1-AP) ve anti-ubikitin (#10201-2-AP) Proteintech firmasından, tavşan monoklonal antikor anti-Hrd1 (#14773) ve tavşan poliklonal anti-eIF2α (#9722), anti-phospho-eIF2α (Ser51) (#9721) Cell Signaling Technology firmasından satın alınmıştır. Fare monoklonal beta-aktin antikor (# A5316) Sigma Aldrich'ten satın alınmıştır. HRP konjuge keçi anti-fare (# 31430) ve keçi anti-tavşan (# 31460) IgG (H + L) Pierce'den satın alındı.

3.1.2.4. Kullanılan Primerler

Gen ifadelerinin değerlendirileceği çalışmalarda kullanılan primerler, Hrd1, gp78, p97 / VCP, Ufd1, Npl4, SVIP, Ufd2, Derlin1, CYP3A5 ve RPLP0 dahil olmak üzere ilgilenilen genler için özel olarak tasarlanmıştır.

Çalışmalarda kullanılan tüm primerler 100 nM sentez skalasında temin edilmiştir. Hedef genlerin bilgilerine Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI, National Center for Biotechnology Information) veri tabanından ulaşılarak mRNA dizi bilgileri elde edilmiştir. Hedef primerler NCBI Primer BLAST ara yüzü

kullanılarak dizayn edilmiş ve özgülleri in silico olarak test edilmiştir. Primer dizi bilgileri aşağıda sunulmuştur.

Tablo 1. Çalışmalara yer alan hedef genlerin NCBI gen kimlik numaraları ve primer dizi bilgileri

		Primer dizi bilgisi
Hrd1 Gene ID:84447	İleri Primer	5'-TGTCCTAATCGCAGCTCTCACTAA-3'
	Geri Primer	5'-ACACTCCACTGCTGATTCTCTAC-3'
gp78 Gene ID:267	İleri Primer	5'-CCGTGTTTCTCCGCCAATCTTCT-3'
	Geri Primer	5'-CAGGGACACCTCAATACTGATTTC-3'
p97/VCP Gene ID:7415	İleri Primer	5'-GTCTTCGCTTTGATTGCTAACCC-3'
	Geri Primer	5'-GCCTGTTCTCGAAGTACCCTTAC-3'
Ufd1 Gene ID:7353	İleri Primer	5'-GCAGTGCTGTCTGGACGATTTA-3'
	Geri Primer	5'-GTGCTTGAAGGATTGTCTTTGG-3'
Npl4 Gene ID:55666	İleri Primer	5'-CCTCATCAGCTTTCTCCGCTAAA-3'
	Geri Primer	5'-CTGACTCCAGGTCTGTTCTTAATG-3'
SVIP Gene ID:258010	İleri Primer	5'-CTGTGAGTCAGCCAAGAATAGAG-3'
	Geri Primer	5'-CACTGAAGGATCCACTGAAGAA-3'
Ufd2 Gene ID:10277	İleri Primer	5'-GTCTCCTGGTACTAGGACTATCT-3'
	Geri Primer	5'-GAGCAGCTCATCACTCCTAATG-3'
Derlin1 Gene ID:79139	İleri Primer	5'-GGGAGGCCGCTTACAAGAAATA-3'
	Geri Primer	5'-GAAGGCAAAGTGCATGGAAATAA-3'
CYP3A5 Gene ID:1577	İleri Primer	5'-ATGCCCTTCTCTCTCCCGTATT-3'
	Geri Primer	5'-GACCGAACAGGACCAGGAAATAG-3'
VDR Gene ID:7421	İleri Primer	5'-CCGAGCGTTAGATTGAGGATGAG-3'
	Geri Primer	5'-GATACAGCACCTGGAACGAGAA-3'
RPLP0 Gene ID:6175	İleri Primer	5'-GTTGTCGCTTTGATTGCTACCC-3'
	Geri Primer	5'-GCTGTTCTCGAAGTACCACTTAC-3'

3.1.2.5. Kullanılan Diğer Malzemeler

PVDF membran, 96 kuyucuklu Realtime PCR plate, Plate seal, 100mm hücre kültürü petrilere, 6 kuyucuklu hücre kültür kabı, 0.1ml DNase/RNase free tüp, 1.5ml eppendorf, 0.5ml eppendorf, 15ml steril falkon tüp, 50ml steril falkon tüp, 10ml serolojik pipet, 25ml serolojik pipet, 10µl pipet ucu, 100µl pipet ucu, 1000µl pipet ucu, 0.2µM şırınga tipi steril filtre, 0.2µM steril filtre kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

3.1.3.1. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez) ve İmmunoblotlama Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

3.1.3.1.1. 2X RIPA (Radyoimmünopresipitasyon Assay) Lizatlama Tamponu

Hassas terazi yardımıyla 40 mg SDS (sodyum dodesil sülfat sodyum tuzu) ve 200 mg 7-DOC (deoksikolikasit) tartılmıştır. Üzerine 0,4 ml NP-40 ve 4 ml 10X PBS ilave edilmiştir. Mezür yardımıyla son hacim distile H₂O ile 20 ml'ye tamamlanarak +4°C'de saklanmıştır.

3.1.3.1.2. 10X PBS (Phosphate Buffer Saline)

11,5 g sodyum monohidrojen fosfat, 87,5 g sodyum klorür, 2,3 g sodyum dihidrojen fosfat hassas terazi yardımıyla tartılmıştır. Distile H₂O ile son hacim 1 litreye tamamlanmıştır. 10X PBS'in pH'sı 7,4'e ayarlanmıştır. Otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığı koşullarında saklanmıştır.

3.1.3.1.3. 4X SDS-PAGE Ayırma Tamponu (Resolving Buffer)

1,5 M Tris HCl (90,855 g), % 0,4 h/h TEMED (2 ml), % 0,4 a/h SDS (2 g) tartılıp distile H₂O ile çözdürülmüştür. Mezür yardımıyla son hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır. pH'sı 8,9 olarak ayarlanmış olan 4X ayırma tamponu +4°C'de saklanmıştır.

3.1.3.1.4. 4X SDS-PAGE Yığınlama Tamponu (Stacking Buffer)

0,5 M Tris HCl (30,285 g), % 0,4 h/h TEMED (2 ml), % 0,4 a/h SDS (2 g) tartılıp distile H₂O'da çözdürülmüştür. Mezür yardımıyla son hacmi 500 ml'ye tamamlanmıştır. pH'sı 6,8'e ayarlanmış olan 4X SDS -PAGE yığınlama tamponu +4°C'de saklanmıştır.

3.1.3.1.5. 4X Protein Yükleme Tamponu

4 g SDS, 40 mg bromofenol mavisi, pH=6,8 olan 10 ml 1 M Tris HCl, 2 ml %99'luk Gliserol, 2 ml 14,7 M 2-ME, 5 ml 0,5 M EDTA distile H₂O'da çözündürülmüştür. Son hacmi 50 ml'ye tamamlanmış olan 4X protein yükleme tamponu ependorflara 1'er ml olacak şekilde bölünmüştür. -20°C'de saklanmıştır.

3.1.3.1.6. 10X SDS-PAGE Yürütme Tamponu

30,2 g Tris Baz, 144 g Glisin, 10 g SDS (sodyumdodesilsülfat sodyum tuzu) tartılarak distile H₂O'da çözündürülmüştür. Son hacmi mezür yardımıyla 1 litreye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığı koşullarında saklanmıştır.

3.1.3.1.7. 10X Transfer Tamponu

Tartılan 30,33 g Tris-baz, 144 g Glisin distile H₂O'da çözündürülmüştür. Son hacmi 1 litreye tamamlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.1.3.1.8. 1X Yıkama Tamponu

100 ml 10X PBS ve 1 ml Tween-20 distile H₂O ile 1 litreye tamamlanmıştır. pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.1.3.1.9. %10 AP (Amonyum persülfat) Çözeltisi

1 g AP 10 ml distile H₂O'da çözündürülmüştür. Ependorflara 1 ml olacak şekilde bölünmüş ve -20°C'de saklanmıştır.

3.1.3.1.10. %5'lik Yağsız Süt Bloklama Ajanı

500 ml 1X yıkama tamponu içerisinde 25 g yağsız süt tozu çözündürülmüş ve pH'sı 7,4'e ayarlanmıştır.

3.1.3.1.11. Ponceau S Çözeltisi

Hassas terazide tartılan 0.1gr Ponceau S, 5 ml asetik asit ve dH₂O ile çözdürülmüştür.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.1.1. Hücre Hattı Seçimi

Kalsitriol etkilerinin inceleneceği tez çalışmalarında *in vitro* da prostat kanserini iyi mimik eden ve çalışmalarda sıklıkla kullanılan androjen reseptörü pozitif insan epitelyal prostat kanser hücre hatları LNCaP ve 22Rv1 kullanılmıştır.

İlk kez 1977 yılında metastatik prostat karsinoması teşhisi konmuş 50 yaşındaki bir hastadan izole edilerek tanımlanan LNCaP hücreleri tek katmanlı büyüme özelliği göstermektedir (164).

Farelerde seri olarak çoğaltılan bir zenograftan türetilen bir insan prostat karsinomu epitel hücre dizisi olan 22Rv1 hücre hattı ise kültürde tek katmanlı büyüme özelliği göstermektedir (165).

3.2.1.2. Hücre Kültürü Koşulları

İnsan prostat adenokarsinomu hücre hattı LNCaP ve insan prostat karsinomu epitel hücre hattı 22Rv1 hücreleri, %10 fetal sıgır serumu (FBS) ve 2 mM L glutamin içeren Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 besi ortamında çoğaltıldı. Hücreler konvansiyonel hücre kültürü şartları olan 37 °C sabit sıcaklıkta %5 CO₂ ve %95 hava nemlendirilmiş bir atmosferde bir hücre kültürü CO₂ inkübatöründe tutuldu.

Hücre kültürü işlemlerinde kullanılan besi ortamlarına hücrelerin büyüme ve gelişimini yavaşlatarak hücre morfolojisini değiştirme riskinin bulunmasından ve antibiyotiklerin mikoplazma kontaminasyonunu maskeleyerek kontaminasyon riskini

arttırmasından dolayı antibiyotik kullanılmamıştır. Ayrıca antibiyotiklerin hücresel yanıtları değiştirdiğinden kullanımı tercih edilmemiştir.

3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler bir invert mikroskop yardımıyla morfolojik ve sayısal açıdan düzenli olarak incelenmiştir. Hücrelerin besi ortamları 2-3 gün aralıklarla taze besiyeri ile değiştirilmiştir.

Pasajlama işlemi öncesinde serum içeren besiyeri sıcaklığı 37°C'deki su banyosunda ısıtıldı. Hücre kültürü inkübatöründe tutulmakta olan kültür petrisinde yer alan hücrelerin, hücre canlılığı ve yoğunluğu invert mikroskopta incelendi. Kontrolü yapılan hücreler steril laminar akış kabinine alındı.

100 mm'lik hücre kültür kaplarında büyütülmüş hücreler kültür kabının yüzeyini %75 – 90 (konfluent) oranında kapladığında tüm besi ortamı vakum pompası yardımı ile dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılabilmesi için hücre-yüzey ve hücre-hücre etkileşimlerinin kaldırılmasını sağlayan tripsin solüsyonu kullanıldı. Hücelere ilk olarak %0.05'lik Tripsin-EDTA ve ardından %0.25'lik Tripsin-EDTA ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Tripsin enziminin optimum aktivasyonu için kültür kapları 37 °C'deki CO₂ inkübatöründe 1-2 dakika kadar inkübe edilmiştir. Hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılmaları invert mikroskop altında kontrol edilmiş, gerektiği durumda ise inkübasyon süresi uzatılmıştır. İnvirt mikroskopta da incelenen, yüzeyle ve birbirleri arasındaki bağlantıları kopmuş olan hücreler serum eklenen taze besiyeri ile pipetaj yapılarak toplandı. Süspanse hale getirilmiş olan hücreler seyreltilme oranına ve pay edileceği hücre kültür kaplarının büyüklüklerine bağlı olarak istenilen hücre konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla hücre sayım işlemi gerçekleştirildi. Hücre konsantrasyonuna bağlı olarak besi ortamları ile dilüsyonları gerçekleştirildi ve yeni hücre kültür kaplarına ekimleri gerçekleştirilerek konvansiyonel kültür şartlarında hücreler büyütülmeye devam edildi. Hücrelerin pasaj numaralarının takibi için kültür kaplarının üzerine her pasajlama işlemi sonrasında pasaj numaraları not alındı.

3.2.1.4. Hücre Sayım İşlemi

Mililitrede bulunan canlı hücre sayısının hesaplanabilmesi tripan mavi boyaması yöntemiyle hücre sayım işlemi gerçekleştirilmiştir. Ependorf tüpü içerisinde 10 µl süspanse hele getirilmiş hücre ve 90 µl tripan mavisi boyası homojen hale getirilmiştir. Sayım işlemlerinde hemasitometre lamı ve lameli kullanılmıştır. Bu işlemde, Neubauer lamı lamelin üzerine kapatıldı ve lam lamelin birleştiği noktaya homojen olarak karıştırılan hücre süspansiyonundan otomatik mikropipet yardımıyla 10 µl aktarıldı. İnvert mikroskopta canlı hücrelerin sayımı gerçekleştirildi.

Tripan mavisi boyası eklenmesiyle, canlı hücrelerde tripan mavisi boyası hücre zarından geçemediği için boyanmaz ve hücreler mikroskop altında parlak beyaz ve yuvarlak bir şekilde gözlenir. Cansız hücrelerde ise membran bütünlüğü bozulduğu için tripan mavisi boyası hücreleri boyayarak, hücrelerin mikroskop altında koyu lacivert görünmesini sağlar. Canlı hücre konsantrasyonunun belirlenmesinde bu prensipten faydalanılmıştır.

Mililitredeki canlı hücre konsantrasyonunun belirlenmesinde lam üzerindeki bölümlere ayrılmış olan 5 alandaki toplam canlı hücre sayısı sayılarak belirlenir ve ml'deki canlı hücre konsantrasyonu aşağıda verilen formül yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre/ ml} = \frac{\text{Canlı Hücre Sayısı} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times 10^4}{\text{Hücre Sayılan Kare Sayısı}}$$

3.2.1.5. Hücrelerin Stoklanması

100 mm'lik kültür kaplarında veya daha büyük kültür flasklarında konfluent olan LNCaP ve 22Rv1 hücreleri, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere dondurularak sıvı azot tankı içerisinde ve -80 °C dondurucuda stoklanmıştır. Daha önce belirtildiği gibi Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon işlemi gerçekleştirilen hücreler %10 DMSO içeren FBS ile hazırlanan dondurma ortamında süspanse edilmiş ve hemasitometre lamı yardımıyla mikroskop altında sayılmıştır. Hücre dondurma ortamının ml'sinde 2×10^6 hücre olacak şekilde hücre konsantrasyonu ayarlanmıştır.

Mililitredeki hücre konsantrasyonu ayarlanan hücreler kriyo tüplerin her birinde 1 ml olacak şekilde ayrılmış ve tüplerin üzerine hücre ismi, dondurulma

tarihi, pasaj numarası, kim tarafından dondurulduğu ve hücre konsantrasyonu gibi bilgiler yazılmıştır. Kriyo tüpler, izopropil alkol içeren dondurma kabı (Mr. Frosty, Nalgene) içerisinde -80 °C’de 1 gün boyunca depolanmıştır. Takiben ertesi gün -195 °C ‘deki sıvı azot tankının buhar fazında uzun süreli olarak depolanmak üzere kaldırılarak saklanmıştır.

3.2.2. Hücrelere Kimyasal Madde Uygulanması

3.2.2.1. Hücrelere 1,25(OH)₂ D₃ Uygulaması

Hücrelere sentetik kalsitriol uygulaması yapılarak hücresel yanıtların incelendiği çalışmalarda hücrelere hormondan yoksun bırakma (starvation) işlemi uygulanmıştır. Hormon indüksiyon tahlilleri için, hücreler %10 FBS içeren RPMI1640 ortamında çoğaltıldı ve hücrelerin kültür kaplarına ekiminden sonra 72 saat süre ile %2 ct-FBS içeren besi ortamı ile inkübe edildi. Takiben hücrelere belirlenen doz ve/veya sürelerde hormon uygulaması gerçekleştirildi.

3.2.2.2. Diğer Ajanların Uygulaması

1,25(OH)₂ D₃ uygulamasına bağlı olarak ile hedef genlerin protein ve mRNA düzeylerindeki değişimlerinin transkripsiyonel ve translasyonel seviyede incelenmesi amacıyla genel transkripsiyon inhibitörü aktinomisin D ve genel translasyon inhibitörü sikloheksamid ajanları kullanıldı. Bu amaçla hücrelere starvasyon protokolü uygulanarak 2 saatlik 1 µg/ml aktinomisin D veya 1 µg/ml sikloheksamid ön uygulaması ardından 1,25(OH)₂ D₃ uygulaması gerçekleştirildi.

3.2.3. İmmünoiblotlama (Western Blot)

Özgül proteinlerin tanımlanmasında ve düzeylerindeki değişimlerin incelenmesinde moleküler yaşam bilimleri alanında sıklıkla kullanılan analitik bir tekniktir. Temel olarak birbirini takip eden 11 basamakta gerçekleştirilmektedir.

1. Hücre veya dokulardan proteinlerin izole edilmesi
2. Kullanılacak örneklerin protein miktar tayini yapılması, protein konsantrasyonlarının belirlenmesi
3. İzole proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre SDS poliakrilamid jelde elektrik alan etkisiyle ayrıştırılması
4. SDS-PAGE jellerinde ayrıştırılan proteinlerin PVDF veya nitroselüloz membran üzerine transfer işlemi
5. Membran üzerindeki protein bağlanmayan bölümlerin maskelenmesi için gerçekleştirilen bloklama işlemi
6. Spesifik olmayan proteinlerin yıkama işlemleri ile uzaklaştırılması
7. Membran üzerinde immobilize edilen proteinlere özgü çalışılacak proteini özgül olarak tanıyan primer-antikor ile işaretleme
8. Spesifik olmayan proteinlerin yıkama işlemleri ile uzaklaştırılması
9. Hedef proteini işaretleyen primer antikor tanıyan enzim işaretli ikincil antikor ile işaretleme
10. Spesifik olmayan proteinlerin yıkama işlemleri ile uzaklaştırılması
11. Enzim bağlı antikorun substratıyla etkileşmesi ile kimyasal bir reaksiyon gerçekleşir. Yüksek hassasiyetli bir CCD kamera sistemini içeren görüntüleme sistemi hedef protein bantlarının görüntülenerek dökümante edilmesi.

3.2.3.1. Protein İzolasyonu

Kimyasal madde uygulamaları ve inkübasyon süreleri tamamlanmış olan hücrelerde protein izolasyonunun gerçekleştirilmesi işlemi için kültür kapları inkübatörden çıkarılarak buz üzerine alınmıştır. Kültür kaplarındaki tüm besi ortamı aspirasyon yolu ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücrelerin kolay bir şekilde

tutundukları yüzeyden ayrılabilmelerini sağlayan daha önce anlatıldığı gibi tripsinizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

+4 °C’de saklanan 1X PBS ile kültür kabı 2 kez yıkanarak hücreler süspanse hale getirilmiş ve ependorf tüplerine aktarılmıştır. Ependorflar +4°C’de 10,000 r.p.m’ de 1 dakika santrifüjlenir, hücrelerin pellet haline gelmesi sağlanmıştır. Süpernatant kısmı, önce aspirasyon ile daha sonrasında pipet aracılığı ile dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Bu santrifüjleme işlemi 2 kez daha tekrar edilmiştir.

Protein izolasyonunun hemen gerçekleştirileceği çalışmalarda ependorflar buz üzerinde bekletilebilir, fakat daha sonra gerçekleştirilecek bir çalışma için kullanılacaksa pelletlerin yer aldığı ependorflar -80 °C’de saklanmalıdır.

Lizatlama işlemlerinde 1X proteaz inhibitör kokteyli içeren 1X RIPA tamponu kullanılmıştır. Pelletlerin üzerine hazırlanan karışımdan ilave edilerek vorteks yardımıyla süspanse hale getirilmiştir. Süre sonunda ependorflar +4°C’de 14,000 r.p.m.’de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatantlar etiketlenen temiz ependorf tüplerine aktararak sonraki adımlarda kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır.

3.2.3.2. Protein Miktarının Belirlenmesi

Elde edilen lizatlarda bulunan protein miktarları bikinkoninik asit (BCA) protein miktarı ölçüm kiti (Thermo Scientific-Pierce) kullanılarak belirlenmiştir. BCA Protein miktar tayini testleri; alkali bir ortamda (aynı zamanda biüre reaksiyonu olarak da bilinir) protein tarafından Cu^{2+} ’nın Cu^{+1} ’e iyi bilinen indirgenmesini BCA ile bakır katyonunun (Cu^{+}) oldukça hassas ve seçici kolorimetrik tespiti ile birleştirir. Bu deneyde oluşan mor renkli reaksiyon ürünleri, bir bakır iyonu ile bikinkoninik asidin iki molekülünün şelasyonu aracılığıyla oluşmaktadır.

Protein konsantrasyonlarının belirlenmesinde aşağıdaki protokol takip edilmiştir.

1. 96 kuyucuklu mikrolaka kuyucuğunun her birine 8 µl distile su ilave edilmiştir.
2. Protein örneklerinden 2’şer µl kuyucuklara aktarılmıştır. Her bir örnek 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır.
3. BCA protein miktar ölçüm kitinde bulunan BCA Reagent A solüsyonundan; çalışılacak örnek sayısı x 196 µl, BCA Reagent B solüsyonundan ise; çalışılacak

örnek sayısı x 4 μ l olacak şekilde bir ependorf tüpünde karıştırılarak protein örneklerinin üzerine 200 μ l eklendi. Kör okuma için protein izolasyonunda kullanılan tampon çözeltisi kullanıldı.

4. 96 kuyucuklu plaka 20 dakika boyunca ışıkla temastan kaçınılacak şekilde 37°C’de inkübe edilmiştir.

5. 20 dakikanın sonunda 562 nm’de spektrofotometre mikropilaka cihazında okumalar gerçekleştirilmiştir.

6. Örneklerimizin absorbans değerlerinden kör okumanın absorbans okuması çıkarıldıktan sonra örneklerimizin absorbans değerlerinin ortalaması alınarak BSA ile hazırlanan standart çözelti ile çizilen doğru denkleminin eğitimi üzerinden örneklerimizin absorbans değerleri girilerek protein konsantrasyonları belirlendi.

3.2.3.3. Proteinlerin SDS-PAGE ile ayrılması

İlk olarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda jel dökme aparatları kurulmuştur. Kurulan cam kasetler arasına çalışmada kullanılması planlanan %’de hazırlanan ayırma jeli dökülerek üzeri polimerizasyon reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için izopropil alkol ile kaplanmıştır. Polimerizasyon işlemi gerçekleştikten sonra jelin üst bölümü dH₂O ile yıkanmıştır. Ayırma jelinin üzerine hazırlanan yığınlama jeli dökülmüş ve üzerine kuyucukların oluşumunu sağlayan tarak kapatılmıştır. Jel polimerleştikten sonra hazırlanan jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tank 1X yürütme tamponu ile doldurulmuştur. 4x yükleme tamponu ilave edilerek 95 °C’de 5 dakika kaynatılan protein örnekleri jele yüklenmiştir. Protein örnekleri 100V elektrik akımı uygulanarak yaklaşık 120 dakika boyunca elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi sonlandığında transfer protokolü uygulanmıştır.

Tablo 2. SDS-PAGE Ayırma ve Depolama Jelinin Hazırlanması

Ayırma Jeli			Depolama Jeli
Jel Yüzdesi	%12	%15	%3,5
Bir Jel İçin	10 ml		3 ml
%30'luk Akrilamit (29:1)	7 ml	5 ml	0,35 ml
4X Ayırma Tamponu/Depolama Tamponu	5 ml	5 ml	0,75 ml
Distile Su	8 ml	10 ml	1,9 ml
%10'luk AP	(Oda sıcaklığında her bir jel için 150 µl)		100 µl

3.2.3.4. PVDF Membrana Transfer

Western-blot sandviç aparatının içine süngerler, transfer pedleri, SDS-PAGE jeli ve PVDF membran yerleştirildi. PVDF membran öncelikli olarak metanolle aktifleştirilmiştir. Yürütme işlemi tamamlanan jel, ıslatılmış transfer pedleri ve PVDF membran sırasıyla yerleştirildikten sonra kalan hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için bir rulo yardımıyla hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Hazırlanan transfer sandviçi 1x transfer tamponu ile doldurulan transfer tankı ve aparatına yerleştirildi. Transfer işlemi oda sıcaklığında bir gece boyunca 20 mA'lık elektrik akımı uygulanarak gerçekleştirildi.

3.2.3.5. Bloklama ve Primer Antikor ile İşaretleme

İncelenen protein ile kullanılan antikorlar arasındaki özgül etkileşimler western blotlama yöntemindeki en önemli noktalardan biridir. Özgül olmayan bağlanmaların engellenmesi için protein bağlanmayan bölgelerin bloklaması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla membran 1X yıkama tamponu ile hazırlanan %5'lik süt çözeltisiyle oda sıcaklığında 20 dakika boyunca orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Bloklama işleminden sonra membran 1X yıkama tamponu ile 15 dakika boyunca yıkanarak gece boyu primer antikor ile inkübe edildi.

Çalışmalarda kullanılan primer antikorlar; pH'sı 7.4 olan %5'lik yağsız süt tozu içeren 1X yıkama tamponunda hazırlanmış ve koruyucu olarak 1:1000 oranında sodyum azit çözeltisi eklenerek +4°C'de saklanmıştır.

3.2.3.6. Sekonder Antikor ile İşaretleme

Primer antikor muamelesinden sonra membran 1X yıkama tamponu ile oda sıcaklığında 15 dakika boyunca yıkandı. Sekonder antikor solüsyonu olarak %5'lik yağsız süt tozu içeren 1X yıkama tamponuna kullanılan primer antikorun orijinine bağlı olarak tavşan (rabbit) veya fare (mouse) sekonder antikorları 1:3000 konsantrasyonunda eklenerek oda sıcaklığında 90 dakika boyunca orbital çalkalayıcıda inkübe edildi. Takiben membran 1X yıkama tamponu ile 15 dakika boyunca yıkanarak görüntüleme aşamasına geçildi.

3.2.3.7. Kemiluminesans Görüntüleme

Sekonder antikor uygulanan membranların kemiluminesans görüntülemesi için Clarity Western ECL Substrat kiti (Bio-Rad) kullanılmıştır. Clarity Western ECL Substrat A ve B solüsyonları 1:1 oranında, membran başına 1700 µl olacak şekilde görüntülemeden hemen önce hazırlanarak karıştırıldı. Görüntüleme için, membran iBright CL1000 (Thermo Fisher Scientific) görüntüleme cihazı tablasına yerleştirilerek membranın üzeri hazırlanan ECL substrat aktarıldı. İki dakika inkübe edildikten sonra görüntüleme süreleri saniye ve dakika cinsinden belirlenerek görüntüleme işlemi gerçekleştirildi. Görüntüler cihazda yer alan bütünleşik kamera yardımıyla fotoğraflanarak saklandı.

3.2.4. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve qRT-PCR Çalışmaları

3.2.4.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonunda işleminde MonarchTM total RNA izolasyon kiti kullanılmıştır ve izolasyon işlemlerinde üretici firmanın talimatları takip edilmiştir. Deney sonlandığında hücreler nükleaz ve proteaz içermeyen ependorf tüplerinde

pellet haline getirildi. İlk olarak örneklerin üzerine 300 µl Liziz tamponu ilave edilerek nazıkçe pipetaj yapılmış ve hücrelerin lize edilmesi sağlanmıştır. Kit içerisinde bulunan Monarch collection tube II'nin üzerine silika temelli genomik DNA'yı yakalayan kolon takıldı ve hazırlanan lizatın tamamı kolona aktarılarak oda sıcaklığında 16.000 x g'de 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası RNA kullanılan kolonun altındaki toplamında alanında kaldı. Sıvı fazın üzerine 300 µl yüksek saflıktaki %98 absolü etil alkol eklenerek homojen hale getirildi. Hazırlanan yeni örnek toplama tüplerine RNA'yı yakalayan silika temelli kolon takıldı ve elde edilen RNA-etil alkol karışımı aktarıldı. Oda sıcaklığında 16.000 x g'de 30 saniye santrifüj edildi. Kolondaki protein, lipit ve benzeri çeşitli biyomolekülleri uzaklaştırmak amacıyla kolon üzerine 500 µl yıkama tamponu eklenerek oda sıcaklığında 16.000 x g'de 30 saniye santrifüj edildi.

Santrifüj sonunda sıvı faz uzaklaştırıldı. Kolona 75 µl Monarch DNase I Reaksiyon Tamponu ve 5 µl Monarch DNaz I solüsyonu ilave edilerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Bu yol ile kolonda kalan olası genomik DNA kalıntıları uzaklaştırıldı. Süre sonunda tuz kalıntılarını gidermek için kolon üzerine 500 µl Prime tamponu eklenerek oda sıcaklığında 16.000 x g'de 30 saniye santrifüj edildi. Kolonun altında kalan sıvı faz uzaklaştırıldı ve kolona 500 µl RNA yıkama tamponu eklenerek oda sıcaklığında 16.000 x g'de 30 saniye santrifüj edildi. Bu işlem iki kez daha tekrar edildi. 16.000 x g'de 2 dakika süre ile ilave bir santrifüjleme işlemi daha gerçekleştirildi. Yeni ependorf tüplerin üzerine kullanılan kolon takılarak üzerine 50 µl RNaz içermeyen H₂O ilave edildi ve oda sıcaklığında 16.000 x g'de 5 dakika santrifüj edilerek saf RNA elüe edildi. İzole edilen RNA'ların kalitesinin ve miktarının belirlenmesi amacıyla mikrospektrofotometre ile ölçümler alındı.

3.2.4.2. RNA Kalite Kontrolü, Konsantrasyon ölçümü

Hücrelerden izole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve kalitesinin belirlenebilmesi amacıyla mikrospektrofotometre yardımıyla ölçümleri yapılmıştır. Bu amaçla RNA örneklerinden 1 µl alınarak köre karşı A260/A280 nm dalga boyunca ölçümler alındı. İdeal olarak 1,8-2,1 arasında olması gereken A260/A280

oranı izole edilen RNA'ların saflık derecelerinin uygun olduğunu göstermektedir. İzole edilen tüm RNA örneklerinin ölçüm sonuçlarının hepsinin bu aralıkta olduğu belirlendi. Her bir örnekten yaklaşık olarak 10 µg saf RNA izole edildi. RNA örneklerinin final konsantrasyonları 1µg/µl olacak şekilde seyreltilerek -80 °C'de saklandı.

3.2.4.3. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA örneklerinden gen ifadesi analizleri gerçekleştirilecek gerçek zamanlı PCR işlemlerinde kullanılmak üzere cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bu işlem sırasında cDNA sentez kitinin kullanım kılavuzundaki yönlendirmeler takip edildi. Her bir reaksiyon için mikrospektrofotometrede daha önce ölçümlenen RNA konsantrasyonları kullanıldı.

Reaksiyon karışımları buz üzerinde çalışılarak tablo 3'te belirtildiği gibi 0.1ml'lik nükleaz içermeyen PCR tüpü içerisinde hazırlandı. Hazırlanan karışımı içeren PCR tüpleri sırasıyla vortex ve spin yapılarak, PCR cihazına yerleştirildi. Takiben Tablo 4'te belirtilen PCR adımları gerçekleştirildi. Sıcaklık geçişlerinin hızlı ve kesintisiz olarak sürdürülebilmesi için standart PCR cihazından faydalandı. Sentez sonrası cDNA örnekleri 1:2 oranında nükleaz içermeyen dH₂O ile sulandırılarak -20°C'de saklandı.

Tablo 3. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim
iScript Ters Transkriptaz Enzimi	1 µl
iScript Reaksiyon Tamponu (5x)	4 µl
RNA	1 µl
Nükleaz free su	14 µl

Tablo 4. cDNA sentezinde kullanılan PCR programı

Adımlar	Sıcaklık	Süre
1. Basamak	25 °C	5 dakika
2. Basamak	46 °C	20 dakika
3. Basamak	95 °C	1 dakika
4. Basamak	4°C	∞

3.2.4.4. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR

Tez çalışmasında yer alan hedef genlerin mRNA ifadesi düzeylerinde değişimler çift iplikli nükleik asitlere bağlandığında floresan özellik gösteren SYBR Green I kullanımı ile gerçek zamanlı kantitatif PCR işlemi incelendi. PCR çalışmalarında her örnek 3 teknik ve biyolojik tekrar şeklinde çalışıldı.

Reaksiyon karışımları Tablo 5’de belirtildiği gibi hazırlandı. Hazırlanan karışım 96 kuyucuklu PCR mikropalakasına pipetlendi ve üzeri kapatıcı optik film ile kapatıldı.

Örnekleri aynı noktada toplanması ve hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için mikropalaka 2500 r.p.m’de 2 dakika santrifüj edildi ve gerçek zamanlı kantitatif PCR cihazına yerleştirildi. Çalışmalar kapsamında Tablo 6’da sunulan reaksiyon koşulları kullanıldı. PCR işlemi sonlandığında oluşan PCR ürünlerinin özgülüğünü test etmek için erime eğrisi analizi Tablo 7’de belirtilen reaksiyon koşulları uygulanarak analiz edildi.

Tablo 5. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Reaksiyon Karışım Miktarları

Malzemeler	Konsantrasyon
SYBR Green I Master Mix	5 µl
İleri Primer (F)	0,5 µM Final Konsantrasyon
Geri Primer (R)	0,5 µM Final konsantrasyon
cDNA	2 µl
Nükleaz free H ₂ O	Son hacim 10 µl’ye tamamlandı

Tablo 6. Gerçek zamanlı PCR programı

Adımlar	Sıcaklık	Süre	40 Döngü
Ön denetürasyon	95 °C	5 dakika	
Denatürasyon	95 °C	15 saniye	
Annealing/Extension	95 °C	15 saniye	

Tablo 7. Erime eğrisi analizi programı

	Sıcaklık aralığı	Sıcaklık artışı-Süre
Erime eğrisi	65-95 °C	0.5 °C, 2 saniye

3.2.4.4.1. qRT-PCR sonuçlarının analiz edilmesi

Örneklerimizdeki hedef genlere ilişkin mRNA ifadelerindeki değişimlerin analiz edilmesi amacıyla karşılaştırmalı $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanıldı. Normalizasyon işlemleri bir housekeeping gen olan RPLP0 ifadelerine göre gerçekleştirildi. Sonuçlar kontrol grubuna kıyasla göre kat değişimi olarak standart sapmalar ile grafikte sunuldu.

Tüm qRT-PCR çalışmaların MIQE kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirilmiştir (166).

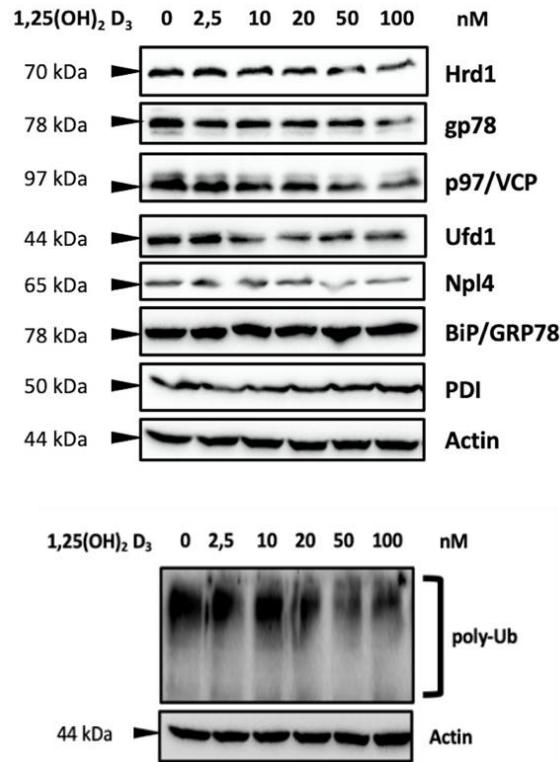
3.2.4.5. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunuldu. Gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel önemi, GraphPad Prism 7 yazılımı kullanılarak en az %95 güven aralığına sahip iki kuyruklu eşit varyanslı student t-testi ile belirlendi. $P < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Farklı dozlarda uygulanan 1,25(OH)₂ D₃'ün LNCaP hücreleri üzerinde ERAD mekanizması ile ilişkili protein ifadelerine olan etkilerinin incelenmesi

1,25(OH)₂ D₃'ün prostat kanseri hücrelerinde ERAD ve ER stresi ile ilişkili protein düzeylerine doza bağımlı etkisini test etmek üzere 2,5 10, 20, 50 ve 100 nM konsantrasyonda 24 saat süre ile 1,25(OH)₂ D₃ uygulaması gerçekleştirildi. Takiben Hrd1, gp78, p97/VCP, Ufd1, Npl4, BiP/GRP78, PDI ve poliubikitin proteinlerinin düzeylerindeki değişimler immünoblotlama çalışmaları ile incelendi. Kontrol uygulaması olarak hücelere eş hacimde çözücü uygulandı. Elde edilen bulgular Şekil 8'de sunulmuştur.



Şekil 8. Farklı dozlarda uygulanan 1,25(OH)₂ D₃, prostat kanseri hücrelerinde ERAD bileşenleri üzerine olan etkilerinin immünoblotlama ile incelenmesi. Hormondan yoksun bırakılmış LNCaP hücreleri, 2,5, 10, 20, 50 ve 100nM

1,25(OH)₂ D₃ ile 24 saat süre ile muamele edildi. Hrd1, gp78, p97/VCP, Ufd1, Npl4, BiP/GRP78, PDI ve poliubikitin proteinlerinin düzeyleri özgül primer antikorlar kullanılarak immünoablottama ile incelendi. Beta-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

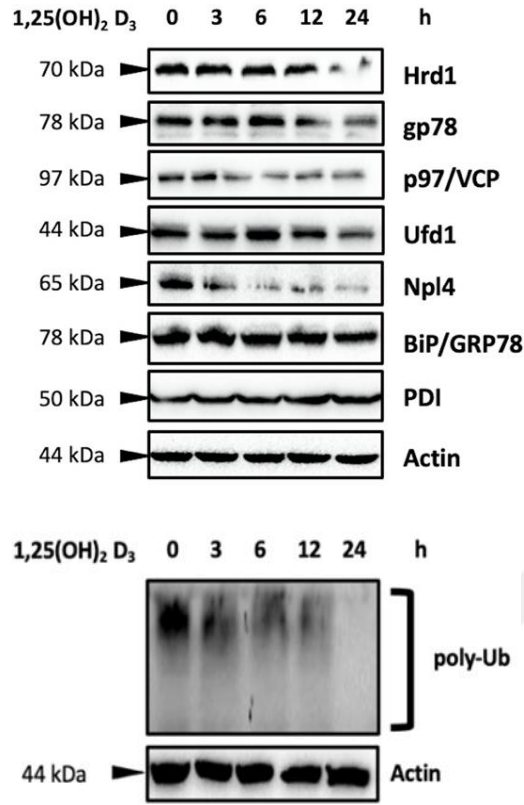
Sonuçlarımız ERAD'ın üyeleri olan Hrd1, gp78, p97/VCP, Ufd1 ve Npl4'ün protein ifadelerinin 1,25(OH)₂ D₃ uygulamasına bağlı olarak kontrol grubu ile kıyaslandığında doz bağımlı bir azalış sergilediğini gösterdi. ER stresi ve protein katlanması ile ilişkili olan BiP/GRP78 ve PDI protein düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla belirgin bir değişim olmadığı gözlemlendi.

Proteinlerin proteozomal degradasyona yönlendirilmesi için önemli bir post-translasyonel modifikasyon olan poliubikitinasyon düzeylerinin 1,25(OH)₂ D₃ uygulamasına bağlı olarak doz bağımlı olarak kontrol grubuna kıyasla azaldığı belirlendi.

Test edilen tüm ERAD üyelerinin ve poliubikitinasyon protein düzeylerinin 1,25(OH)₂ D₃ 'nin uygulama dozuna bağımlı olarak baskılandığını göstermektedir. Bununla birlikte ER stresi ile ilişkili protein düzeylerinde dikkat çekici bir değişim olmadığı belirlenmiştir.

4.2. Farklı zaman aralıklarında 1,25(OH)₂D₃ uygulanan LNCaP hücrelerinde ERAD mekanizması ile ilişkili protein düzeylerinin incelenmesi

1,25(OH)₂ D₃'ün prostat kanseri hücrelerinde ERAD ve ER stresi ile ilişkili protein düzeylerine olan zamana bağlı etkisini test etmek üzere 100nM konsantrasyonda ve 3, 6, 12 ve 24 saat süre ile 1,25(OH)₂ D₃ uygulaması gerçekleştirildi. Takiben Hrd1, gp78, p97/VCP, Ufd1, Npl4, BiP/GRP78, PDI ve poliubikitin proteinlerinin düzeylerindeki değişimler immünoablottama çalışmaları ile incelendi. Kontrol uygulaması olarak hücrelere eş hacimde çözücü uygulandı. Elde edilen bulgular Şekil 9'da sunulmuştur.

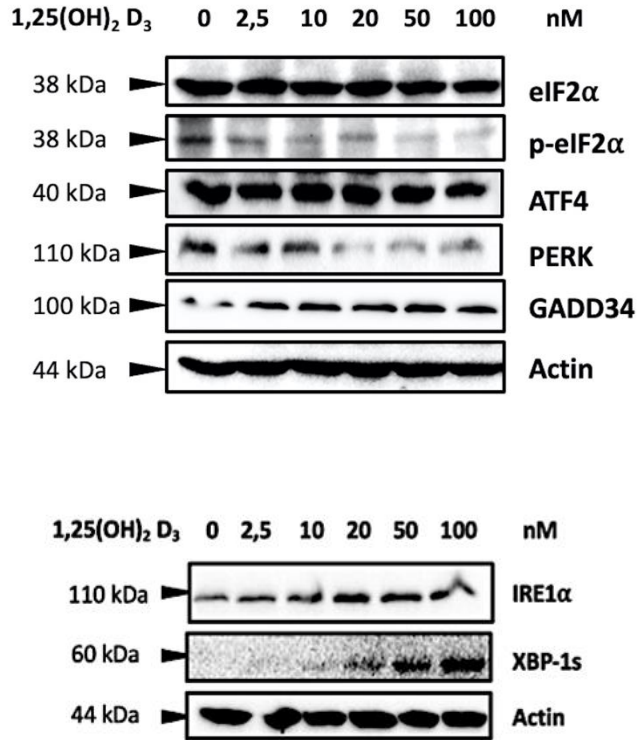


Şekil 9. Farklı sürelerde uygulanan 1,25(OH)₂D₃'ün prostat kanseri hücrelerinde ERAD bileşenleri üzerine olan etkilerinin incelenmesi. Hormondan yoksun bırakılmış LNCaP hücreleri 3, 6, 12 ve 24 saat süre ile 100nM 1,25(OH)₂ D₃ ile muamele edildi. IRE1α, XBP-1s, total-eIF2α, p(Ser51)-eIF2α, PERK, ATF4 ve GADD34 proteinlerinin düzeyleri özgül primer antikorlar kullanılarak immünoablottlama ile incelendi. Beta-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

Elde edilen bulgular 100nM 1,25(OH)₂ D₃ uygulamasının zamana bağlı olarak ERAD ile ilişkili Hrd1, gp78, p97/VCP, Ufd1 ve Npl4'ün protein düzeylerini doz bağımlı yanıtlara benzer şekilde baskıladığını göstermektedir. ER stresi ile ilişkili BiP/GRP78 ve PDI protein düzeylerinde belirgin bir değişim olmadığı belirlendi. Poliubikitinasyon protein düzeyleri incelendiğinde doz bağımlı sonuçlara benzer şekilde 100nM 1,25(OH)₂ D₃ 'ün zamana bağımlı olarak uygulaması LNCaP hücrelerinde poliubikitinasyon protein düzeylerini azalttığı belirlendi.

4.3. Farklı dozlardaki 1,25(OH)₂D₃ uygulamasının UPR'nin IRE1α ve PERK kolu proteinleri üzerine olan etkilerinin LNCaP hücrelerinde incelenmesi

1,25(OH)₂ D₃'ün UPR mekanizması üzerindeki doz bağımlı etkisini test etmek için, hormondan yoksun bırakılmış LNCaP hücreleri 24 saat boyunca 2,5, 10, 20, 50 ve 100nM konsantrasyonunda 1,25(OH)₂ D₃ ile muamele edildi. Kontrol uygulaması olarak çözücü kullanıldı. Takiben UPR'nin IRE1α kolu ile ilişkili IRE1α ve XBP-1s proteinleri ve UPR'nin PERK kolu ile ilişkili total-eIF2α, p(Ser51)-eIF2α, PERK, ATF4 ve GADD34 protein düzeylerindeki değişimler immünoiblottama yöntemi ile incelendi. Elde edilen bulgular Şekil 10'da sunulmuştur.



Şekil 10. Farklı dozlarda uygulanan 1,25(OH)₂ D₃, prostat kanseri hücrelerinde UPR bileşenleri üzerine olan etkilerinin immünoiblottama ile incelenmesi. Hormondan yoksun bırakılmış LNCaP hücreleri, 2,5, 10, 20, 50 ve 100nM

1,25(OH)₂ D₃ ile 24 saat süre ile muamele edildi. IRE1α, XBP-1s, total-eIF2α, p(Ser51)-eIF2α, PERK, ATF4 ve GADD34 proteinlerinin düzeyleri özgül primer antikorlar kullanılarak immünoiblotlama ile incelendi. Beta-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

UPR'nin PERK kolu ile ilişkili protein ifadelerindeki değişimleri incelediğimiz immünoiblotlama sonuçlarımız 1,25(OH)₂ D₃ 'ün total-eIF2α protein düzeylerinde değişime yol açmadığını gösterdi. Bununla birlikte eIF2α'nın serin 51 pozisyonunda fosforilasyona uğramış protein düzeylerinin ise 1,25(OH)₂ D₃ 'ün uygulama dozuna bağlı olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Ser 51 fosforilasyon düzeyinde azalış gözlemlendi. Benzer şekilde kontrol grubuna kıyasla 1,25(OH)₂ D₃ 'ün uygulama dozuna bağlı olarak ATF4 ve PERK protein düzeylerinde azalma gözlenirken GADD34 protein düzeylerinin 1,25(OH)₂ D₃ dozuna bağımlı olarak arttığı belirlendi.

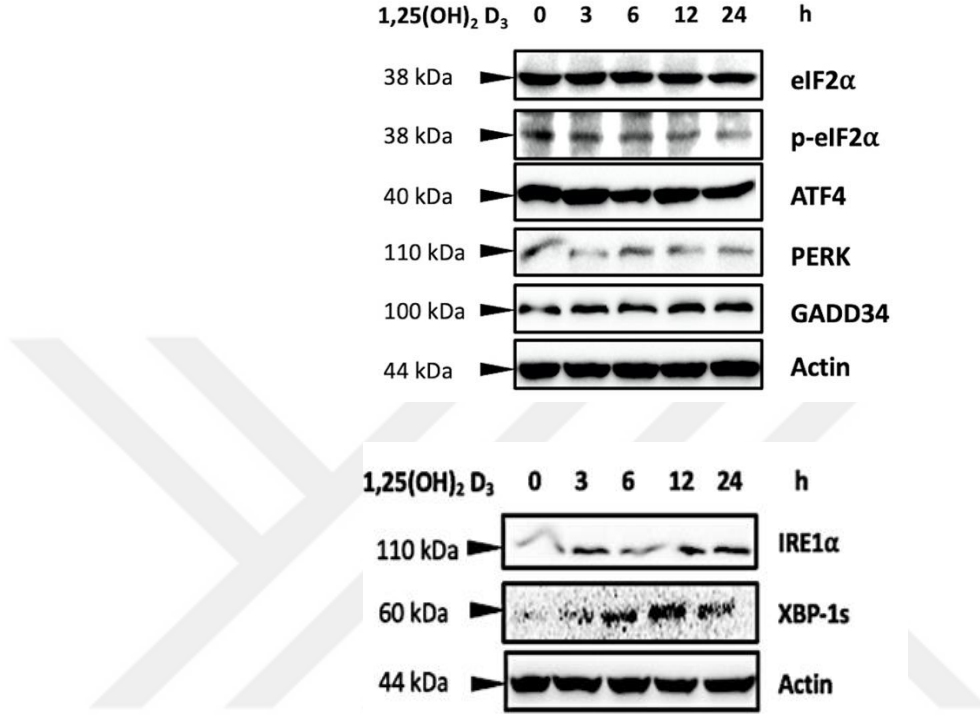
UPR'nin IRE1α kolu ile ilişkili proteinleri incelediğimiz sonuçlarda 1,25(OH)₂ D₃ 'ün uygulama dozuna bağlı olarak IRE1α ve XBP-1s protein düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla arttırdığı belirlendi.

Bu sonuçlar UPR'nin IRE1α koluna ilişkin protein düzeylerinin 1,25(OH)₂ D₃ uygulaması ile pozitif düzenlendiğini PERK kolu ile ilişkili protein düzeylerinden PERK, fosforile eIF2α ve ATF4 protein düzeylerinin negatif düzenlendiğini GADD34 proteininin ise pozitif düzenlendiğini göstermiştir.

4.4. Farklı zaman aralıklarında uygulanan 1,25(OH)₂D₃'ün UPR'nin IRE1α ve PERK kolu proteinleri üzerine olan etkilerinin LNCaP hücrelerinde incelenmesi

1,25(OH)₂ D₃'ün UPR mekanizması üzerindeki zamana bağlı etkisini anlamak için, hormondan yoksun bırakılmış LNCaP hücreleri, 24 saat boyunca 3, 6, 12 ve 24 saat süre ile 100nM konsantrasyonunda 1,25(OH)₂ D₃ ile muamele edildi. Kontrol uygulaması olarak çözücü kullanıldı. Takiben UPR'nin IRE1α kolu ile ilişkili IRE1α ve XBP-1s proteinleri ve UPR'nin PERK kolu ile ilişkili total-eIF2α, p(Ser51)-eIF2α, PERK, ATF4 ve GADD34 protein düzeylerindeki değişimler

immünoiblotlama yöntemi ile incelendi. Elde edilen bulgularımız, Şekil 11’de sunulmuştur.



Şekil 11. Farklı sürelerde uygulanan 1,25(OH)₂ D₃’ün prostat kanseri hücrelerinde UPR bileşenleri üzerine olan etkilerinin immünoiblotlama ile incelenmesi. Hormondan yoksun bırakılmış LNCaP hücreleri, 3, 6, 12 ve 24 saat süre ile 100nM 1,25(OH)₂ D₃ ile muamele edildi. IRE1α, XBP-1s, total-eIF2α, p(Ser51)-eIF2α, PERK, ATF4 ve GADD34 proteinlerinin düzeyleri özgül primer antikorlar kullanılarak immünoiblotlama ile incelendi. Beta-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

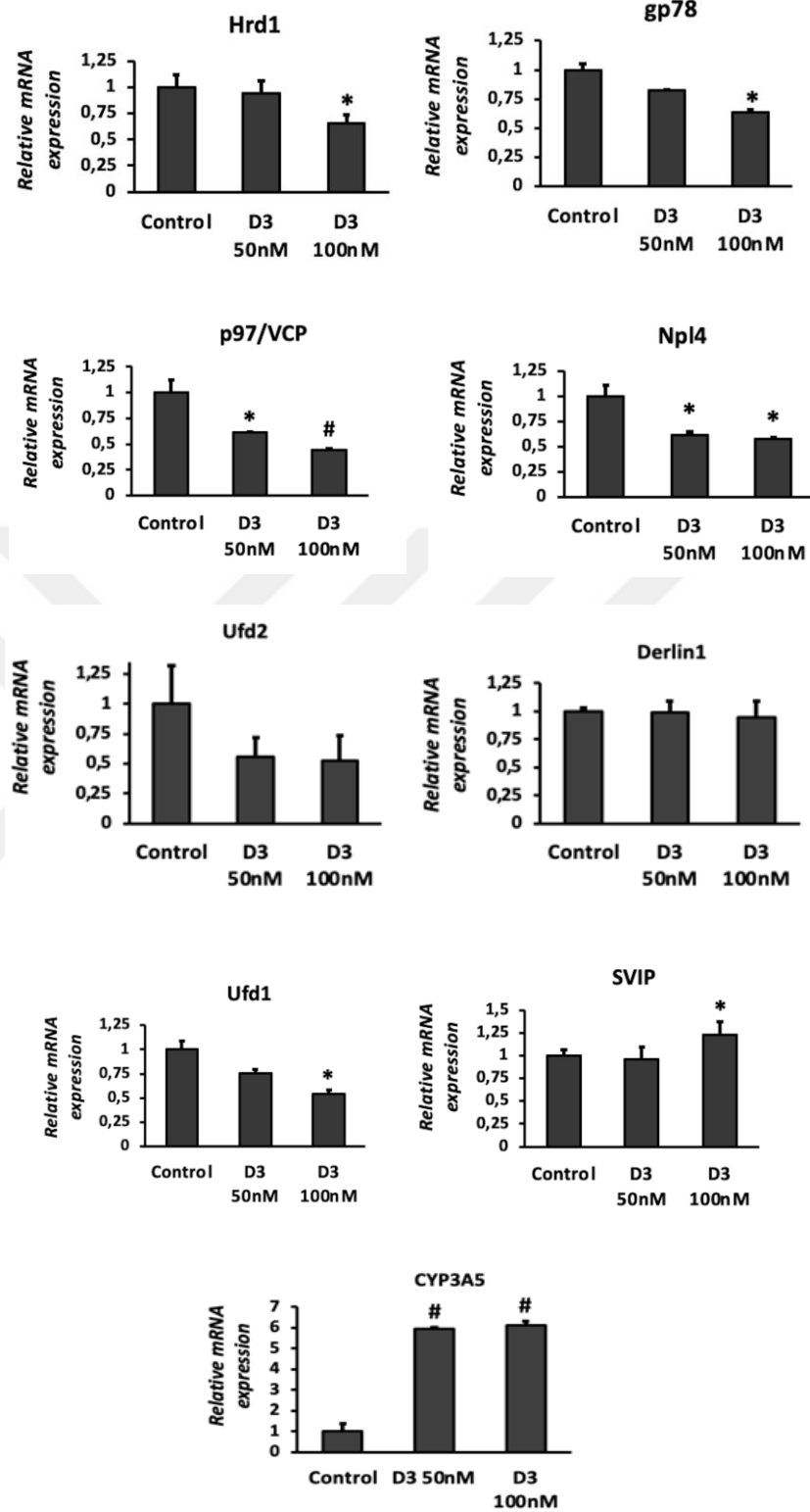
Sonuçlarımız UPR’nin PERK kolu ile ilişkili ATF4, PERK, serin 51 pozisyonundan fosforilasyona uğramış eIF2α protein ifadelerinin 1,25(OH)₂ D₃’in uygulama zamanına bağlı olarak negatif düzenlendiğini buna karşın GADD34 protein düzeylerinin pozitif düzenlendiğini göstermiştir. 1,25(OH)₂ D₃’ün dozuna

bağlı UPR proteinleri üzerindeki etkilerini incelediğimiz çalışmalarda olduğu gibi eIF2 α 'nın total düzeylerinde bir değişim olmadığı belirlendi.

IRE1 α sinyali ile ilişkili protein düzeylerinin 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 'ün uygulama süresine bağlı olarak doz bağımlı yanıtları incelediğimiz sonuçlara benzer şekilde IRE1 α ve XBP-1s protein düzeylerini pozitif düzenlediğini göstermiştir.

4.5. 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 'ün ERAD üyelerini kodlayan genlerin mRNA ifade düzeyleri üzerine olan etkisinin incelenmesi

1,25(OH) $_2$ D $_3$ 'ün ERAD üyelerinin mRNA düzeyleri üzerine olan etkilerini araştırmak için LNCaP hücreleri hormondan yoksun bırakıldıktan sonra 50 ve 100nM konsantrasyonunda 24 saat boyunca 1,25(OH) $_2$ D $_3$ ile muamele edildi. Kontrol uygulaması olarak eş hacimde çözücü kullanıldı. Süre sonunda örneklerden total RNA izolasyonu gerçekleştirilerek cDNA sentezlendi. mRNA düzeylerindeki değişimleri kantite edebilmek için gerçek zamanlı PCR çalışmaları gerçekleştirildi. Normalizasyon işlemleri RPLP0 housekeeping gen ifadesindeki değişimlere göre gerçekleştirildi. Göreceli mRNA ifade düzeyleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Bu kapsamda Hrd1, gp78, p97/VCP, Ufd1, Npl4, SVIP ve CYP3A5 mRNA ifadesindeki değişimler incelendi. Elde edilen bulgularımız, Şekil 12'de sunulmuştur.



Şekil 12. 50 ve 100nM 1,25(OH)₂ D₃ uygulanan LNCaP hücrelerinde ERAD ile ilişkili üyeler ve CYP3A5 mRNA ifadesi değişimlerinin qRT-PCR ile

incelenmesi. Hormondan yoksun bırakılmış LNCaP hücreleri, 24 saat süre ile 50 ve 100nM 1,25(OH)₂ D₃ ile muamele edildi. Takiben qRT-PCR çalışmaları gerçekleştirildi. Hrd1, gp78, p97/VCP, Ufd1, Npl4, SVIP ve CYP3A5 hedef genlerin mRNA ifade düzeyleri incelendi. Göreceli gen ifadesi değişimleri RPLP0 gen ifadesine göre normalize edildi. Deneyler 3 teknik ve 3 biyolojik tekrar olarak gerçekleştirildi. Sonuçlar grafikte kat artışı cinsinden standart sapmaları ile sunuldu. İstatistiksel olarak anlamlılık p<0.05 kabul edildi (*p<0.05, #p<0.001).

Sonuçlarımız ERAD ile ilişkili Hrd1, p97/VCP ve Npl4 üyelerinin mRNA ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalış olduğunu gösterdi. gp78, Ufd1 ve Ufd2 mRNA düzeylerinde ortalamalara bakılarak artış olduğu belirlenirken kontrol grubuna kıyasla bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Derlin1 mRNA ifade düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla bir değişim olmadığı belirlendi. Buna karşın ERAD'ın tanımlanan ilk endojen inhibitör proteini olan SVIP mRNA ifadesinin 100nM 1,25(OH)₂ D₃ uygulamasında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış sergilediği belirlendi.

1,25(OH)₂ D₃ uygulamasına bağlı olarak VDR aracılı gen ifadesi pozitif regüle olduğu bilinen CYP3A5 mRNA ifadesinin beklendiği gibi 1,25(OH)₂ D₃ uygulama dozuna bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla mRNA ifade düzeylerinde artış olduğu doğrulandı. Bu sonuç 1,25(OH)₂ D₃'ün başarılı şekilde VDR'yi uyararak bu yol ile kontrol edilen transkripsiyonel programın uyarıldığını doğrulamıştır.

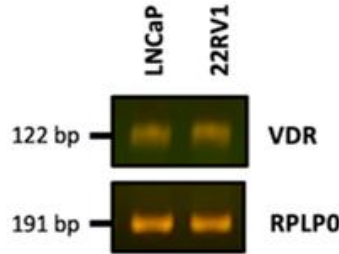
4.6. 1,25(OH)₂ D₃ uygulamasının ERAD ve UPR ile ilişkili proteinler üzerine olan etkilerinin LNCaP prostat kanseri hücreleri dışında 22Rv1 prostat kanseri hücrelerinde incelenmesi

ERAD ve UPR bileşenlerinin 1,25(OH)₂ D₃ aracılı düzenlemesinin LNCaP hücreleriyle sınırlı olup olmadığını test etmek amacıyla *in vitro* da prostat kanserini iyi mimik eden bir başka hücre hattı olan insan epitelyal prostat kanseri hücreleri olan 22Rv1 ile denemeler gerçekleştirildi. Bu amaçla LNCaP ve 22Rv1 hücrelerinde

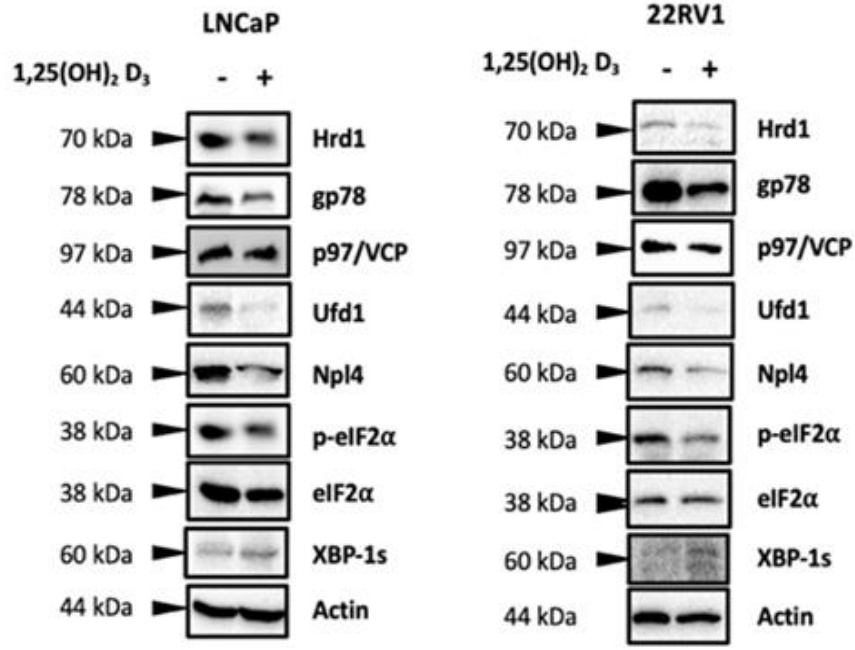
eş zamanlı olarak bazı ERAD ve UPR üyelerinin protein ifadelerindeki değişimleri immünoiblotlama ile incelendi.

Öncelikli olarak her iki hücre hattında vitamin D reseptörünü ifade edip etmediğini test etmek için yöntem bölümünde ifade edildiği gibi hücrelerden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi ve cDNA sentezlendi. Daha sonra hedef mRNA'lar konvansiyonel PCR ile özgül primerler kullanılarak çoğaltıldı. Elde edilen PCR amplikonların %2'lik agaroz jelde elektroforetik olarak ayrıştırıldı ve UV-transillüminatör ile görselleştirilerek fotoğraflandı. Bu çalışmalarda RPLP0 bir housekeeping gen olarak kullanıldı.

Daha sonra, 22Rv1 hücre hattının 1,25(OH)₂ D₃ yanıtlarını LNCaP hücreleri ile karşılaştırmalı olarak test edilmesi amacıyla hormondan yoksun bırakılmış LNCaP ve 22Rv1 hücreleri 24 saat süre ile 100nM 1,25(OH)₂ D₃ ile muamele edildi. ERAD ve UPR ile ilişkili olan proteinlerin seviyeleri immünoiblotlama tahlili ile analiz edildi. Elde edilen bulgularımız, Şekil 14'te sunulmuştur.



Şekil 13. LNCaP ve 22Rv1 hücrelerinde VDR gen ifadesi düzeylerinin değerlendirilmesi. RPLP0 bir housekeeping gen olarak kullanıldı.



Şekil 14. 1,25(OH)₂ D₃'ün ERAD ve UPR proteinleri üzerine olan etkisinin LNCaP ve 22Rv1 hücrelerinde immünoblotlama ile incelenmesi. Hormondan yoksun bırakılmış LNCaP ve 22Rv1 hücreleri 100nM 1,25(OH)₂ D₃ ile muamele edildi. Takiben total protein izolasyonu gerçekleştirilerek immünoblotlama çalışmaları ile ERAD ile ilişkili Hrd1, gp78, p97/VCP, Ufd1, Npl4 ve UPR ile ilişkili total-eIF2α, p(Ser51)-eIF2α ve XBP-1s düzeylerindeki değişimler incelendi. Beta-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

VDR mRNA ifade düzeylerini incelediğimiz sonuçlarda LNCaP ve 22Rv1 prostat kanseri hücrelerinin VDR transkriptlerini ifade ettiği belirlendi.

1,25(OH)₂ D₃ 'ün LNCaP hücrelerinde ERAD ve UPR ile ilişkili protein ifadeleri üzerine olan etkilerinin 22Rv1 hücrelerine 1,25(OH)₂ D₃ uygulaması ile karşılaştırmalı analiz ettiğimiz immünoblotlama sonuçlarımızda önceki verilerimizle tutarlı bir şekilde LNCaP hücrelerinde 100nM 1,25(OH)₂ D₃ uygulaması ile ERAD üyeleri Hrd1, gp78, p97/VCP, Ufd1 ve Npl4 protein düzeylerinin negatif düzenlendiği bir kez daha doğrulandı. Benzer şekilde UPR ile ilişkili serin 51 pozisyonundan fosforilasyona uğramış eIF2α 100nM 1,25(OH)₂ D₃ uygulaması ile

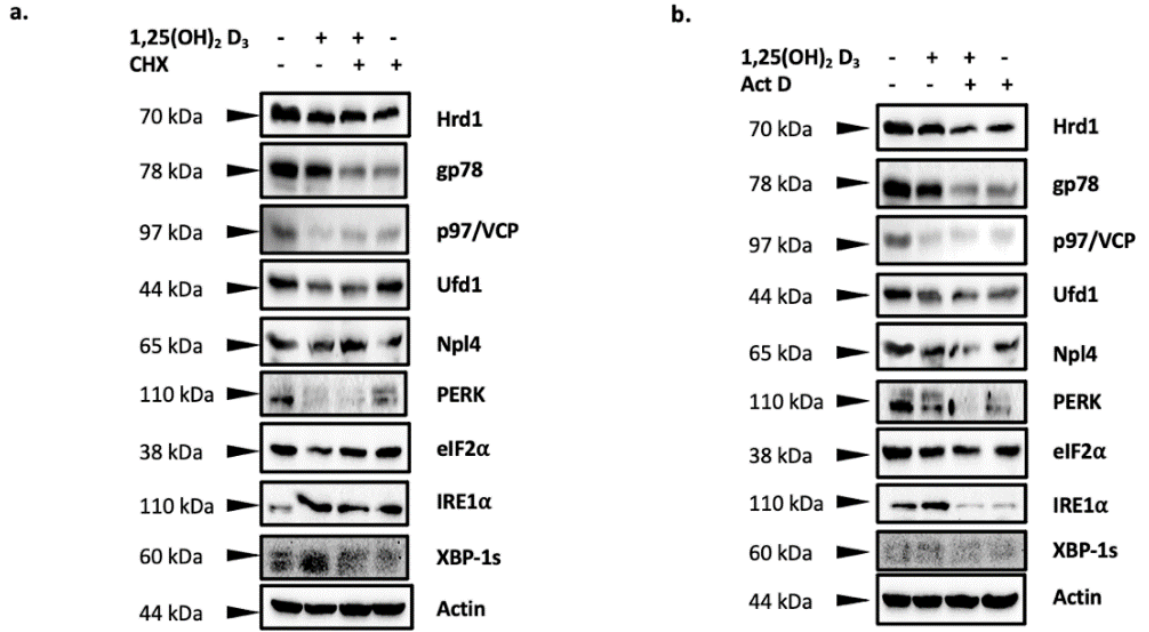
negatif düzenlendiği belirlendi. UPR'nin IRE1 α sinyali ile ilişkili XBP-1s protein düzeylerinin 100nM 1,25(OH) $_2$ D $_3$ uygulaması ile kontrol grubuna göre arttığı gözlemlendi.

22Rv1 ile sürdürdüğümüz çalışmalara ilişkin bulgularımız 100nM 1,25(OH) $_2$ D $_3$ uygulamasının LNCaP hücrelerinde ERAD ve UPR ile ilişkili protein düzeyleri üzerindeki etkilere benzer yanıtlar elde edildi. Sonuçlarımız Hrd1, gp78, p97/VCP, Ufd1 ve Npl4 protein düzeylerinin 100nM 1,25(OH) $_2$ D $_3$ uygulaması ile kontrol grubuna göre azaldığını gösterdi. PERK sinyali ile ilişkili serin 51 pozisyonundan fosforilasyona uğramış eIF2 α düzeylerinde 100nM 1,25(OH) $_2$ D $_3$ uygulaması ile azaldığı buna karşın IRE α sinyali ile ilişkili XBP-1s'nin protein düzeylerinde artış olduğu saptandı.

Toplu olarak sonuçlarımız 1,25(OH) $_2$ D $_3$ uygulamasına bağlı olarak ERAD ve UPR ile ilişkili protein üyelerinin ifade düzeylerindeki değişimlerin LNCaP hücreleri ile sınırlı olmadığını 22Rv1 hücrelerinin de benzer yanıtları sergilediğini göstermiştir.

4.7. ERAD bileşenlerinin 1,25(OH) $_2$ D $_3$ aracılı regülasyonunun transkripsiyonel ya da translasyonel düzeyde olup olmadığının incelenmesi

1,25(OH) $_2$ D $_3$ uygulamasına bağlı olarak ERAD ve UPR proteinlerinin ifade düzeylerindeki değişimlerin transkripsiyonel düzeyde ya da translasyonel olarak kontrol edilip edilmediğini anlayabilmek için iyi bilinen bir transkripsiyon inhibitörü ajanı olan aktinomisin D (ActD) ve genel translasyon inhibitörü olan sikloheksimid (CHX) ile denemeler gerçekleştirdik. Bu amaçla hormondan yoksun bırakılan LNCaP hücreleri 1 μ g/ml ActD veya 1 μ g/ml CHX ile 2 saat ön muamele edildi. Ardından hücrelere 24 saat süre ile 100nM 1,25(OH) $_2$ D $_3$ uygulaması gerçekleştirildi. Süre sonunda hücrelerden total protein izolasyonu gerçekleştirilerek yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi immünoablottama çalışmaları ile hedef proteinlerin düzeylerindeki değişimler incelendi. Elde edilen bulgular Şekil 15'de sunulmuştur.



Şekil 15. 1,25(OH)₂ D₃'ün ERAD ve UPR proteinleri üzerine olan etkilerinin transkripsiyon inhibitörü ve translasyon inhibitörü olan ActD ve CHX uygulamaları ile incelenmesi. Hormondan yoksun bırakılmış LNCaP hücreleri 2 saat süreyle 1 µg/ml CHX veya 1 µg/ml ActD ile ön muamele edildi ve takiben 24 saat süreyle 100nM 1,25(OH)₂ D₃ uygulaması gerçekleştirildi. Kontrol uygulaması olarak eş hacimde çözücü uygulandı. Hedef protein düzeyleri özgül primer antikorlar kullanılarak immünoiblottama çalışmaları ile incelendi. Beta-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

Sonuçlarımız CHX ön uygulaması gerçekleştirilen gruplarda 1,25(OH)₂ D₃ uygulamasına bağlı olarak yalnızca 1,25(OH)₂ D₃ uygulanan gruplarda gp78, IRE1α, PERK ve XBP-1s düzeylerinde azalma olduğu belirlendi. Buna karşın p97/VCP, Npl4, total-eIF2α düzeylerinde artış olduğu gözlenirken, Hrd1 ve Ufd1 düzeylerinde değişim olmadığı gözlemlendi. Önceki verilerimiz ile tutarlı olarak 1,25(OH)₂ D₃ uygulamasına bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla test edilen ERAD ve UPR ile ilişkili protein düzeylerinde benzer değişimler olduğu saptandı.

Aktinomisin D ile gerçekleştirdiğimiz denemelerde CHX ve önceki verilerimiz ile tutarlı olarak 1,25(OH)₂ D₃ uygulamasına bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla test edilen ERAD ve UPR ile ilişkili protein düzeylerinde benzer değişimler olduğu bir kez daha doğrulandı. ActD n uygulaması gerçekleştirilecek 1,25(OH)₂ D₃ ile indüklenen tüm gruplarda test edilen ERAD ve UPR ile ilişkili tüm protein üyelerinin düzeylerinde yalnızca 1,25(OH)₂ D₃ uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında azalma olduğu belirlendi. Yalnızca ActD uygulaması kontrol grubuna kıyasla test edilen tüm protein düzeylerinde azalmaya yol açtığını gösterdi.

Toplu olarak bu sonuçlar 1,25(OH)₂ D₃ uygulamasına bağlı olarak ERAD ve UPR ile ilişkili protein düzeylerindeki değişimlerin transkripsiyonel olarak regüle edildiğini önermektedir.

5. TARTIŞMA

ER memeli hücrelerinde karmaşık fonksiyonları yerine getiren sofistike bir organeldir. Hücre için kalsiyum homeostazisi, lipid sentezi, kolesterol ve karbonhidrat metabolizması, post-translasyonel modifikasyonların gerçekleştirilmesi, proteinlerin işlenmesi ve katlanması gibi çok sayıdaki eşsiz biyokimyasal süreçte önemli rollere sahiptir. Bu nedenle hücresel homeostazisin devamlılığında ER kritik roller üstlenen ve karmaşık moleküler sinyaller ile düzenlenen bir organeldir (1,167).

Oksidatif stres, hipoksi, hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonlarındaki değişiklikler, ER'nin üstlenmiş olduğu biyokimyasal fonksiyonlardaki aşırı aktivite artışı ve bu yol ile ER'nin kapasitesinin aşılması, patojen istilası veya inflamasyon gibi iç veya dış uyaranlar ER homeostazisini bozabilmekte ve bu durum ER stresi adı verilen süreci tetiklemektedir (99,167). ER stresine karşı sunulan hücresel yanıt, bu stresin üstesinden gelinmesi ve ER homeostazisini yeniden kurulmasını içeren adaptif mekanizmaların aktivasyonunu içerir.

ER stresine yanıt olarak hücreler, protein sentezini azaltarak, hatalı katlanmış ya da katlanmamış proteinleri hücreden temizlemesine yardımcı olacak ve ER'nin kapasitesini arttıracak karmaşık bir moleküler sinyal mekanizması olan UPR sinyalini uyarmaktadır (6–8).

Genetik instabilite ve mutasyonlar gibi etkiler kanser hücrelerinin ayırt edici özellikleri olan hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması ve göçüne yol açan ER stres yanıt yollarının yapısal aktivasyonu ile sonuçlanabilir (168). Özellikle kanser hücrelerinde kontrolsüzce gerçekleşen artan biyokimyasal aktivite ve gelişen proliferatif kapasite ER sistemleri üzerinde bir etkisi olan yüksek protein üretim oranları gerektirir. Bu nedenle prostat kanserinin de dahil olduğu birçok kanser türünde artmış ER stresi durumu gözlenmektedir (169).

ER'deki oksidatif ortam, ısı şoku, mutasyonlar veya ER'nin protein sentezi ve işlenmesine ilişkin kapasitesinin üstüne ulaşılması protein kalite kontrol süreçlerinde aksamaya ve hatalı katlanan, katlanmamış veya doğru oligomerize edilmemiş proteinlerin ER lümeninde birikimine yol açabilmektedir. Bu süreç ER'deki protein kalite kontrol mekanizması üyeleri ve istenmeyen proteinlerin etkisiz hale getirilmesi amacıyla 26S proteozoma yönlendiren ERAD mekanizması üyelerinin ifade

düzeylerinin arttırılmasına bağılı olarak ER homeostazının yeniden kurulmasıyla mümkün olmaktadır. ER homeostazisinin yeniden kurulamaması ve uzun süreli ER stresi süreçleri UPR aracılı olarak programlanmış hücre ölüm modlarını aktive ederek hücrenin yaşamının son bulması ile sonuçlanmaktadır (11).

Son yıllardaki çalışmalar ERAD ve UPR mekanizmasının kanser hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve invazyon gibi kanser hücrelerinin ayırt edici özellikleri üzerinde kritik görevleri olduğunu göstermiştir (13,16). Bu nedenle çok sayıdaki araştırma grubu artan bir ilgiyle bu mekanizmaların olası yeni regülasyon modellerin keşfedilmesinde ve diğere kanser tiplerindeki olası düzenleyici rolleri üzerine çalışmalarını sürdürmektedir.

ERAD ve UPR mekanizmasının hormon duyarlı kanser türlerindeki hormonal regülasyonu son yıllardaki çalışmalarda dikkat çekici hale gelmiştir (170). Androjenlerin prostat kanseri hücrelerinde ERAD mekanizması üzerindeki pozitif yöndeki düzenleyici etkileri karakterize edilmiştir. ERAD'ın androjenler ile protein kalite kontrol sürecine destek vererek prostat kanseri hücrelerinin tümörjenik özelliklerini desteklediğı belirlenmiştir. Bununla birlikte ERAD üyelerinin siRNA ile hedeflemenin prostat kanseri hücrelerinin proliferasyon, invazyon, migrasyon ve ankoraj bağımsız 3 boyutlu tümör oluşturma yeteneklerini büyük oranda sınırladığı belirlenmiştir (16).

ERAD'ın hormonal olası yeni bir regülasyonuna işaret eden olukça sınırlı bir verinin yer aldığı bir çalışmada nazal polipli kronik rinosinüzit hastalarından alınan örneklerle gerçekleştirilen bir çalışmada bir glikokortikoid hormon olan deksametazon uygulamasına bağılı olarak ERAD'ın majör E3 ligazlarından birisi olan Hrd1'in mRNA ve protein düzeylerinin aşağı regüle olduğu rapor edilmiştir (171).

Kanser hücrelerinde artan hücre proliferasyonu daha fazla protein üretimi gerektirmektedir. Daha fazla protein üretim ihtiyacı ise potansiyel olarak yetersiz protein katlama kapasitesine ve ER stresine yol açmaktadır. Kanser hücrelerinin hayatta kalmak ve ihtiyaçlarını desteklemek için yüksek oranda korunmuş UPR mekanizması gibi birçok hücresel adaptif yanıttan yararlandığı bilinmektedir. Son çalışmalarda özellikle meme ve prostat kanseri gibi hormonla düzenlenen kanserlerde, UPR'nin IRE1 α ve PERK kollarının kanser hücreleri tarafından

düzenlenebildiğini ve hormonal olarak düzenlenmiş kanserlerde yeni bir hedef olarak UPR yolunun ele alınabileceği ön görülmüştür (170,172).

Son zamanlarda artan kanıtlar sekosteroid hormon olan D vitamininin ve reseptörünün prostat kanserleri gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bu bilgiler ışığında ilerlenen bu tez çalışmasında ise, D vitamininin aktif metaboliti olan $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ aracılı VDR sinyalleme sisteminin ERAD ve UPR mekanizmaları üzerine olan olası düzenleyici rolünün aydınlatılması ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 'ün prostat kanserinde UPR ve ERAD mekanizmaları üzerindeki rolünün değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen doz ve zamana bağlı olarak $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 'ün etkilerini incelediğimiz deneylerde $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ tedavisinin Hrd1, gp78, p97 / VCP, Ufd1, Npl4 ve substrat moleküllerini 26S proteozoma hedeflemede kritik olan poliubikitin düzeyleri de dahil olmak üzere tüm test edilen protein ifade düzeylerini doza ve zamana bağlı bir şekilde kademeli olarak azalttığını belirlendi (Şekil 8-9). Bununla birlikte ER stresi ile ilişkili proteinler olan ER stresinde protein düzeylerinde belirgin artışlar gösteren moleküler şaperon BiP/GRP78 ve protein katlanması ile ilişkili protein disülfid bağı oluşumundan sorumlu protein-disülfid izomeraz enzimi olan PDI protein düzeylerinde belirgin değişimler gözlenmedi. BiP/GRP78 ve PDI, ER stresi altında yukarı yönlü regüle olduğu iyi bilinen ER protein üyeleridir (173). Bu sonuçlar $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ uygulamasının LNCaP prostat kanseri hücrelerinde ERAD bileşenlerinin protein düzeylerini ER stresinin indüksiyonuna neden olmadan negatif olarak düzenlediğini önermektedir.

$1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 'ün UPR sinyali üzerindeki etkisini anlamak için $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ uyarımı ile doz ve zamana bağlı yanıtları incelediğimiz çalışmalarda UPR'nin IRE1 α kolu ile ilişkili IRE1 α ve IRE1 α 'nın uyarılması ile sahip olduğu endoribonükleaz aktivitesi ile XBP-1 mRNA'sının splice versiyonu olan XBP-1s'nin oluşarak translasyona girmesi sonucu oluşan XBP-1s protein düzeylerinin doz ve zamana bağlı olarak $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ uygulaması ile arttığı belirlendi (Şekil 10) (174). Bu sonuç $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 'ün UPR'nin IRE1 α kolunun indüksiyonuna aracılı olduğunu önermektedir. UPR'nin PERK kolu ile ilişkili sinyal sistemini incelediğimiz

çalışmalarda doz ve zamana bağlı olarak 1,25(OH)₂ D₃ uygulaması ile PERK proteinin ifade düzeylerinin azaldığı belirlendi.

PERK aktivasyonu, UPR'nin çeviri yanıtını düzenlemektedir. PERK sinyal sisteminin aşağı regülatör üyesi olan eIF2 α , PERK'in uyarılması sonrasında otofosforilasyon ve homooligomerizasyon yolu ile aktive olan PERK kinaz domainleri aracılığıyla eIF2 kompleksinin bir bileşeni olan ökaryotik translasyon başlatma faktörü eIF2 α 'yı serin 51 pozisyonundan fosforilasyona uğratmaktadır (175). Bu durum ribozom inhibisyonu ve global hücre translasyonunun kısa bir zayıflaması ile sonuçlanmaktadır (176). Bu durum protein kalite kontrol mekanizmalarının üzerindeki yükü hafifletmeye yardımcı olmaktadır. Her ne kadar bu süreç protein sentezinde bir zayıflamaya neden olsa da stres koşulları altında p(ser51)-eIF2 α oluşumu global translasyonu bloke ederek özelleşmiş bir translasyonel programın gerçekteşmesine izin vermektedir. Bu programın üyelerinden birisi de ATF4 proteinidir (177). ATF4 bir transkripsiyon faktörüdür ve antioksidan genlerin, protein kalite kontrol üyesi proteinlerin ve ERAD ile ilişkili üyelerin düzeylerini yönlendirmektedir (104,177,178). Bulgularımız doz ve zaman bağlı olarak 1,25(OH)₂ D₃ uygulaması sonrasında ATF4 protein düzeylerinin negatif düzenlendiğini göstermiştir (şekil 11).

Fosforilasyon yolu ile aktive olan eIF2 α 'nın translasyon üzerindeki baskılayıcı etkisi bir protein fosfataz olan GADD34 ile düzenlenmektedir (179). GADD34 eIF2 α 'nın defosforilasyonunu regüle ederek translasyonun global blokajının hücresel protein sentez süreçlerinin sekteye uğramaması için hassas bir şekilde düzenlemektedir (179,180). Sonuçlarımıza göre eIF2 α 'nın defosforilasyonundan sorumlu protein GADD34 düzeylerinin 1,25(OH)₂ D₃ uygulaması ile doz ve zaman bağımlı arttığını belirlenmiştir. Bu bulgular; 1,25(OH)₂ D₃ uygulamasının p(ser51)-eIF2 α düzeylerindeki azalış ile GADD34 protein ifadesi düzeylerinin arasında ters bir ilişki olması 1,25(OH)₂ D₃ 'ün PERK'in aşağı regülasyonu ve GADD34'ün aktivasyonu yolu ile PERK sinyali üzerinde negatif düzenleyici etkisi olduğunu önermektedir (şekil 11). Toplu olarak bu sonuçlar, 1,25(OH)₂ D₃ aracılı indüklenmiş sinyal mekanizmasının, UPR'nin PERK sinyal yolağını negatif olarak düzenlediğini, tam tersi olarak IRE1 α 'yı uyardığını öne sürmektedir.

VDR, nükleer hormon reseptörü süper ailesinin bir üyesi olan ligantla indüklenabilir bir transkripsiyon faktörüdür. 1,25(OH)₂ D₃ VDR'yi uyaran güçlü bir liganttır. 1,25(OH)₂ D₃ 'ün LNCaP hücrelerinde VDR uyarımını test etmek için VDR ile sıkı şekilde regüle olduğu bilinen CYP3A5 geninin mRNA ifadesi düzeylerini qRT-PCR ile inceledik. CYP3A5, sitokrom P450 süper ailesinin bir üyesini kodlamaktadır (181). Sonuçlarımız LNCaP hücrelerine 1,25(OH)₂ D₃ uygulandığında CYP3A5 mRNA düzeylerinin doz bağımlı olarak kontrol grubuna kıyasla yukarı düzenlendiğini göstermiştir. Bu sonuç LNCaP hücrelerinde 1,25(OH)₂ D₃ aracılı olarak VDR uyarımının başarısını doğrulamıştır (Şekil 12). 1,25(OH)₂ D₃ uyarımı altında ERAD üyelerinin mRNA ifade düzeylerindeki değişimleri incelediğimiz çalışmalarda Hrd1, p97/VCP ve Npl4 üyelerinin mRNA ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalış olduğunu belirlendi. gp78, Ufd1 ve Ufd2 mRNA düzeylerinde ortalamalara bakılarak azalış olduğu belirlenirken kontrol grubuna kıyasla bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. ER membran proteinlerinden olan ve ERAD ile ilişkili olarak substrat moleküllerinin retrotranslokasyon basamağına destek verdiği düşünülen Derlin1 mRNA ifade düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla bir değişim olmadığı belirlendi (182). Buna karşın ERAD'ın tanımlanan ilk endojen inhibitör proteini olan SVIP mRNA ifadesinin 100nM 1,25(OH)₂ D₃ uygulamasında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış sergilediği belirlendi (51). Tüm bu sonuçlar protein düzeyindeki sonuçlarla tutarlı olarak ERAD üyelerinin 1,25(OH)₂D₃ uygulaması ile transkripsiyonel düzeyde negatif düzenlendiğini önermektedir. SVIP mRNA düzeylerinin yukarı yönlü regülasyonu ERAD'ın fonksiyonel olarak 1,25(OH)₂ D₃ ile negatif düzenlendiğini işaret etmektedir.

1,25(OH)₂ D₃'ün ERAD ve UPR üzerindeki biyolojik etkisinin yalnızca LNCaP hücreleriyle sınırlı olup olmadığını test etmek amacıyla *in vitro* da prostat kanserini iyi mimik eden bir başka hücre hattı olan 22Rv1 ile denemeler gerçekleştirdik. Bu aşamada 1,25(OH)₂ D₃ uygulamasının ERAD ve UPR üyeleri üzerindeki etkisinin VDR ile ilişkisini anlamak üzere her iki hücre hattında da VDR mRNA ifade düzeylerini doğruladık (Şekil 13). Sonuçlarımız her iki hücre hattının da VDR mRNA'yı ifade ettiğini gösterdi (Şekil 13). 1,25(OH)₂ D₃ stimülasyonu altında ERAD ve UPR proteinlerinin ifade düzeylerindeki değişimlerin her iki hücre

hattında da benzer olduğunu gösterdik. Bu bulgular $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ aracılı elde edilen yanıtların hücre hattına özgül olmadığını doğruladı (Şekil 14).

Son olarak ERAD ve UPR bileşenlerinin $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ aracılı düzenlemesinin transkripsiyonel ve/veya translasyonel seviyede kontrol edilip edilmediğini daha fazla analiz etmek için iyi bilinene bir RNA sentezi inhibitörü ActD (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ve protein sentezi inhibitörü olan sikloheksimid (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ile denemeler gerçekleştirdik. ActD, DNA'ya interkale olan RNA polimerazı inhibe ederek transkripsiyonu bloke eden siklik polipeptit bir antibiyotiktir (183). CHX ökaryotlarda bir protein sentezi inhibe eden güçlü bir ajandır. Etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da 60S ribozomal biriminin E-bölgesine bağlanarak ve asetillenmiş tRNA'ya müdahale ederek translasyonu baskıladığı düşünülmektedir (184,185). ActD ve CHX ile gerçekleştirdiğimiz denemelerde ERAD bileşenlerinin $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ uyarımı ile transkripsiyonel düzeyde kontrol edildiği belirlenmiştir.

Toplu olarak bu tez çalışması kapsamındaki tüm sonuçlar dikkate alındığında $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ uyarımı test edilen ERAD proteinlerinin ifade düzeylerini ve UPR'nin PERK koluna ilişkin sinyalin $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ aracılı olarak negatif düzenlendiğini göstermiştir. UPR ile ilişkili IRE1 α sinyalinin ise $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ aracılı olarak pozitif yönde regüle olduğunu belirlenmiştir. Bununla ERAD üyelerinin $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ aracılı düzenleme modelinin hücre hattına özgül olmadığını doğrulanmıştır. Ayrıca LNCaP ve 22Rv1 prostat kanseri hücrelerinin VDR transkriptini ifade ettikleri doğrulanmıştır.

$1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 'ün VDR'nin bilinen iyi bir ligandı olduğu düşünüldüğünde sonuçlarımız $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ stimülasyonu altında prostat kanseri hücrelerinde ERAD ve UPR bileşenlerinin düzeylerinin $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ aracılı olarak indüklenen VDR aracılı kontrol edilen özelleşmiş bir transkripsiyonel program ile düzenlendiğini düşündürmektedir. Ancak bu hipotez siRNA aracılı susturma ve farmakolojik blokajı gibi deney modelleri ile doğrulanmaya muhtaçtır. Bununla birlikte PERK sinyalinin ERAD bileşenlerinin düzeylerini transkripsiyonel olarak regüle ettiği bilinmektedir. $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ uyarımı altında UPR'nin PERK kolunun baskılanması ve ERAD üyelerinin ifade düzeylerindeki azalma arasında bir ilişki olabileceği görülmektedir. Ancak bu ilişkinin karakterizasyonu için ileri deney modelleri ile çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Özet olarak bulgularımız prostat kanseri hücrelerinde IRE1 α sinyallemesinin 1,25(OH)₂ D₃ ile uyarıldığını, PERK sinyalinin baskılandığını, ERAD üyelerinin mRNA ve protein düzeylerinin 1,25(OH)₂ D₃ ile negatif düzenlendiğini göstermiştir.

Yürütülen tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlara dayanarak 1,25(OH)₂ D₃ aracılı olarak indüklenen VDR sinyalizasyonunun etkisinin meme kanseri gibi hormona bağımlı diğer kanser türlerindeki etkilerinin karsinogenez ile ilişkili ERAD ve UPR mekanizmaları üzerindeki etkilerinin daha kapsamlı araştırılmasına yol göstermesi açısından iyi bir model olacağını düşünmekteyiz.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Özellikle prostat ve meme kanserleri gibi hormon duyarlı kanser türlerinde hormonal regülasyonla ERAD ve UPR mekanizmasının düzenlenebildiği öngörülmekte ve kanserin altında yatan bu mekanizmaların aydınlatılması gerektiği düşünüldüğü için yapılan çalışmalarda hormon regülasyonuna bağlı mekanizmalar son yıllarda araştırma odağı olmuştur.

Bir sekosteroid hormon olan D vitamininin ve reseptörünün ise prostat kanserleri gelişiminde önemli bir rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmektedir. Bu bilgiler ışığında ilerlenen bu tez çalışmasında ise, D vitamininin aktif metaboliti olan $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ aracılı VDR sinyalleme sisteminin ERAD ve UPR mekanizmaları üzerine olan olası düzenleyici rolünün aydınlatılması ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

Yapılan tez çalışmasının sonucunda, $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 'ün prostat kanserinde ERAD üyelerinin protein ve mRNA ifade düzeylerindeki değişimler sonucu, doza ve zamana bağlı bir şekilde kademeli olarak azalttığı belirlenmiş ve $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ uyarımı altında ERAD üyelerinin mRNA ifade düzeylerindeki değişimleri incelenerek $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ uygulamasının LNCaP prostat kanseri hücrelerinde ERAD bileşenlerinin protein düzeylerini ER stresinin indüksiyonuna neden olmadan negatif olarak düzenlendiği desteklenmiştir.

$1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ aracılı olarak indüklenmiş sinyal mekanizmasının, UPR'nin PERK sinyal yolağını negatif olarak düzenlediği belirlenirken, tam tersi olarak IRE1 α 'nın ise $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ aracılı olarak uyarıldığını öne sürülmektedir. Tüm sonuçlara bağlı olarak, ERAD bileşenlerinin $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ uygulaması ile transkripsiyonel düzeyde negatif olarak kontrol edildiği belirlenmiştir.

Ek olarak, $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 'ün ERAD ve UPR üzerindeki biyolojik etkisinin yalnızca LNCaP hücrelerinde sınırlı olmadığı ve 22Rv1 hücre hattında da aynı sonuçları gösterdiği desteklenmiş ve $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ aracılı elde edilen yanıtların hücre hattına özgül olmadığı doğrulanmıştır.

Yukarıda da belirtildiği gibi, $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ aracılı olarak indüklenen VDR sinyalizasyonunun etkisinin meme kanseri gibi hormon bağımlı diğer kanser türlerinde de araştırılması gerektiğini ve bu kanser türlerinin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasının hedefleri için önemli olacağı öngörülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2016 Jan;73(1):79–94.
2. Rapoport TA. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature.* 2007 Nov 29;450(7170):663–9.
3. Greenfield JJ, High S. The Sec61 complex is located in both the ER and the ER-Golgi intermediate compartment. *J Cell Sci.* 1999 May;112(Pt 10):1477–86.
4. Nishikawa SI, Brodsky JL, Nakatsukasa K. Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *J Biochem.* 2005 May;137(5):551–5.
5. Tepedelen BE, Kirmizibayrak PB. Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation (ERAD). *Endoplasmic Reticulum.* 2019. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.82043>
6. Adams CJ, Kopp MC, Larburu N, Nowak PR, Ali MMU. Structure and Molecular Mechanism of ER Stress Signaling by the Unfolded Protein Response Signal Activator IRE1. *Front Mol Biosci.* 2019 Mar 12;6:11.
7. Cao SS, Kaufman RJ. Unfolded protein response. *Curr Biol.* 2012 Aug 21;22(16):R622–6.
8. Senft D, Ronai ZA. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci.* 2015 Mar;40(3):141–8.
9. Evyapan G, Ay G , Cömertpay G, Lüleyap HÜ,. Tümörögenezisde endoplazmik retikulum stres cevabının rolü. *Cukurova Med J.* (2019): 241-248 Available from: <https://dergipark.org.tr/en/pub/cumj/issue/42403/480539?publisher=cu>
10. Liu CY, Kaufman RJ. The unfolded protein response. *J Cell Sci.* 2003 May 15;116(Pt 10):1861–2.

11. Hwang J, Qi L. Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways. *Trends Biochem Sci.* 2018 Aug;43(8):593–605.
12. Bhattacharya A, Qi L. ER-associated degradation in health and disease—from substrate to organism. *J Cell Sci* . 1 December 2019; 132 (23): jcs232850. Available from: <https://journals.biologists.com/jcs/article-abstract/132/23/jcs232850/223916>
13. Tsai YC, Weissman AM. The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer. *Genes Cancer.* 2010 Jul 1;1(7):764–78.
14. Scheper W, Hoozemans JJM. The unfolded protein response in neurodegenerative diseases: a neuropathological perspective. *Acta Neuropathol.* 2015 Sep;130(3):315–31.
15. Duan X, Zhou Y, Teng X, Tang C, Qi Y. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis is activated in vascular calcification. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Oct 2;387(4):694–9.
16. Erzurumlu Y, Ballar P. Androgen Mediated Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation and its Effects on Prostate Cancer. *Sci Rep.* 2017 Jan 16;7:40719.
17. Erzurumlu Y. Endoplazmik Retikulum Protein Kalite Kontrol Mekanizması Üyelerinde Varsayılan Androjen Cevap Elementlerinin Profillemesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2021; 12(1): 86-94.
18. Zhao XY, Feldman D. The role of vitamin D in prostate cancer. *Steroids.* 2001 Mar;66(3-5):293–300.
19. Krishnan AV, Peehl DM, Feldman D. The role of vitamin D in prostate cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2003;164:205–21.
20. Stewart LV, Weigel NL. Vitamin D and prostate cancer. *Exp Biol Med* . 2004 Apr;229(4):277–84.
21. Blutt SE, Weigel NL. Vitamin D and prostate cancer. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999 Jun;221(2):89–98.

22. Slattery ML. Vitamin D receptor gene (VDR) associations with cancer. *Nutr Rev*. 2007 Aug;65(8 Pt 2):S102–4.
23. Shrihari TG. Vitamin D Role in Prevention of Cancer: Overview. *Indian J Med Paediatr Oncol*. 2018 Jan;39(01):75–8.
24. Vuolo L, Di Somma C, Faggiano A, Colao A. Vitamin D and cancer. *Front Endocrinol* . 2012 Apr 23;3:58.
25. Chen TC, Holick MF. Vitamin D and prostate cancer prevention and treatment. *Trends Endocrinol Metab*. 2003 Nov;14(9):423–30.
26. Trump DL, Aragon-Ching JB. Vitamin D in prostate cancer. *Asian J Androl*. 2018 May;20(3):244–52.
27. Tatar M. , Tatar T. Endoplazmik Retikulum Stresi ve İlişkili Hastalıklar. *Osmangazi Tıp Dergisi*. 2019; 41(3): 294-303.
28. Westrate LM, Lee JE, Prinz WA, Voeltz GK. Form follows function: the importance of endoplasmic reticulum shape. *Annu Rev Biochem*. 2015 Jan 12;84:791–811.
29. Ashby MC, Tepikin AV. ER calcium and the functions of intracellular organelles. In *Seminars in cell & developmental biology* 2001 Feb 1 (Vol. 12, No. 1, pp. 11-17). Academic Press.
30. Park SH, Blackstone C. Further assembly required: construction and dynamics of the endoplasmic reticulum network. *EMBO Rep*. 2010 Jul;11(7):515–21.
31. Braakman I, Bulleid NJ. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem*. 2011;80:71–99.
32. Smith M, Wilkinson S. ER homeostasis and autophagy. *Essays Biochem*. 2017 Dec 12;61(6):625–35.
33. Kaufman RJ. Regulation of mRNA translation by protein folding in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci*. 2004 Mar;29(3):152–8.
34. Nicchitta CV. A platform for compartmentalized protein synthesis: protein translation and translocation in the ER. *Curr Opin Cell Biol*. 2002 Aug;14(4):412–6.

35. Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Takami Y, Satrimafitrah P, Kato H, et al. Pre-emptive Quality Control Protects the ER from Protein Overload via the Proximity of ERAD Components and SRP. *Cell Rep.* 2015 Nov 3;13(5):944–56.
36. Johnson AE, van Waes MA. The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15(1):799–842.
37. Skach WR. The expanding role of the ER translocon in membrane protein folding. *J Cell Biol.* 2007 Dec 31;179(7):1333–5.
38. Seydel G. , Aksoy K. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptozis Mekanizması. *aktd.* 2012; 21(4): 221-235. <https://dergipark.org.tr/en/pub/aktd/issue/2210/29385>
39. Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T. ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol.* 2005 Aug;7(8):766–72.
40. Mehnert M, Sommer T, Jarosch E. ERAD ubiquitin ligases: multifunctional tools for protein quality control and waste disposal in the endoplasmic reticulum. *Bioessays.* 2010 Oct;32(10):905–13.
41. Christianson JC, Ye Y. Cleaning up in the endoplasmic reticulum: ubiquitin in charge. *Nat Struct Mol Biol.* 2014 Apr;21(4):325–35.
42. Shen Y, Ballar P, Apostolou A, Doong H, Fang S. ER stress differentially regulates the stabilities of ERAD ubiquitin ligases and their substrates. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jan 26;352(4):919–24.
43. Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM. Protein ubiquitination involving an E1–E2–E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature.* 1995 Jan;373(6509):81–3.
44. Xie Y, Avello M, Schirle M, McWhinnie E, Feng Y, Bric-Furlong E, et al. Deubiquitinase FAM/USP9X interacts with the E3 ubiquitin ligase SMURF1 protein and protects it from ligase activity-dependent self-degradation. *J Biol Chem.* 2013 Feb 1;288(5):2976–85.
45. Yoshida Y, Chiba T, Tokunaga F, Kawasaki H, Iwai K, Suzuki T, et al. E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. *Nature.* 2002 Jul 25;418(6896):438–42.

46. Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA. A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature*. 2004 Jun 24;429(6994):841–7.
47. Niwa H, Ewens CA, Tsang C, Yeung HO, Zhang X, Freemont PS. The role of the N-domain in the ATPase activity of the mammalian AAA ATPase p97/VCP. *J Biol Chem*. 2012;287(11):8561–8570. doi:10.1074/jbc.M111.302778
48. Goder V. Roles of ubiquitin in endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD). *Curr Protein Pept Sci*. 2012 Aug;13(5):425–35.
49. Hampton RY, Sommer T. Finding the will and the way of ERAD substrate retrotranslocation. *Curr Opin Cell Biol*. 2012 Aug;24(4):460–6.
50. Baldrige RD, Rapoport TA. Autoubiquitination of the Hrd1 Ligase Triggers Protein Retrotranslocation in ERAD. *Cell*. 2016 Jul 14;166(2):394–407.
51. Ballar P, Zhong Y, Nagahama M, Tagaya M, Shen Y, Fang S. Identification of SVIP as an endogenous inhibitor of endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem*. 2007 Nov 23;282(47):33908–14.
52. Ballar P, Fang S. Regulation of ER-associated degradation via p97/VCP-interacting motif. *Biochem Soc Trans*. 2008 Oct;36(Pt 5):818–22.
53. Kaneko M, Ishiguro M, Niinuma Y, Uesugi M, Nomura Y. Human HRD1 protects against ER stress-induced apoptosis through ER-associated degradation. *FEBS Lett*. 2002 Dec 4;532(1-2):147–52.
54. Hosokawa N, Wada I. Association of the SEL1L protein transmembrane domain with HRD1 ubiquitin ligase regulates ERAD-L. *FEBS J*. 2016 Jan;283(1):157–72.
55. Schulz J, Avci D, Queisser MA, Gutschmidt A, Dreher LS, Fenech EJ, et al. Conserved cytoplasmic domains promote Hrd1 ubiquitin ligase complex formation for ER-associated degradation (ERAD). *J Cell Sci*. 2017 Oct 1;130(19):3322–35.
56. Tan X, He X, Fan Z. Upregulation of HRD1 promotes cell migration and invasion in colon cancer. *Mol Cell Biochem*. 2019 Apr;454(1-2):1–9.

57. Karamali N, Ebrahimnezhad S, Khaleghi Moghadam R, Daneshfar N, Rezaeiemanesh A. HRD1 in human malignant neoplasms: Molecular mechanisms and novel therapeutic strategy for cancer. *Life Sci.* 2022;301:120620. doi:10.1016/j.lfs.2022.120620
58. Pabarcus MK, Hoe N, Sadeghi S, Patterson C, Wiertz E, Correia MA. CYP3A4 ubiquitination by gp78 (the tumor autocrine motility factor receptor, AMFR) and CHIP E3 ligases. *Arch Biochem Biophys.* 2009 Mar 1;483(1):66–74.
59. Chen Z, Du S, Fang S. gp78: a multifaceted ubiquitin ligase that integrates a unique protein degradation pathway from the endoplasmic reticulum. *Curr Protein Pept Sci.* 2012 Aug;13(5):414–24.
60. Fairbank M, St-Pierre P, Nabi IR. The complex biology of autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase (AMF/PGI) and its receptor, the gp78/AMFR E3 ubiquitin ligase. *Mol Biosyst.* 2009 Aug;5(8):793–801.
61. Singhal SK, Byun JS, Yan T, Yancey R, Caban A, Gil Hernandez S, Bufford S, Hewitt SM, Winfield J, Pradhan J, Mustkov V, McDonald JA, Pérez-Stable EJ, Nápoles AM, Vohra N, De Siervi A, Yates C, Davis MB, Yang M, Tsai YC, Weissman AM, Gardner K. Protein expression of the gp78 E3 ligase predicts poor breast cancer outcome based on race. *JCI Insight.* 2022 Jul 8;7(13):e157465. doi: 10.1172/jci.insight.157465.
62. Shang Y, Zhu Z. gp78 is specifically expressed in human prostate cancer rather than normal prostate tissue. *J Mol Histol.* 2013 Dec;44(6):653-9. doi: 10.1007/s10735-013-9512-9.
63. Chang YW, Tseng CF, Wang MY, Chang WC, Lee CC, Chen LT, Hung MC, Su JL. Deacetylation of HSPA5 by HDAC6 leads to GP78-mediated HSPA5 ubiquitination at K447 and suppresses metastasis of breast cancer. *Oncogene.* 2016 Mar 24;35(12):1517-28. doi: 10.1038/onc.2015.214. Epub 2015 Jun 29. Erratum in: *Oncogene.* 2020 Jan;39(4):946-949. PMID: 26119938.
64. Park S, Isaacson R, Kim HT, Silver PA, Wagner G. Ufd1 exhibits the AAA-ATPase fold with two distinct ubiquitin interaction sites. *Structure.* 2005 Jul;13(7):995–1005.
65. Huiting LN, Samaha Y, Zhang GL, Roderick JE, Li B, Anderson NM, et al. UFD1 contributes to MYC-mediated leukemia aggressiveness through

- suppression of the proapoptotic unfolded protein response. *Leukemia*. 2018 Nov;32(11):2339–51.
66. Chen M, Gutierrez GJ, Ronai ZA. Ubiquitin-recognition protein Ufd1 couples the endoplasmic reticulum (ER) stress response to cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 31;108(22):9119–24.
 67. Ballar P, Shen Y, Yang H, Fang S. The role of a novel p97/valosin-containing protein-interacting motif of gp78 in endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem*. 2006 Nov 17;281(46):35359–68.
 68. Lin PH, Chiang MT, Chau LY. Ubiquitin-proteasome system mediates heme oxygenase-1 degradation through endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Oct;1783(10):1826–34.
 69. Hitchcock AL, Krebber H, Frietze S, Lin A, Latterich M, Silver PA. The conserved npl4 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation. *Mol Biol Cell*. 2001 Oct;12(10):3226–41.
 70. Wang X, Wang F. Ubiquitin Fusion Degradation 1 like Protein Expression in Gastric Cancer and its Clinical Significance. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022 Mar 9;270-6.
 71. Chen X, Ran ZH, Tong JL, Nie F, Zhu MM, Xu XT, Xiao SD. RNA interference (RNAi) of Ufd1 protein can sensitize a hydroxycamptothecin-resistant colon cancer cell line SW1116/HCPT to hydroxycamptothecin. *Journal of Digestive Diseases*. 2011 Apr;12(2):110-6.
 72. Corbett A, Ferrigno P, Henry M, Kahana J, Koepp D, Lee M, et al. Genetic analysis of macromolecular transport across the nuclear envelope. *Exp Cell Res*. 1996 Dec 15;229(2):212–6.
 73. Bodnar N, Rapoport T. Toward an understanding of the Cdc48/p97 ATPase. *F1000Res*. 2017 Aug 3;6:1318. doi: 10.12688/f1000research.11683.1
 74. Bays NW, Hampton RY. Cdc48-Ufd1-Npl4: stuck in the middle with Ub. *Curr Biol*. 2002 May 14;12(10):R366-71. doi: 10.1016/s0960-9822(02)00862-x.

75. Wolf DH, Stolz A. The Cdc48 machine in endoplasmic reticulum associated protein degradation. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1823(1):117–24.
76. Lu BS, Yin YW, Zhang YP, Guo PY, Li W, Liu KL. Upregulation of NPL4 promotes bladder cancer cell proliferation by inhibiting DXO destabilization of cyclin D1 mRNA. *Cancer Cell Int*. 2019 May 30;19:149.
77. Yoshino H, Yamada Y, Enokida H, Osako Y, Tsuruda M, Kuroshima K, Sakaguchi T, Sugita S, Tatarano S, Nakagawa M. Targeting NPL4 via drug repositioning using disulfiram for the treatment of clear cell renal cell carcinoma. *PloS one*. 2020 Jul 15;15(7):e0236119.
78. Chen C, Nie D, Huang Y, Yu X, Chen Z, Zhong M, Liu X, Wang X, Sui S, Liu Z, Tan J, Yu Z, Li Y, Zeng C. Anticancer effects of disulfiram in T-cell malignancies through NPL4-mediated ubiquitin-proteasome pathway. *J Leukoc Biol*. 2022 Apr 1. doi: 10.1002/JLB.5MA1121-644R.
79. Ding N, Zhu Q. Disulfiram combats cancer via crippling valosin-containing protein/p97 segregase adaptor NPL4. *Transl Cancer Res*. 2018 Apr;7(Suppl 4):S495-S499. doi: 10.21037/tcr.2018.03.33.
80. Le LTM, Kang W, Kim JY, Le OTT, Lee SY, Yang JK. Structural Details of Ufd1 Binding to p97 and Their Functional Implications in ER-Associated Degradation. *PLoS One*. 2016 Sep 29;11(9):e0163394.
81. Parzych K, Chinn TM, Chen Z, Loaiza S, Porsch F, Valbuena GN, et al. Inadequate fine-tuning of protein synthesis and failure of amino acid homeostasis following inhibition of the ATPase VCP/p97. *Cell Death Dis*. 2015 Dec 31;6:e2031.
82. Cao K, Nakajima R, Meyer HH, Zheng Y. The AAA-ATPase Cdc48/p97 regulates spindle disassembly at the end of mitosis. *Cell*. 2003 Oct 31;115(3):355–67.
83. Hetzer M, Meyer HH, Walther TC, Bilbao-Cortes D, Warren G, Mattaj IW. Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly. *Nat Cell Biol*. 2001 Dec;3(12):1086–91.
84. Lim PJ, Danner R, Liang J, Doong H, Harman C, Srinivasan D, et al. Ubiquilin and p97/VCP bind erasin, forming a complex involved in ERAD. *J Cell Biol*. 2009 Oct 19;187(2):201–17.

85. Tsujimoto Y, Tomita Y, Hoshida Y, Kono T, Oka T, Yamamoto S, et al. Elevated expression of valosin-containing protein (p97) is associated with poor prognosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2004 May 1;10(9):3007–12.
86. Li C, Huang Y, Fan Q, Quan H, Dong Y, Nie M, et al. p97/VCP is highly expressed in the stem-like cells of breast cancer and controls cancer stemness partly through the unfolded protein response. *Cell Death Dis.* 2021 Mar 17;12(4):286.
87. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Sakon M, Kameyama M, Imaoka S, et al. Expression of valosin-containing protein in colorectal carcinomas as a predictor for disease recurrence and prognosis. *Clin Cancer Res.* 2004 Jan 15;10(2):651–7.
88. Yamamoto S, Tomita Y, Nakamori S, Hoshida Y, Nagano H, Dono K, et al. Elevated expression of valosin-containing protein (p97) in hepatocellular carcinoma is correlated with increased incidence of tumor recurrence. *J Clin Oncol.* 2003 Feb 1;21(3):447–52.
89. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Takiguchi S, Fujiwara Y, Yasuda T, et al. Expression level of valosin-containing protein is strongly associated with progression and prognosis of gastric carcinoma. *J Clin Oncol.* 2003 Jul 1;21(13):2537–44.
90. Yu CC, Yang JC, Chang YC, Chuang JG, Lin CW, Wu MS, et al. VCP phosphorylation-dependent interaction partners prevent apoptosis in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *PLoS One.* 2013 Jan 31;8(1):e55724.
91. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Iizuka N, Kidogami S, Miyata H, et al. Expression level of valosin-containing protein (p97) is associated with prognosis of esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 15;10(16):5558–65.
92. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Iizuka N, Monden M, Yamamoto S, et al. Expression level of valosin-containing protein (p97) is correlated with progression and prognosis of non-small-cell lung carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2004 Jul;11(7):697–704.

93. Li X, Zhang K, Li Z. Unfolded protein response in cancer: the physician's perspective. *J Hematol Oncol*. 2011 Feb 23;4:8.
94. Düzgün A. , Alaçam H. , Okuyucu A. Endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabı. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 2012; 29(2): 95-100. <https://dergipark.org.tr/en/pub/omujecm/article/217091>
95. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*. 2000 May;5(5):897–904.
96. Cavener DR, Gupta S, McGrath BC. PERK in beta cell biology and insulin biogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2010 Dec;21(12):714–21.
97. Fusakio ME, Willy JA, Wang Y, Mirek ET, Al Baghdadi RJT, Adams CM, et al. Transcription factor ATF4 directs basal and stress-induced gene expression in the unfolded protein response and cholesterol metabolism in the liver. *Mol Biol Cell*. 2016 May 1;27(9):1536–51.
98. Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Aug;21(8):421–38.
99. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jul;8(7):519–29.
100. Bashir S, Banday M, Qadri O, Bashir A, Hilal N, Nida-I-Fatima, et al. The molecular mechanism and functional diversity of UPR signaling sensor IRE1. *Life Sci*. 2021 Jan 15;265:118740.
101. Shen J, Prywes R. ER stress signaling by regulated proteolysis of ATF6. *Methods*. 2005 Apr;35(4):382–9.
102. Romero-Ramirez L, Cao H, Nelson D, Hammond E, Lee AH, Yoshida H, et al. XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Res*. 2004 Sep 1;64(17):5943–7.
103. Rodvold JJ, Chiu KT, Hiramatsu N, Nussbacher JK, Galimberti V, Mahadevan NR, Willert K, Lin JH, Zanetti M. Intercellular transmission of the unfolded protein response promotes survival and drug resistance in cancer

- cells. Sci Signal. 2017 Jun 6;10(482):eaah7177. doi: 10.1126/scisignal.aah7177.
104. Fels DR, Koumenis C. The PERK/eIF2alpha/ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth. Cancer Biol Ther. 2006 Jul;5(7):723–8.
105. Fidan F, Alkan BM, Tosun A. Çağın Pandemisi: D Vitamini Eksikliği ve Yetersizliği. Türk Osteoporoz Derg. 2014 Aug 5;20(2):71–4.
106. Terli EP, Mutlu F, Uluçay C, Kılıç N, Akkır M, Atılgan O, Özgün E, Kabadere S. D vitamini: Yapısı, Sentezi ve Çeşitli Hastalıklardaki Önemi. Türk Tıp Öğrencileri Araştırma Dergisi. 2019; 1(1): 1-6. <https://dergipark.org.tr/en/pub/toad/issue/52445/687801>
107. Büyükdere Y, Akyol Mutlu A. D Vitamini ve Enfeksiyon Hastalıkları. SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd. 2019;5(3):45.
108. Kıdır V. D Vitamininin kardiyovasküler ve metabolik etkileri. Journal of Clinical and Experimental Investigations. 2013; 4(3): 398-404. <https://dergipark.org.tr/en/pub/jcei/article/122284>
109. Öztekin Y, Ayaz A. Otoimmün Tiroid Hastalıklarında D Vitamininin Rolü. İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi. 2022; 7(1): 179-184. <https://dergipark.org.tr/en/pub/ikcusbfd/issue/68428/904289>
110. Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. Ann Epidemiol. 2009 Feb;19(2):73–8.
111. Dağhan Ş, Yelten G. Güneş Işığı Ve D Vitamininin Sağlığa Etkisi; Tarihsel Bakış. Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. 2016; 5(4): 119-125. <https://dergipark.org.tr/en/pub/gumussagbil/issue/32262/358462>
112. Balcı C, Toktaş N. D Vitamini Sentezi, Metabolizması Ve Sağlık Üzerine Etkileri. Gazi Sağlık Bilimleri Dergisi. 2021; 6(1): 34-47. <https://dergipark.org.tr/en/pub/gsbdergi/issue/60701/809557>
113. Bozkaya G, Örmən M, Bilgili S, Aksit MD. D vitamini için güneşten yeterince faydalanyor muyuz. Türk Klinik Biyokimya Dergisi. 2017;15(1):24-9.

114. Saggese G, Vierucci F, Boot AM, Czech-Kowalska J, Weber G, Camargo CA Jr, et al. Vitamin D in childhood and adolescence: an expert position statement. *Eur J Pediatr*. 2015 May;174(5):565–76.
115. Akkoyun H, Bayramoğlu M, Ekin S, Çelebi F. D Vitamini ve Metabolizma İçin Önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*. 2014; 9(3): 0. <http://dx.doi.org/10.17094/avbd.05043>
116. Özkan B, Döneray H. D vitamininin iskelet sistemi dışı etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2011; 54: 99-119 . <http://www.cshd.org.tr/pdf.php?&id=422>
117. Holick MF. The vitamin D epidemic and its health consequences. *J Nutr*. 2005 Nov;135(11):2739S – 48S.
118. Meyer MB, Pike JW. Mechanistic homeostasis of vitamin D metabolism in the kidney through reciprocal modulation of Cyp27b1 and Cyp24a1 expression. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2020 Feb 1;196:105500.
119. Öngen B, Kabaroğlu C, Parıldar Z. D Vitamini'nin biyokimyasal ve laboratuvar değerlendirmesi. *Türk klinik biyokimya dergisi*. 2008;6(1):23-31. <http://www.tkb.dergisi.org/summary.php3?id=99>
120. Cutolo M, Paolino S, Sulli A, Smith V, Pizzorni C, Serio B. Vitamin D, steroid hormones, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*. 2014 May;1317:39–46.
121. Demer LL, Hsu JJ, Tintut Y. Steroid Hormone Vitamin D: Implications for Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 2018 May 25;122(11):1576–85.
122. Kongsbak M, Levring TB, Geisler C, von Essen MR. The vitamin d receptor and T cell function. *Front Immunol*. 2013 Jun 18;4:148.
123. Camperi A, Pin F, Costamagna D, Penna F, Menguina ML, Aversa Z, et al. Vitamin D and VDR in cancer cachexia and muscle regeneration. *Oncotarget*. 2017 Mar 28;8(13):21778–93.
124. Cermisoni GC, Alteri A, Corti L, Rabellotti E, Papaleo E, Viganò P, Sanchez AM. Vitamin D and Endometrium: A Systematic Review of a

Neglected Area of Research. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19(8):2320. <https://doi.org/10.3390/ijms19082320>

125. Issa LL, Leong GM, Eisman JA. Molecular mechanism of vitamin D receptor action. *Inflamm Res*. 1998 Dec;47(12):451–75.
126. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol*. 2014 Mar 20;21(3):319–29.
127. Orlov I, Rochel N, Moras D, Klaholz BP. Structure of the full human RXR/VDR nuclear receptor heterodimer complex with its DR3 target DNA. *EMBO J*. 2012 Jan 18;31(2):291–300.
128. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev*. 2016 Jan;96(1):365–408.
129. Carlberg C, Quack M, Herdick M, Bury Y, Polly P, Toell A. Central role of VDR conformations for understanding selective actions of vitamin D(3) analogues. *Steroids*. 2001 Mar;66(3-5):213–21.
130. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev*. 2005 Aug;26(5):662–87.
131. Fibla J, Caruz A. Vitamin D and HIV infection. Soluble Factors Mediating Innate Immune Responses to HIV Infection. 2010;111–44.
132. DeLuca HF, Zierold C. Mechanisms and functions of vitamin D. *Nutr Rev*. 1998 Feb;56(2 Pt 2):S4–10; discussion S 54–75.
133. Holick CN, Stanford JL, Kwon EM, Ostrander EA, Nejentsev S, Peters U. Comprehensive association analysis of the vitamin D pathway genes, VDR, CYP27B1, and CYP24A1, in prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Oct;16(10):1990–9.
134. Ingles SA, Ross RK, Yu MC, Irvine RA, La Pera G, Haile RW, et al. Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *J Natl Cancer Inst*. 1997 Jan 15;89(2):166–70.

135. Mittal RD, Manchanda PK, Bhat S, Bid HK. Association of vitamin-D receptor (Fok-I) gene polymorphism with bladder cancer in an Indian population. *BJU Int.* 2007 Apr;99(4):933–7.
136. Li C, Liu Z, Zhang Z, Strom SS, Gershenwald JE, Prieto VG, et al. Genetic variants of the vitamin D receptor gene alter risk of cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2007 Feb;127(2):276–80.
137. Wong HL, Seow A, Arakawa K, Lee HP, Yu MC, Ingles SA. Vitamin D receptor start codon polymorphism and colorectal cancer risk: effect modification by dietary calcium and fat in Singapore Chinese. *Carcinogenesis.* 2003 Jun;24(6):1091–5.
138. Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.* 2000 Oct 1;14(19):2410–34.
139. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol.* 2019 Apr;10(2):63–89.
140. Crawford ED. Epidemiology of prostate cancer. *Urology.* 2003 Dec 22;62(6 Suppl 1):3–12.
141. Ilic D, Neuberger MM, Djulbegovic M, Dahm P. Screening for prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Jan 31;(1):CD004720.
142. Ateş F, Soydan H, Şenkul T, Akyol İ, Adayener C, Baykal K. Transrektal ultrasonografi kılavuzluğunda yapılan prostat biyopsisinde anestezi şekli, hasta yaşı ve prostat hacminin ağrı üzerine etkisi. *Gülhane Tıp Dergisi* 2008; 50: 78-83
143. Culig Z, Santer FR. Androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2014 Sep;33(2-3):413–27.
144. Shafi AA, Yen AE, Weigel NL. Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. *Pharmacol Ther.* 2013 Dec;140(3):223–38.
145. Aurilio G, Cimadamore A, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Verri E, Scarpelli M, Massari F, Cheng L, Santoni M, Montironi R. Androgen Receptor Signaling Pathway in Prostate Cancer: From Genetics to Clinical Applications. *Cells.* 2020 Dec 10;9(12):2653.

146. Kosova F, Ari Z. The relationship between prostate cancer and apoptosis. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*. 2011; 2(1): 124-131.
147. Coombs GS, Bergstrom RC, Pellequer JL, Baker SI, Navre M, Smith MM, et al. Substrate specificity of prostate-specific antigen (PSA). *Chem Biol*. 1998 Sep;5(9):475–88.
148. Stenman UH, Leinonen J, Zhang WM, Finne P. Prostate-specific antigen. *Semin Cancer Biol*. 1999 Apr;9(2):83–93.
149. Pezaro C, Woo HH, Davis ID. Prostate cancer: measuring PSA. *Intern Med J*. 2014 May;44(5):433–40.
150. Lang SH, Swift SL, White H, Misso K, Kleijnen J, Quek RGW. A systematic review of the prevalence of DNA damage response gene mutations in prostate cancer. *Int J Oncol*. 2019 Sep;55(3):597–616.
151. Southey MC, Goldgar DE, Winqvist R, Pylkäs K, Couch F, Tischkowitz M, et al. PALB2, CHEK2 and ATM rare variants and cancer risk: data from COGS. *J Med Genet*. 2016 Dec;53(12):800–11.
152. Silverman RH. Implications for RNase L in prostate cancer biology. *Biochemistry*. 2003 Feb 25;42(7):1805–12.
153. Liu W, Liang SL, Liu H, Silverman R, Zhou A. Tumour suppressor function of RNase L in a mouse model. *Eur J Cancer*. 2007 Jan;43(1):202–9.
154. Partin AW, Yoo J, Carter HB, Pearson JD, Chan DW, Epstein JI, et al. The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. *J Urol*. 1993 Jul;150(1):110–4.
155. Stark JR, Perner S, Stampfer MJ, Sinnott JA, Finn S, Eisenstein AS, et al. Gleason score and lethal prostate cancer: does $3 + 4 = 4 + 3$? *J Clin Oncol*. 2009 Jul 20;27(21):3459–64.
156. Egevad L, Granfors T, Karlberg L, Bergh A, Stattin P. Prognostic value of the Gleason score in prostate cancer. *BJU Int*. 2002 Apr;89(6):538–42.

157. Bertino JR. Landmark Study: The Relation of Solar Radiation to Cancer Mortality in North America. *Cancer Res.* 2016 Jan 15;76(2):185. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3169. PMID: 26773094.
158. Çevik BA, Pirinççi E. Beslenme ve Kanseri. *Firat Tıp Dergisi.* 2017; 22(1): 1-7. Available from: http://www.firattipdergisi.com/pdf/pdf_FTD_1024.pdf
159. Schwartz GG, Hulka BS. Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer? (Hypothesis). *Anticancer Res.* 1990 Sep;10(5A):1307–11.
160. He BM, Chen R, Sun TQ, Yang Y, Zhang CL, Ren SC, et al. Prostate cancer risk prediction models in Eastern Asian populations: current status, racial difference, and future directions. *Asian J Androl.* 2020 Mar;22(2):158–61.
161. Ari M, Murat ARI. Vitamin D ve Antikanserojenik Etkileri. *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi.* 2021;5(1):131-146. <http://dx.doi.org/10.46237/amusbfd.740270>
162. Keisala T, Minasyan A, Lou YR, Zou J, Kalueff AV, Pyykkö I, et al. Premature aging in vitamin D receptor mutant mice. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009 Jul;115(3-5):91–7.
163. Mark KA, Dumas KJ, Bhaumik D, Schilling B, Davis S, Oron TR, et al. Vitamin D Promotes Protein Homeostasis and Longevity via the Stress Response Pathway Genes *skn-1*, *ire-1*, and *xbp-1*. *Cell Rep.* 2016 Oct 25;17(5):1227–37.
164. LNCaP clone FGC [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: <https://www.atcc.org/products/crl-1740>
165. 22Rv1 [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: <https://www.atcc.org/products/crl-2505>
166. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009 Apr;55(4):611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.

167. Benham AM. Endoplasmic Reticulum redox pathways: in sickness and in health. *FEBS J.* 2019 Jan;286(2):311–21.
168. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646–74.
169. Holderfield M, Deuker MM, McCormick F, McMahon M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nat Rev Cancer.* 2014 Jul;14(7):455–67.
170. Jin Y, Saatcioglu F. Targeting the Unfolded Protein Response in Hormone-Regulated Cancers. *Trends Cancer Res.* 2020 Feb;6(2):160–71.
171. Chen K, Han M, Tang M, Xie Y, Lai Y, Hu X, Zhang J, Yang J, Li H. Differential Hrd1 Expression and B-Cell Accumulation in Eosinophilic and Non-eosinophilic Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2018 Nov;10(6):698–715. doi: 10.4168/aair.2018.10.6.698.
172. Zheng X, Andruska N, Yu L, Mao C, Kim JE, Livezey M, et al. Interplay between steroid hormone activation of the unfolded protein response and nuclear receptor action. *Steroids.* 2016 Oct;114:2–6.
173. Moenner M, Pluquet O, Bouhecareilh M, Chevet E. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. *Cancer Res.* 2007 Nov 15;67(22):10631–4.
174. Haddur E, Ozkaya AB, Ak H, Aydin HH. The effect of calcitriol on endoplasmic reticulum stress response. *Biochem Cell Biol.* 2015 Jun;93(3):268–71.
175. Koromilas AE. Roles of the translation initiation factor eIF2 α serine 51 phosphorylation in cancer formation and treatment. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Jul;1849(7):871–80.
176. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature.* 1999 Jan 21;397(6716):271–4.
177. Vattam KM, Wek RC. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Aug 3;101(31):11269–74.

178. Wortel IMN, van der Meer LT, Kilberg MS, van Leeuwen FN. Surviving Stress: Modulation of ATF4-Mediated Stress Responses in Normal and Malignant Cells. *Trends Endocrinol Metab.* 2017 Nov;28(11):794–806.
179. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-Mediated Dephosphorylation of eIF2 α . *J Cell Biol.* 2001 May 28;153(5):1011–22.
180. Zhu T, Jiang X, Xin H, Zheng X, Xue X, Chen JL, et al. GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α facilitates pseudorabies virus replication by maintaining de novo protein synthesis. *Vet Res.* 2021 Dec 20;52(1):148.
181. Maguire O, Pollock C, Martin P, Owen A, Smyth T, Doherty D, et al. Regulation of CYP3A4 and CYP3A5 expression and modulation of “intracrine” metabolism of androgens in prostate cells by liganded vitamin D receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Nov 25;364(1-2):54–64.
182. Sugiyama T, Murao N, Kadowaki H, Takao K, Miyakawa T, Matsushita Y, et al. ERAD components Derlin-1 and Derlin-2 are essential for postnatal brain development and motor function. *iScience.* 2021 Jul 23;24(7):102758.
183. Perry RP, Kelley DE. Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose-response of different RNA species. *J Cell Physiol.* 1970 Oct;76(2):127–39.
184. Ennis HL, Lubin M. Cycloheximide: Aspects Of Inhibition Of Protein Synthesis In Mammalian Cells. *Science.* 1964 Dec 11;146(3650):1474–6.
185. Schneider-Poetsch T, Ju J, Eyler DE, Dang Y, Bhat S, Merrick WC, et al. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol.* 2010 Mar;6(3):209–17.

8. EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:

Adı:	Esra	Soyadı:	AYDOĞDU
Doğum yeri:	ISPARTA	Doğum tarihi:	
Uyruğu:	T.C.	Email:	

Eğitim Düzeyi:

	Mezun olduğu kurum	Bölüm/Program	Mezuniyet yılı
Yüksek Lisans	Süleyman Demirel Üniversitesi	İlaç Araştırma ve Geliştirme	2022
Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi	Moleküler Biyoloji ve Genetik	2018

İş Deneyimi:

Görevi	Kurum	Yıl
Stajyer	SDÜ Tıbbi genetik laboratuvarı	2016
Stajyer	SDÜ Tıbbi genetik laboratuvarı	2017
Araştırmacı	Atatürk Üniversitesi bitki doku kültürü laboratuvarı	2018

Yayın:

Adı	Yayın tarihi	doi
Tarantula cubensis Extract Induces Cell Death in Prostate Cancer by Promoting Autophagic Flux/ER Stress Responses and Decreased Epithelial-Mesenchymal Transition	20 Temmuz 2022	https://doi.org/10.1007/s43450-022-00279-1
HERPUD1, a member of the Endoplasmic Reticulum Protein Quality Control Mechanism, may be a Good Target for Suppressing Tumorigenesis in Breast Cancer Cells	06 Eylül 2022	10.4274/tjps.galenos.2022.71643