



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**FARKLI PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
EPİBRASSİNOLİDLE TETİKLENEN APOPTOTİK
SÜREÇTE POLİAMİNLERİN ROLLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Pınar OBAKAN

**Biyoloji Anabilim Dalı
Zooloji Programı**

Danışman

Prof.Dr. Şehnaz BOLKENT

II. Danışman

Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL

Mayıs, 2013

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**FARKLI PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
EPİBRASSİNOLİDLE TETİKLENEN APOPTOTİK
SÜREÇTE POLİAMİNLERİN ROLLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Pınar OBAKAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Zooloji Programı

Danışman
Prof.Dr. Şehnaz BOLKENT

II. Danışman
Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL

Mayıs, 2013

İSTANBUL

2602080091 Öğrenci numaralı Pınar OBAKAN tarafından hazırlanan bu çalışma 08/05/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

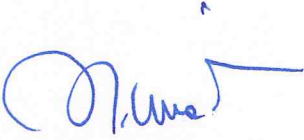
Tez Jürisi



Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Refiye Yanardağ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Meral ÜNAL
Marmara Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Ömür BULAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Elif Damla ARISAN
T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 20958 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım sırasında değerli fikirlerinden ve tecrübelerinden yararlandığım, her aşamada yol gösterici olan ve yetişmemde emeği geçen danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT ve Sayın Prof. Dr. Narçın Palavan ÜNSAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezim sırasında, başından sonuna kadar hep yanımda olan, her aşamasında görüşleri ile bana katkıda bulunan, her zaman desteğini hissettiğim Sayın Yrd. Doç. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN, Sayın Biyolog Pelin ÖZFİLİZ'e,

Hem akademik, hem özel hayatımda desteğini esirgemeyen, tüm yardımları için Sayın Araş. Gör. Ayşe KARATUĞ'a,

Tezimdeki akım sitometrisi ile ilgili çalışmalarımı, Roma "La Sapienza" Üniversitesi ve Istituto Italiano di Sanita'nın olanaklardan yararlanarak gerçekleştirmemi sağlayan ve değerli fikirleri ile bana katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Enzo AGOSTINELLI'ye ve büyük bir sabırla bana tekniği öğreten Sayın Dr. Annarica CALCABRINI'ye,

Tezim süresince de bana her anlamda destek olan ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili anneme, babama ve kardeşime, bu tezin hazırlanması sırasında her zaman desteklerini hissettiğim sevgili arkadaşlarıma teşekkür ederim. Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma ve çalışmamın uygulama kısmını destekleyen İstanbul Kültür Üniversitesi ve İstanbul Üniversitesi'ne teşekkürü borç bilirim.

Mayıs, 2013

Pınar OBAKAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iii
TABLO LİSTESİ	iv
SEMBOL LİSTESİ	v
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	5
2.1. PROSTAT BEZİ	5
2.2. PROSTAT KANSERİ	7
2.2.1. Prostat Kanseri Gelişimini Etkileyen Faktörler.....	7
2.2.2. Prostat Kanseri Oluşumunun Moleküler Mekanizmaları	8
2.2.1.1. Androjenlere Bağımlı Prostat Kanseri Gelişimi	8
2.2.1.1. Androjenlerden Bağımsız Prostat Kanseri Gelişimi	12
2.3. PROSTAT KANSERİ EVRELERİ.....	19
2.4. PROSTAT KANSERİ TEDAVİ YÖNTEMLERİ	21
2.4.1. Prostat Kanseri ve Kemoterapi.....	22
2.5. POLİAMİNLER.....	23
2.5.1. Poliaminlerin Yapı ve Özellikleri.....	24
2.5.2. Poliamin Biyosentezi.....	25
2.5.2.1. Ornitin Dekarboksilaz Yolağı	26
2.5.3.2. S-Adenozil metiyonin Dekarboksilaz Yolağı	30

2.3.4. Poliamin Katabolizması	31
2.3.4.1. Spermidin-Spermin Asetil Transferaz	32
2.3.4.2. Poliamin Oksidaz	33
2.3.4.3. Spermin Oksidaz	34
2.3.5. Poliamin Taşınması	34
2.3.2. Poliaminlerin İşlevleri	36
2.3.2.1. Gen Anlatımındaki Fonksiyonları	36
2.3.2.2. Protein Sentezindeki Fonksiyonları	37
2.3.2.3. Hücre Çoğalmasındaki Fonksiyonları	38
2.3.6. Poliamin Homeostazı ve Prostat Kanseri	39
2.4. APOPTOZ	41
2.4.1. Apoptozun Moleküler Mekanizması.....	43
2.4.1.1. Kaspazlar	44
2.4.1.2. Bcl-2 Ailesi.....	45
2.4.2. Apoptoz Tipleri.....	47
2.4.2.1. İç Yolak	47
2.4.2.2. Dış Yolak.....	49
2.4.3. p53 ve apoptoz	51
2.5. BRASSİNOSTEROİDLER.....	53
2.5.1. Brassinosteroidlerin Yapı ve Özellikleri.....	53
2.5.2. Brassinosteroidlerin Biyosentezi.....	55
2.5.3. Brassinosteroidlerin Hücresel İşlevleri.....	57
2.5.4. Brassinosteroidlerin Türevleri.....	59
2.5.4.1. Epibrassinolid	61
2.5.4.2 Epibrassinolid'in Kansere Hücresindeki Etkileri	62
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	64
3.1. KULLANILAN MALZEMELER	64
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	64
3.1.2. Hücre Kültürü Donanımları	64
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar	64
3.1.4. Kullanılan Moleküler Biyoloji Kitleri.....	64

3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ, HÜCRE CANLILIĞI VE SAĞKALIM TAYİNİ	66
3.2.1. Hücrelerin Yetiştirilmesi.....	66
3.2.2. Hücrelerin Kaldırılması, Sayımı ve Pasajlanması.....	67
3.2.3. Hücre Canlılığı Tayini.....	67
3.2.4. Hücre Sağkalım Tayini.....	68
3.2.5. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi.....	68
3.3. MİKROSKOBİK YÖNTEMLER	69
3.3.1. Işık Mikroskobu	69
3.3.2. Floresan Mikroskobu	69
3.3.2.1. Propidyum İyodür (PI) Boyama.....	69
3.3.2.2. 3,3'-Diheksiloksakarboxianin İyodür (DiOC6) Boyama	69
3.3.2.3. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama.....	69
3.3.2.4. 2',7'-diklorfloresin-diasetat (DCFH-DA) Boyama	70
3.4. FLOROMETRİK YÖNTEM.....	70
3.5. ELİZA YÖNTEMİ.....	71
3.5.1. Hücrelerin Hazırlanması.....	71
3.5.2. ELİZA yöntemi.....	72
3.6. İMMUNOBLOTLAMA	72
3.6.1. Total Protein İzolasyonu	72
3.6.2. Sitoplazmik ve Mitokondriyal Protein İzolasyonu	73
3.6.3. Sitoplazmik ve Nuklear Protein İzolasyonu	73
3.6.4. Bradford Protein Miktar Tayini.....	74
3.6.5. Proteinlerin SDS-PAGE'de Yürütülmesi	74
3.6.6. Membrana Transfer ve bloklama	74
3.6.7. Primer ve Sekonder Antikor İşaretlemeleleri	75
3.6.8. Bantların Görüntülenmesi	75
3.7. AKIM SİTOMETRİSİ.....	76
3.7.1. Hücrelerin Hazırlanması.....	76
3.7.2. Apoptotik Hücre Ölümünün Anneksin V ve Propidyum İyodür Boyaması ile Akım Sitometrisinde Tayini.....	76

3.7.3. Hücre Döngüsünün Akım Sitometrisi Kullanılarak İncelenmesi	77
3.8. POLİAMİN MİKTARLARININ YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMOTOGRAFİSİ (HPLC) İLE TAYİNİ.....	77
3.8.1. Hücrelerin Hazırlanması.....	77
3.8.2. Benzoilasyon İşlemi	77
3.8.3. Poliamin Standartlarının Hazırlanması	78
3.8.4. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizi	78
3.9. SİRNA YÖNTEMİ İLE GEN SUSTURULMASI	78
3.9.1. Hücrelerin Hazırlanması.....	78
3.9.2. siRNA Transfeksiyonu	79
3.10. KANTİTATİF EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU.....	79
3.10.1. Hücrelerin Hazırlanması.....	79
3.10.2. RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini.....	80
3.10.3. cDNA Sentezi	81
3.10.4. PCR Amplifikasyonu.....	81
3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	83
4. BULGULAR.....	84
4.1. EPİBRASSİNOLİD'İN LNCAP VE DU145 HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ	84
4.2. EPİBRASSİNOLİD'İN LNCAP VE DU145 HÜCRE HATLARINDA APOPTOTİK ETKİSİ	86
4.3. EPİBRASSİNOLİD'İN LNCAP VE DU145 HÜCRE HATLARINDA KASPAZA BAĞIMLI APOPTOZU İNDÜKLEMESİ	91
4.4. LNCAP VE DU145 HÜCRE HATLARINDA EPİBRASSİNOLİD UYGULAMASI SONRASI HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN İNCELENMESİ.....	94
4.5. LNCAP VE DU145 HÜCRE HATLARINDA EPİBRASSİNOLİDLE TETİKLENEN APOPTOZDA P53'ÜN ROLÜ.....	95
4.6. EPİBRASSİNOLİD UYGULAMASI SONRASI HÜCRE İÇİ POLİAMİN MİKTARLARININ SAPTANMASI.....	97

4.7. EPİBRASSİNOLİD'İN POLİAMİN METABOLİK ENZİMLERİNE VE ROS ÜRETİMİNE ETKİSİ	98
4.8. POLİAMİN KATABOLİZMASININ EPİBRASSİNOLİD İLE TETİKLENEN APOPTOZDAKİ ROLÜ	102
4.9. SSAT ANLATIMININ SUSTURULMASININ EPİBRASSİNOLİD İLE TETİKLENEN APOPTOZDAKİ ROLÜ	104
4.10. PAO ANLATIMININ SUSTURULMASININ EPİBRASSİNOLİD İLE TETİKLENEN APOPTOZDAKİ ROLÜ	105
4.11. SPERMİDİN VE SPERMİNİN, EBR İLE TETİKLENEN APOPTOTİK ÖLÜMDEKİ ROLLERİ.....	108
4.12. ANDROJEN RESEPTÖRÜNÜN EBR İLE TETİKLENEN APOPTOTİK ÖLÜMDEKİ ROLLERİ.....	113
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	116
KAYNAKLAR.....	132
EKLER	164
ÖZGEÇMİŞ.....	170

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1. Erkek genital sistemi	5
Şekil 2. 2. Prostat bezinin yapısı.	6
Şekil 2. 3. Androjen reseptörüne bağımlı prostat kanserinin moleküler mekanizması	11
Şekil 2. 4. Büyüme hormonları ile prostat kanseri gelişiminin mekanizması	15
Şekil 2. 5. Farklı faktörlere bağı prostat kanseri gelişimi	17
Şekil 2. 6. Prostat kanseri evreleri (A-B-C-D Sistemi)	19
Şekil 2. 7. Poliaminlerin kimyasal yapıları	24
Şekil 2. 8. Poliamin biyosentez yolları	26
Şekil 2. 9. Ornitin dekarboksilazın, ornitin dekarboksilaz antizim ve antizim inhibitörü ile düzenlenmesi.	30
Şekil 2. 10. Poliamin katabolizma yolağı.	31
Şekil 2. 11. Poliaminlerin hücrede taşınması.	36
Şekil 2. 12. Memelilerde Bcl-2 ailesi üyeleri	46
Şekil 2. 13. Apoptotik iç yolağın moleküler mekanizması.	49
Şekil 2. 14. Apoptoz dış yolağının moleküler mekanizması	51
Şekil 2. 15. p53 ve apoptoz ilişkisinin moleküler mekanizması.	52
Şekil 2. 16. Brassinosteroidlerin sentezi.	56
Şekil 2. 17. Bitki hücresinde brassinosteroid sinyal mekanizması	59
Şekil 2. 18. Bazı doğal brassinosteroidlerin kimyasal yapıları.	60
Şekil 4. 1. LNCaP ve DU145 hücre hatlarında EBR'nin dozuna bağı olarak hücre canlılığının azalması. * p< 0,05, ** p< 0,01. K:Kontrol.	84
Şekil 4. 2. LNCaP ve DU145 hücrelerinde, 25 µM EBR uygulaması ile birlikte zamana bağı olarak hücre canlılığı kaybı. ** p< 0,01. K:Kontrol.	85

Şekil 4. 3. 25 µM EBR'nin LNCaP ve DU145 hücre sağkalımını azaltması. *** p< 0,001. K: Kontrol.	85
Şekil 4. 4. EBR uygulamasının LNCaP ve DU145 prostat kanseri hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişim (100X, 400X büyütme). K:Kontrol.	86
Şekil 4. 5. DU145 hücrelerinde artan dozlarda EBR uygulaması sonrası mitokondri membran potansiyeli kaybı. ** p<0.01, ## p<0,01, *** p<0,001, ### p<0,001. K:Kontrol.	87
Şekil 4. 6. LNCaP ve DU145 hücrelerine EBR uygulaması sonrası hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli kaybı. K:Kontrol.....	87
Şekil 4. 7. LNCaP ve DU145 hücrelerine EBR uygulamasının DNA kırıkları oluşumuna etkileri. *** p< 0,001, ### p< 0,001. K:Kontrol.	88
Şekil 4. 8. EBR uygulaması ile, LNCaP ve DU145 hücrelerinde gözlemlenen erken ve geç evre apoptotik hücreler.....	89
Şekil 4. 9. EBR uygulaması sonrası, LNCaP hücrelerinde hücre döngüsü fazları ve subG1 fazındaki hücre populasyonlarındaki değişim. K: Kontrol.	90
Şekil 4. 10. Zamana bağlı EBR uygulaması sonrası, DU145 hücrelerinde hücre döngüsü fazları ve subG1 fazı populasyonları. K: Kontrol.....	90
Şekil 4. 11. EBR uygulanmış LNCaP ve DU145 hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli kaybının gözlemlenmesi. ### p< 0,001, *** p< 0,001.	91
Şekil 4. 12. EBR uygulaması sonrası LNCaP ve DU145 hücrelerinde sitokrom c'nin sitoplazmaya göçü. β-aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.	91
Şekil 4. 14. EBR'nin kaspazlara bağımlı apoptozu indüklemesinin kaspaz inhibitörleri varlığında gösterimi. * p< 0,05, ** p<0,01, ## p< 0,01, ^{xx} p<0,01.	93
Şekil 4. 15. EBR'nin hücre döngüsünü düzenleyen siklinler ve sikline bağlı kinazların anlatımlarına etkisi. β-aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.	94
Şekil 4. 16. EBR uygulamasının sonrası p53 ve Mdm2 protein ifadelerinine etkisi. β-tubulin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.....	95

Şekil 4. 17. LNCaP ve DU145 hücrelerinde, p53 inhibitörü pifithrin α ve EBR eş zamanlı uygulamasının PARP ve Puma protein ifadelerine etkisi. β -aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.	96
Şekil 4. 18. LNCaP ve DU145 hücrelerinde Mdm2 inhibitörü Nutlin-3 ve EBR eş zamanlı uygulamasının PARP proteini kesilimine etkisi. β -aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.	96
Şekil 4. 19. Pifithrin α veya Nutlin-3 ile eş zamanlı EBR uygulamasının LNCaP ve DU145 DNA kırıklarının oluşumuna etkisi. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$	97
Şekil 4. 20. EBR'nin LNCaP ve DU145 hücreiçi poliamin havuzuna etkisi. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$	98
Şekil 4. 21. EBR uygulamasının LNCaP ve DU145 hücrelerinde ODC, OAZ ve AZI protein ifadelerine etkisi. β -aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.	98
Şekil 4. 22. EBR uygulamasının LNCaP ve DU145 hücrelerinde SSAT, SMO ve PAO protein ifadelerine etkisi. β -aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.	99
Şekil 4. 23. LNCaP ve DU145 hücre hatlarında EBR uygulaması sonrası SSAT anlatımı. GAPDH internal standart olarak kullanılmıştır. *** $p < 0,001$	99
Şekil 4. 24. LNCaP ve DU145 hücre hatlarında, EBR uygulamasının SSAT ve PAO anlatımlarına etkisi. GAPDH internal standart olarak kullanılmıştır. *** $p < 0,001$, ### $p < 0,001$	100
Şekil 4. 25. PAO inhibitörü MDL 72,527'nin EBR ile tetiklenen reaktif oksijen türlerinin üretimini baskılaması.	101
Şekil 4. 26. NAC'ın EBR ile tetiklenen hücre canlılığı kaybına etkisi. ** $p < 0,01$	101
Şekil 4. 27. NAC'ın EBR ile tetiklenen mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisi. *** $p < 0,001$	102
Şekil 4. 28. EBR ile eş zamanlı MDL 72,527 uygulamasının EBR ile tetiklenen hücre canlılığı kaybı üzerine etkisi. ** $p < 0,01$, ns: anlamlı değil.	103
Şekil 4. 29. MDL 72,527 ve EBR eş zamanlı uygulamasının DNA kırıkları oluşumu üzerine etkisi. ** $p < 0,01$, ns: anlamlı değil.	103

Şekil 4. 30. MDL 72,527 ve EBR eş zamanlı uygulamasının EBR ile tetiklenen apoptoza etkisi. GAPDH yükleme standardı olarak kullanılmıştır.	104
Şekil 4. 31. SSAT siRNA ile muamele edilen DU145 ve LNCaP hücrelerinde, 24 saat süre ile EBR uygulaması sonrası SSAT anlatımındaki azalma. * $p < 0,05$	104
Şekil 4. 32. SSAT siRNA uygulamasının EBR ile tetiklenen hücre canlılığının kaybına etkisi. *** $p < 0,001$	105
Şekil 4. 33. SSAT siRNA uygulamasının, EBR ile tetiklenen DNA kırıkları oluşumuna etkisi. NS: Negatif siRNA. * $p < 0,05$	105
Şekil 4. 34. PAO siRNA ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde PAO anlatımındaki azalma. * $p < 0,05$	106
Şekil 4. 35. LNCaP hücrelerinde, PAO siRNA uygulaması ile PAO anlatımının susturulması. β -aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.	106
Şekil 4. 36. PAO siRNA uygulamasının EBR ile tetiklenen DNA kırıkları oluşumuna etkisi. NS: negatif siRNA. ** $p < 0,01$	107
Şekil 4. 37. PAO siRNA uygulamasının EBR ile tetiklenen ROS üretimine etkisi. *** $p < 0,001$	107
Şekil 4. 38. Spd veya Spm ile EBR'nin eş zamanlı uygulamasının LNCaP ve DU145 hücre canlılığının kaybına etkisi. ** $p < 0,01$, ## $p < 0,01$	109
Şekil 4. 39. LNCaP hücrelerinde Spd veya Spm ile EBR eş zamanlı uygulamasının DNA kırıkları oluşumuna, mitokondri membran potansiyeli kaybına ve hücre ölümüne etkileri. K: Kontrol.	110
Şekil 4. 40. LNCaP ve DU145 hücrelerinde Spd veya Spm ile EBR eş zamanlı uygulamasının DNA kırıkları oluşumuna, mitokondri membran potansiyeli kaybına ve hücre ölümüne etkileri. K: Kontrol.	111
Şekil 4. 41. Spd veya Spm ile EBR eş zamanlı uygulamasının EBR ile tetiklenen ROS üretimine etkisi.	112
Şekil 4. 42. LNCaP ve DU145 hücrelerinde Spd veya Spm ile EBR eş zamanlı uygulamasının PARP kesilimine etkileri. β -aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.	112

Şekil 4. 43. LNCaP ve DU145 hücrelerinde EBR uygulamasının androjen reseptörü (AR), Isı Şok Proteini 90 (HSP90), Prostata Özgü Antijen (PSA) anlatımlarına etkileri. β -aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.	113
Şekil 4. 44. LNCaP hücre hattında AR protein ifadesi ve nukleustan sitoplazmaya göçünün EBR uygulaması sonrası azalması. GAPDH ve histon H3 yükleme standartları olarak kullanılmıştır. S: Sitoplazma, N:Nukleus.....	114
Şekil 4. 45. Androjen reseptörüne özgü siRNA dozunun hücre canlılığına etkisi ve immunoblotlama yöntemi ile belirlenmesi. β -aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır. NS: Negatif siRNA, AR siRNA: Androjen Reseptörüne özgü siRNA....	114
Şekil 4. 46. AR'nin, EBR ile tetiklenen apoptotik ölümdaki rolü. AR siRNA: Androjen Reseptörüne özgü siRNA.	115
Şekil 5. 1. EBR'nin, LNCaP ve DU145 hücrelerindeki apoptotik etki mekanizması	129
Şekil 5. 2. EBR'nin, LNCaP ve DU145 hücrelerinde poliamin metabolizması ile olan ilişkisi	130

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Prostat bezinin anatomik özellikleri.....	6
Tablo 2.2. Prostat Kanseri TNM Evreleme Sistemi.....	20

SEMBOL LİSTESİ

5' UTR:	5' translasyonu gerçekleşmeyen bölge
5-FU:	5-fluorurasil
AdoMet:	S-adenozilmetionin
AIF:	Apoptoz indükleyici faktör
AP-1:	Aktivatör protein-1
Apaf-1:	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
APS:	Amonyum persülfat
AR:	Androjen reseptörü
ARA:	Androjen reseptör aktivatörü
AZI:	Antizim inhibitörü
BAG1:	Bcl-2 assosiye gen
BAK1:	BRI1-uyumlu reseptör kinaz
Bcl-2:	B-hücre lenfoma 2
BENSpm:	Bis(etil)norspermin
BES1:	BRI baskılayıcı 1
BESpm:	N1,N12-bis(etil)spermin
BH:	Bcl-2 homoloji bölgeleri
BIS:	1,12-diaziridinil 4,9-diazaodekan
BPH:	Benign prostat hiperplazisi
BR:	Brassinosteroid
BRI1:	brassinosteroid duyarlı 1
BSA:	Sığır serum albumin
BZR1:	Brassinazol-direnci 1
<i>C.elegans:</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CDK:	Sikline bağımlı kinaz
CHENSpm:	Sikloheptilmetil-diazaodekan
CO₂:	Karbon dioksit
CPENSpm:	N1-etil-N11-[(siklopropil)-metil]-4,8-diaza-andekan
CT:	Threshold cycle
<i>D. melanogaster:</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
dcAdoMet:	Dekarboksile AdoMet
DCFH-DA:	2',7'-dichloroflorescein-diasetat
DENSpm:	Dietilnorspermin
DFMO:	Difluorometilornitin
DHT:	Dihidrotestosteron

DISC:	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DiOC6:	3, 3'-diheksiloksakarbosianin iyodür
DMSO:	Dimetilsulfoksit
DR3:	Ölüm reseptörü 3
DTT:	Kikloro difenol trikloroethan
EBR:	Epibrassinolid
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
EGF:	Epidermal büyüme faktörü
eIF₃:	Ökaryotik translayon başlatma faktörü 3
eIF-5A:	Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 5A
ER:	Östrojen reseptörü
FADD:	Fas ilişkili ölüm domeni
FLIP:	FLICE inhibitör proteini
FMK:	Fluorometilketon
GnRH:	Gonadotropin salgılayıcı hormon
GTF2F2:	Genel transkripsiyon faktörü 2F polipeptit 2
H₂O₂:	Hidrojen peroksit
HDAC:	Histon deasetil transferaz
HER-2/neu:	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2
HIV:	İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü
HPC1:	Kalıtsal prostat kanseri 1
HPLC:	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
HSP:	Isı şok proteini
IAP:	Apoptoz inhibitörü protein
IGF-1:	İnsulin benzeri büyüme faktörü-1
IL-6:	İnterlökin-6
kDa:	KiloDalton
KGF:	Keratinosit büyüme faktörü
LH:	Lüteinizan hormon
LHRH:	Luteinleştirici hormon salgılama hormonu
MAPK:	Mitojenle aktiveleştirilmiş protein kinaz
MDL 72,527:	N ¹ , N ⁴ -bis (butadenil)-1,4-diaminobutan
MGBG :	Metilglioksal-bis(guanilhidrazon)
MPP+:	metil-4-fenilpiridinium
MTT:	Metiltiazol difeniltetrazolyum bromür
NAC:	N-asetil sistein
NCOA1:	Nuklear reseptör koaktivator 1
NFκB:	Nuklear faktör kappa B
Nrf-2:	NF-E2 ile ilişkili transkripsiyon faktörü-2
NSAID:	Steroid kökenli olmayan anti-inflamatuar ajan
OAZ:	ODC antizim
ODC:	Ornitin dekarboksilaz
ORF:	Açık okuma alanı
PA:	Poliamin

PAO:	Poliamin oksidaz
PARP:	Poli ADP riboz polimeraz
PBS:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PI:	Propidyum iyodür
PI3K:	Fosfotidilinositol-3 fosfat
PIN:	Prostatik intraepitelial neoplasia
PKa:	Prostat Kanseri
PMF-1:	PA-değiştirici faktör 1
PPARγ:	Peroksizom proliferatörle aktive olan reseptör
PRE:	PA cevap elementi
PSA:	Prostata özgü antijen
PSMA:	Prostat spesifik membran antijeni
PTEN:	Tümör baskılayıcı protein olan fosfataz ve tensin homolog
Put:	Putresin
PVDF:	Poliviniliden florid
qRT-PCR:	Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
Rb:	Retinoblastoma
Rubisco:	Ribuloz-1,5-bifosforat karboksilaz/oksijenaz
SAMDC:	S-adenozilmetionin dekarboksilaz
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE:	SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SMAC:	İkincil mitokondri kökenli aktivatör
SMO:	Spermin oksidaz
Spd:	Spermidin
Spm:	Spermin
SSAT:	Spermidin, spermin asetil transferaz
TBS:	Tris tamponlu tuz çözeltisi
TEMED:	Tetrametiletildiamin
TNF:	Tümör nekrozis faktör
TRAIL:	TNF ile ilişkisi apoptoz indükleyici ligand reseptör
VEGF:	Vaskular endotelial büyüme faktörü
XET:	Ksiloglukan endotransferaz
z-LEHD-FMK:	Kaspaz-9 inhibitörü
z-VAD-FMK:	Genel kaspaz inhibitörü
$\Delta\psi_m$:	Mitokondri membran potansiyeli

ÖZET

FARKLI PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATLARINDA EPIBRASSİNOLİDLE TETİKLENEN APOPTOTİK SÜREÇTE POLİAMİNLERİN ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dünyada prostat kanseri, erkeklerde kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Prostat bezi tüm insan vücudunda en fazla poliamin konsantrasyonunun bulunduğu dokudur. Poliaminler (PA'lar) prostat kanserinde kan dolaşımında artan miktarlarda bulunmakta ve bu nedenle prostat kanseri gelişiminde biyobelirteç olarak belirtilmektedirler. PA'lar, amin türevli organik bileşenler olup, hücre çoğalması ve büyümesindeki rolleri ile bilinmektedirler. Bu nedenle tümör hücrelerinde poliamin miktarının azaltılması son zamanlarda terapötik yaklaşımlardan biri olmuştur. Birçok kemoterapötik maddenin poliamin katabolizmasını tetiklediği ve reaktif oksijen türlerinin yan ürün olarak açığa çıkmasını sağladığı, aynı zamanda hücre içi poliamin seviyelerini düşürdüğü ve apoptoza neden olduğu çeşitli tümör modellerinde gösterilmiştir. Epibrassinolid (EBR), bitki büyüme düzenleyicileri olan brassinosteroidlerinin biyolojik olarak aktif bir üyesi olup, son yıllarda tümör oluşturmeyen hücrelere etki etmeksizin, farklı kanser hücrelerinde apoptozu tetikleyen bir madde olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

Bu çalışma kapsamında EBR'nin apoptotik etkisi androjen reseptör (AR) pozitif LNCaP ve AR negatif DU145 prostat kanseri hücre hatlarında, hücre canlılığının tayini, mitokondri membran potansiyeli kaybı, DNA kırıkları oluşumu parametreleri ile incelenmiş, aynı zamanda kaspaz ve Bcl-2 protein aileleri üyelerindeki ifade değişimleri immunoblotlama yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. EBR uygulaması ile hücre döngüsündeki değişimler akım sitometrisi ve immunoblotlama yöntemleri ile belirlenmiştir. Poliamin biyosentez ve katabolik enzimlerinde EBR ile tetiklenen değişimler immunoblotlama ve eş zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri ile ortaya koyulmuştur. Bunun yanı sıra, EBR ile tetiklenen apoptotik süreçte poliaminlerin ve androjen reseptörünün rolleri ise katabolik enzimlere ve androjen reseptörüne özgü siRNA'lar ile gen sessizleştirilmesi gerçekleştirildikten sonra hücre canlılığı tayini ve DNA kırıklarının ELİZA yöntemi ile incelenmesi sonucu ortaya koyulmuştur.

EBR uygulaması her iki hücre hattında da hücre canlılığında kayba, mitokondri ile ilişkili, kaspaz-bağımlı apoptozun tetiklenmesine neden olmuştur. Aynı zamanda prostat

kanseri hücrelerinde, EBR hücre döngüsünü düzenleyen proteinlerin anlatımlarında değişiklikler yaratarak hücre döngüsünün durmasına neden olmuştur. Bunun yanı sıra, LNCaP hücrelerinin, DU145 hücrelerine oranla EBR'ye karşı daha duyarlı oldukları saptanmıştır. Bu farklı etkinin nedeni EBR'nin PA biyosentetik ve katabolik enzimlerinin EBR ile etkileşimi kapsamında araştırılmış ve LNCaP hücrelerinde poliamin metabolik enzimlerinin anlatımlarındaki değişimlerin EBR ile tetiklenen apoptozda önemli olduğu saptanmıştır. Poliamin katabolik enzimlerinin aktivitesini hedef alan inhibitör varlığında veya söz konusu enzimlerin anlatımlarının geçici olarak susturulması ile LNCaP hücrelerinde EBR ile tetiklenen apoptozun engellendiği saptanmıştır. EBR'nin steroid türevli bir molekül olması dolayısı ile AR ile olan ilişkisi, her iki hücre hattının AR bakımından farklı genomik özelliğinden yararlanılarak, AR susturulması yöntemi ile incelenmiş ve AR'nin EBR ile tetiklenen apoptozda fonksiyonel olduğu saptanmıştır. Tüm bu sonuçlar, EBR'nin terapötik etkinliğinin belirlenmesinde bilgi verme ve diğer moleküler yolaklarla olan ilişkinin aydınlatılmasında bir başlangıç niteliği taşımaktadır.

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE ROLES OF POLYAMINES IN EPIBRASINOLIDE-INDUCED APOPTOSIS IN VARIOUS PROSTATE CANCER CELL LINES

Prostate cancer is the second leading cause of cancer-related death among men, in the worldwide. Prostate gland has the highest polyamine concentrations of any tissue in human body. Their levels were found increased in blood flow during prostate cancer, therefore they have been indicated as biomarkers for prostate cancer development. Polyamines (PAs), amine-derived organic compounds, are known for their role in cell proliferation and growth. Therefore reducing polyamine contents in tumor cells is one of the recent therapeutic approaches. Recently many chemotherapeutic agents have been demonstrated to induce polyamine catabolism with the generation of reactive oxygen species (ROS) as by-products, deplete intracellular PA levels and cause apoptosis in different tumor models. Epibrassinolide (EBR) a biologically active member of the brassinosteroids, plant growth regulator family, has been recently indicated as an apoptotic inducer in various cancer cells without affecting non-tumor cell growth. However, the precise molecular mechanism of EBR is not entirely understood.

In this study, the apoptotic effect of EBR was investigated in androgen receptor (AR) positive LNCaP and AR negative DU145 prostate cancer cell lines by relative cell viability, mitochondria membrane potential loss determinations and the formation of DNA fragmentation. In addition, the changes in the expression profiles of caspases and Bcl-2 family members were detected by immunoblotting method. The cell cycle profile changes in response to EBR treatment were investigated by fluorescence-activated cell sorter and immunoblotting methods. The polyamine biosynthetic catabolic enzymes alterations following EBR treatment were determined by immunoblotting quantitative real-time polymerase chain reaction methods. Additionally, the roles of polyamines and AR in EBR-induced apoptosis were shown by cell viability determination and DNA fragmentation profiles by ELISA method after the gene silencing procedure using specific siRNAs.

We aimed to determine the potential apoptotic effect of EBR related with PA metabolism in androgen-dependent LNCaP, androgen-independent DU145 prostate cancer cells in

this study. EBR treatment induced cell viability loss, mitochondria-mediated and caspase-dependent apoptosis in both prostate cancer cell lines. EBR also affected the expression levels of cell cycle regulatory proteins and caused cell cycle arrest in prostate cancer cells. However, LNCaP cells were found more sensitive to EBR than DU145 cells. The reason of the different responses against EBR was investigated by targeting polyamine biosynthetic and catabolic enzymes. We concluded that the changes of protein expression levels of polyamine metabolic enzymes are critical in EBR-induced apoptosis in LNCaP cells.

We determined that in the presence of polyamine catabolic enzymes inhibitor or siRNAs, the apoptotic response against EBR was prevented in LNCaP prostate cancer cells. Since EBR is a steroid-derived molecule, its ability to induce apoptosis in relation with the androgen receptor was investigated due to the different genomic characterization of two cell lines in terms of active AR status. AR silencing method showed that AR is functional in EBR-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cell line. All these results highlighted the therapeutic efficiency of EBR as well as constituted an introduction to enlight the relation of EBR with other molecular pathways.

1. GİRİŞ

Prostat kanseri (PKa) dünyada kırk yaş üzeri erkeklerde en çok rastlanan kanser türlerinden birisidir. PKa gelişiminin ana nedenlerinden biri prostat bezinin büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan hormonlar olan androjenlerdir. Androjenler, hücre içi reseptörleri ile etkileşime girerek hücre çoğalmasını tetiklemektedirler [1]. Bu uyarının devamlı bir şekilde alınması prostat hücrelerinde kanser gelişimi tetiklemektedir. Androjenler dışında ırk, diyet ve enfeksiyonlar PKa gelişimini tetikleyen faktörlerdendir. Bu faktörlerin dışında özellikle metastatik PKa vakalarında androjenlerden bağımsız gelişim gözlenmektedir. Androjen reseptöründeki mutasyonlar, steroid türevli başka hormonlarla veya büyüme faktörleri ile hücre çoğalmasının tetiklenmesi, androjenlerden bağımsız PKa gelişimini sağlamaktadır [2]. Metastatik PKa vakalarında ölüm oranı yüksektir [3]. Bu nedenle tedaviye yönelik olarak yeni hedefler bulunmaya ve bu hedeflerin moleküler mekanizması aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

Hücrelerin metabolik düzenlenmesinde işlevsel rolleri olan amin türevleri poliaminler (PA'lar) [putresin (Put), spermidin (Spd), spermin (Spm)], birçok kanser türünde artan biyosentezleri ile kanser tetikleyicisi olarak gösterilmişlerdir [4]. DNA'nın stabilizasyonu, hücre devrinin kontrolü ve hücre bölünmesi gibi önemli hücre olaylarında görev alan PA'ların kanser belirtici olma potansiyeli taşıdıkları ortaya konulmuştur. [5]. PA biyosentez enzimi olan ornitin dekarboksilaz (ODC) bir proto-onkogen olan c-myc ile birlikte çalışarak normal hücrelerin transformasyonunda rol oynamakta ve kanserli hücrelerde PA biyosentezini artırmaktadır [6]. Aynı zamanda kanser hücrelerinde artan biyosentez aktivitesi ile beraber katabolik enzimlerin de aktivitesinde azalma ve üretilen PA'ların hücre içinde yıkılımı ya da hücre dışına atılımının engellendiği tespit edilmiştir. Normal koşullar altında PA biyosentezi ve katabolizması hücre homeostasını sağlamak üzere dengededir, fazla PA üretimi

engellenerek sabit tutulmaktadır, aksi durum hücrelerin sürekli olarak hücre devrinde kalmalarını tetikler. PA biyosentezine ket vuran maddeler, PA seviyelerinin düşmesine neden oldukları gibi aynı zamanda kanser hücrelerinde apoptotik mekanizmayı da tetiklemektedir. Son yıllarda PA'ları hedef alan antikanser stratejileri arasında katabolik yolda görev alan enzimlerin aktivitelerinin artırılması yer almaktadır [7, 8]. PA katabolizması 3 farklı enzimle kontrol edilmektedir. Spermidin, spermin asetil transferaz (SSAT), PA'ları asetilleyerek, poliamin oksidaz (PAO), asetile poliaminleri oksitleyerek, spermin oksidaz (SMO) ise Spm'yi doğrudan oksitleyerek bir önceki formlarına dönüştürür ya da hücre dışına atılımlarını sağlayarak etkili olmaktadır. Katabolik yoldaki enzimlerin aktivasyonları sırasında hücre için yüksek derecede toksisite meydana getiren hidrojen peroksit ve aldehit türevleri gibi yan ürünler açığa çıkmaktadır. Hidrojen peroksitin reaktif oksijen türlerinin yüksek PA katabolizma düzeyleri ile uyumluluk gösteren DNA-hasarlı değişimlerde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Hücre içinde artan katabolik aktiviteyle birlikte azalan PA miktarının hücrelerde bölünmeye ket vurduğu ve açığa çıkan hidrojen peroksit gibi toksik ajanlarla apoptozun teşvik edildiği gösterilmiştir [9, 10]. Son yıllarda PA katabolik enzimlerinden SMO'nun hidrojen peroksit üretiminde önemli rol oynadığı öne sürülmüştür [11]. PA katabolik enzimlerinin aktivasyonunu hedef alan ajanlar arasında klinikte kullanılan platin türevli ilaçların ya da PA analoglarının bulunduğu gözlemlenmiştir [7, 12]. Kanserli dokular sağlıklı dokulara oranla daha fazla miktarda PA içerirler ve bu nedenle PA biyosentezi inhibitörleri, tümör büyümesini ve metastazı engelleme açısından kayda değer bir potansiyele sahiptir [13]. Bu nedenle, son yıllarda çeşitli kanser tiplerinde poliamin metabolizmasının terapötik bir hedef olabilirliği araştırılmaya başlanmıştır. Özellikle PKa'nın ilerlemesi ile ilgili ilişkilendirilen PA'lar, insan vücudunda en fazla prostat bezinde bulunmaktadır [14].

Geliştirilen kemoterapötik ajanlarda rastlanan en büyük sorun hücrelerin ilaca cevapsızlık ya da direnç mekanizması geliştirmeleridir. Bu bağlamda artan ölüm oranları da bulguyu destekler niteliktedir. Hücre içindeki moleküler hedefleri iyi belirlenmiş yeni ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. İlk defa Malikova ve diğ. [15] tarafından anti-kanser olarak tanımlanan epibrassinolid (EBR) bu ajanlara bir örnektir.

EBR, bitki büyüme düzenleyicileri olan brassinosteroid ailesinin bir üyesidir. Brassinosteroidlerin bitki metabolizmalarındaki rolleri halen araştırılmaktadır. Başlıca etkileri arasında hormonal dengenin sağlanması, nükleik asit ve protein sentezinin aktive edilmesi, enzim aktivitesinin düzenlenmesi, büyümenin indüklenmesi, meyvelerin büyüklerinin ve sayısının artırılması, stres ve hastalık gibi istenmeyen çevresel faktörlere karşı bağışıklık oluşturulması bulunmaktadır [16]. Doğal brassinosteroidlerin bitkilere dışardan uygulanmasının antioksidan etki yarattığı, süperoksit dismutaz, katalaz gibi antioksidan enzimleri artırdığı ortaya konulmuştur [17, 18]. Bitkilerde heterodimer bir reseptör olarak bulunan ve hücre membranında lokalize olmuş brassinosteroid reseptörü, brassinosteroid bağlanmasını ardışık serin/treonin domenlerinden fosforile olarak aktif hale geçmektedir. Bu mekanizma ile çeşitli transkripsiyon faktörleri aktive olmakta, hücre bölünmesi ve büyümesi gibi brassinosteroid cevap genlerinin anlatımlarının tetiklenmesini sağlamaktadır [16]. Steroid yapıdaki brassinosteroidler hayvanlarda bulunan steroid türevli hormonlara yapısal olarak benzemektedir. İnsanlarda steroid yapıdaki hormonlar embriyonik gelişim ve sekonder eşey karakterlerinin gelişiminden sorumludur [19]. Aynı zamanda steroid türevi östrojen ve androjenler sırasıyla meme kanseri ve PKa gelişiminden de sorumludurlar [20]. Bitki ve hayvan steroidlerinin bu ortak noktasından yola çıkarak EBR, ilk defa kanser hücrelerine Malikova ve diğ. [15] tarafından denenmiş ve çeşitli kanser hücre hatlarında hücre canlılığında azalmaya neden olduğu özellikle hormonlara bağımlı kanser türlerinde etkin olmakla beraber hormonlardan bağımsız gelişen kanser türlerinde de etkili olduğu belirlenmiştir [21]. EBR'nin steroid olma özelliği ve kanserli hücrelerdeki steroid hormon reseptörlerinin kendilerine özgü ligandlar haricinde başka steroidleri de bağlayabilme özelliklerinden yola çıkarak hücre ölümünde sitoplazmada lokalize olan steroid reseptörlerin etkisi olup olmadığı bilinmemektedir. Bu nedenle EBR'nin kanser hücrelerindeki etkisinin moleküler mekanizması halen araştırılmaktadır.

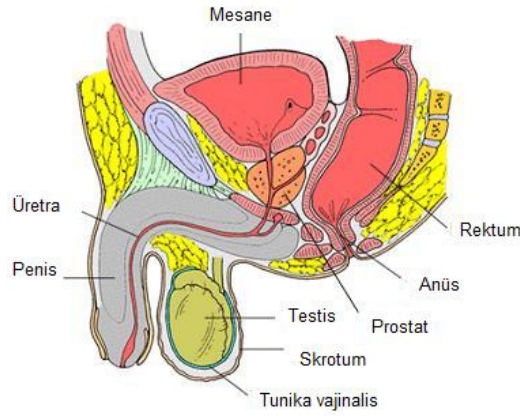
Bu bilgiler ışığında bu çalışmanın esas amacı, aktif androjen reseptörü (AR) anlatımı bulunan LNCaP ve bulunmayan DU145 PKa hücrelerinde EBR tarafından tetiklenen apoptotik yolağın mekanizmasının aydınlatılmasıdır. Böylelikle EBR'nin hem hormona

duyarlı hem de bağımsız olarak gelişen hücre hatları üzerinde potansiyel etkisinin ve terapötik potansiyelinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. EBR'nin hücre döngüsünü bloke edici etkisinin yanında, DNA hasarı veya hücre çoğalmasını tetikleyen mitojenik uyarılar gibi etkenlere önlem olarak p53 proteininin [21], EBR tarafından tetiklenen apoptozdaki rolünün de araştırılması da amaçlanmıştır. Apoptotik sürecin aynı zamanda PA biyosentez ve katabolizma enzimleri ile ilişkisi bu çalışma kapsamında literatürde ilk kez ortaya konacaktır. EBR ile tetiklenen apoptotik süreçte PA'lar ve PA metabolizması ile ilişkinin daha önce bilinmemesi ve ilk kez bu tez ile ortaya konulacak olması, EBR'nin moleküler düzeyde etki mekanizmasının aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır. Bu çalışmanın, EBR'nin PKa hücrelerinde hangi moleküler mekanizmaları hedef aldığı ve terapide kullanılabilirliği hakkında birçok ön veriyi ortaya koyacağı düşünülmüştür.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. PROSTAT BEZİ

Prostat, erkek üreme sisteminde mesane ve üretra arasında bulunan ekzokrin bir bezdir. Prostat bezi kollagen, elastin ve yoğun düz kas yapısından oluşmuş bir kapsül ile çevrilidir (Şekil 2.1) [22]. Prostat bezinin görevi alkali özellikteki seminal sıvının (pH 7,9) depolanması ve spermiler ile birlikte salınmasının sağlanmasıdır.

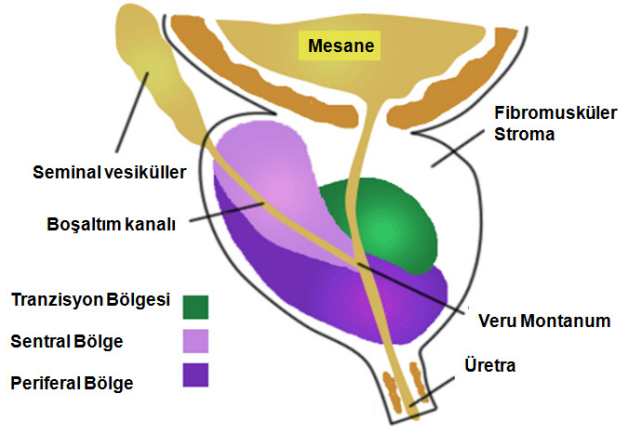


Şekil 2. 1. Erkek genital sistemi. Kumar ve Majumder [22].

Seminal sıvı basit şekerler, çinko, kalsiyum, sitrat iyonları, proteolitik enzimler, prostatik asit fosfataz ve prostata özgü antijen (prostat spesifik antijen, PSA) içermektedir. Prostat sıvısının alkali özelliği spermin genetik materyalinin korunması ve yumurtanın başarılı bir şekilde döllenmesi için önem teşkil etmektedir. Semen alkalitesi, vajinal sistemin asiditesinin (pH 3,5-4,0) nötrleştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda, pH 6,0-6,5'te hareket yeteneği kazanan spermin dölleme yeteneğinin artırılmasına da yardımcı olmaktadır. Prostat bezi anatomik olarak 4 farklı bölgede incelenmektedir (Şekil 2.2) [22]. Her bölgenin stromal ve epitel hücre kompozisyonu birbirinden farklıdır (Tablo 2.1) [23, 24].

Tablo 2. 1. Prostat bezinin anatomik özellikleri

Bölge	Tanım
Periferal bölge	Normal prostat bezinin %70'ini oluşturur. Prostat bezinin posteriorüdür ve distal üretrayı sarar. Prostat kanserlerinin çoğu bu bölgeden gelişir.
Sentral bölge	Normal prostat bezinin %25'ini oluşturur Ejakülasyon kanallarını saran bölgedir. Prostat kanserlerinin az bir kısmı bu bölgeden köken alır. Fakat bu bölgede gelişen kanserler daha agresiftirler.
Tranzisyon bölgesi	Ergenlikte prostat hacminin %5'ini oluşturur. Prostat kanserlerinin diğer bir kısmı bu bölgeden köken alır.
Anterior fibro-müsküler bölge	Prostat ağırlığının %5'ini oluşturur. Kas ve fibröz dokudan oluşmuştur.

**Şekil 2. 2.** Prostat bezinin yapısı. Kumar ve Majumder [22].

Bezi oluşturan epitel hücreler glikoprotein yapıda moleküller olan prostatik asit fosfataz ve PSA gibi maddelerin ekzokrin salgılanmasını gerçekleştirmektedirler [25]. Bazı epitel kökenli nöroendokrin hücreler ise kromogranin A ve B, somatostatin, kalsitonin gibi molekülleri salgılamaktadırlar [26]. Erkeklerde, prostat bezinde yaşla beraber

benign veya malign patolojik durumlar meydana gelebilmektedir. Benign prostat hiperplazisi (BPH), yaşlı erkeklerde sıklıkla saptanan ve tedavi edilebilen bir hastalık olup prostatın büyümesi olarak tanımlanmaktadır [27]. Prostat bezinde gelişen malignite ise prostat adenokarsinomudur.

2.2. PROSTAT KANSERİ

PKa, prostat bezini oluşturan epitel hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ile karakterize edilir. PKa erkeklerde sıklıkla görülmekte ve kanserden ölümler arasında, gelişmiş ülkelerde, ikinci sırada bulunmaktadır [3, 28]. PKa'ya karşı geliştirilen tanı yöntemleri ve tedavileri geliştirilmesine karşın dünyada her yıl teşhis sayısı artmaktadır.

2.2.1. Prostat Kanseri Gelişimini Etkileyen Faktörler

PKa görülme sıklığı yaşla birlikte artmaktadır, 50 yaş üzeri erkeklerde görülme sıklığı bu yaşın altındaki populasyona oranla daha fazladır [3]. PKa'yı tetikleyen faktörler arasında ırk, kalıtsal aile geçmişi, diyet, enfeksiyöz ajanlar, çevresel faktörler yer almaktadır.

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, değişik etnik gruplarda PKa görülme sıklığının farklılık gösterdiği, görülme ve ölüm oranının Japon ırkında düşük, bununla birlikte beyaz ırka oranla siyah ırkta daha sık olduğu belirlenmiştir [29]. Buna ek olarak, aile sağlık geçmişinin de etkisi bulunmaktadır. PKa hastası birinci dereceden yakını olan erkeklerde PKa görülme sıklığının normal populasyona göre arttığı bilinmektedir. Tüm PKa vakalarının % 9'unda kalıtsal nedenler rol oynamaktadır. 1. kromozomun q kolunda bulunan kalıtsal prostat kanseri 1 (*HPC1*) geni ve X kromozomu üzerinde bulunan bir diğer kalıtsal prostat kanseri geni (*HPCX*) otozomal dominant olarak bir sonraki dölle geçer ve PKa gelişiminde etkindir [30]. Aynı zamanda *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonların PKa gelişimini tetiklediği ileri sürülmüştür [31].

PKa faktörlerinden bir diğeri ise beslenme şeklidir. Fazla yağlı besinlerin tüketimi ile PKa gelişimi arasında bağlantı olduğu saptanmıştır. Bunun ana nedeni olarak da yüksek

yağ içerikli besin tüketiminin androjen ve östrojenlerin salınımını attırması olarak ileri sürülmüştür [32].

Beslenmenin yanı sıra, enfeksiyöz ajanların da PKa oluşumunu tetiklediği saptanmıştır. Özellikle cinsel yolla bulaşan hastalıklar PKa ile ilişkili bulunmuştur. Frengi gibi cinsel yolla bulaşan hastalıkların PKa riskinin arttığı gözlenmiştir [33]. Viral enfeksiyonlardan human papillomavirus ve insan bağışıklık yetmezlik virüsü (HIV) ile enfekte olanlar kişilerde PKa riski saptanmıştır [34]. Bu enfeksiyöz ajanların, prostatta kronik inflamasyona neden olduğu ve PKa'yı tetiklediği düşünülmektedir.

PKa gelişimi için belirtilen bu faktörlerin hücrelerde tetikledikleri moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. PKa gelişiminin temel nedeni ve ilk basamağı, protat bezinin büyüüp gelişmesi için gerekli olan androjenlerin, hücrelerde tetiklediği aşırı çoğalma olarak gösterilmektedir. PKa vakalarının çoğunun androjenlere bağlı olarak salınım yapan epitel hücrelerden geliştiği göze alındığında, AR sinyal mekanizması PKa gelişimi ve ilerlemesi için çok eski yıllardan beri olası etken olarak ileri sürülmüştür [35]. Bunun yanı sıra, erkek üreme sistemindeki testisler tarafından düşük miktarlarda üretilen östrojenlerin de, androjenlerin indüklediği prostat hücre büyümesini teşvik edebildiği gösterilmiştir [36].

2.2.2. Prostat Kanseri Oluşumunun Moleküler Mekanizmaları

2.2.1.1. Androjenlere Bağımlı Prostat Kanseri Gelişimi

Androjen reseptörü sinyali prostat bezinin hem gelişimini hem de kanser oluşumunu tetikleyen ortak elemandır. PKa'ya karşı geliştirilen ilk tedavi yöntemi androjen yoksunluğunun sağlanması şeklindedir. Normal koşullarda prostat epitel hücreleri arasındaki hücre çoğalması ve apoptotik hücre ölümü androjen metabolizması sayesinde dengede tutulmaktadır. PKa durumunda ise, bu denge bozulmakta, hücre çoğalması artmakta ve kanserli hücrelerin sağ kalımı androjenler sayesinde gerçekleşmektedir [37].

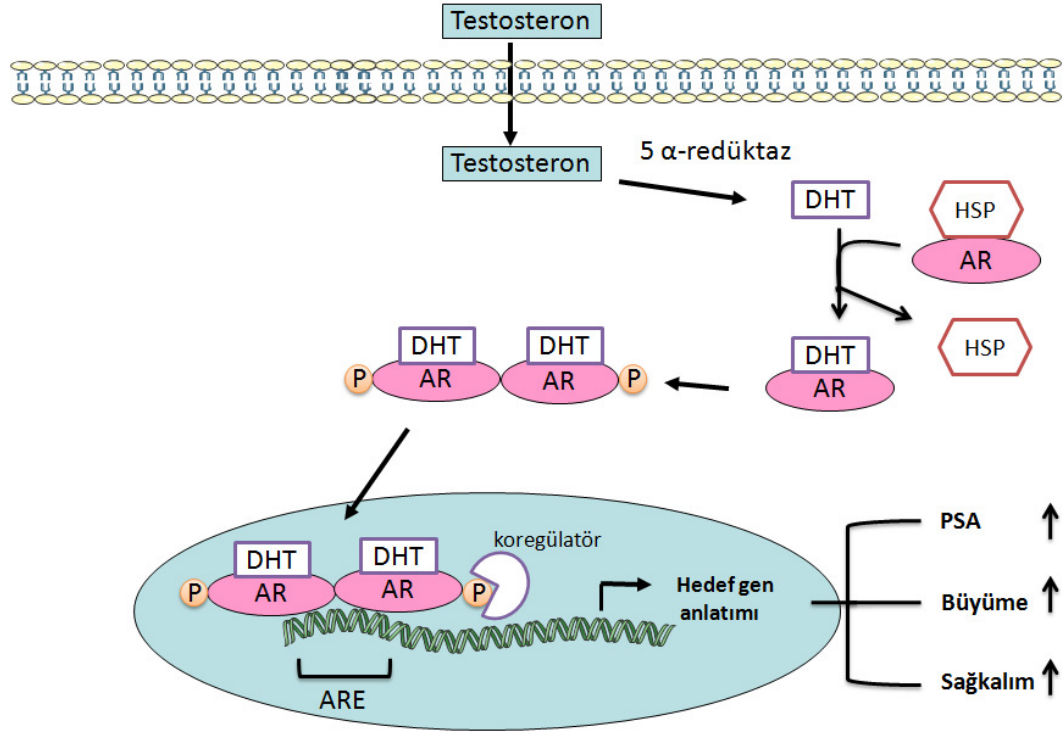
Erkek üreme sistemi hormonları olan androjenlerin üretimi hipotalamus tarafından kontrol edilmektedir. Kandaki testosteron seviyesi düştüğünde hipotalamus tarafından salgılanan gonadotropin salgılayıcı hormon (GnRH) hipofiz bezini uyarak hipofiz bezinden lüteinizan hormonun (LH) salınımını tetiklemektedir. Üretimin inhibe edilmesi ise negatif geribildirim mekanizması ile yani testosteronun artması ile meydana gelmektedir. LH testislerdeki Leydig hücrelerinde steroidlerden testosteron yapımını uyarmaktadır. Testosteron erkek üreme sisteminin gelişimini sağladığı gibi, sekonder eşey karakterlerinin gelişimi ve sürekliliği için de gerekli bir hormondur. Kan dolaşımında bulunan testosteron ve prostat hücrelerindeki daha aktif formu olan 5α -dihidrotestosteron (DHT) steroid hormon ailesinin üyeleridirler.

Testosteron, kolesterolden köken alan bir steroidtir. Kolesterolün testosterona çevrilmesi birçok biyosentetik reaksiyon basamağını içermektedir. Mitokondri dış zarında konumlanan kolesterol, steroidogenik akut düzenleyici protein ve P450 enziminin yardımı ile (kolesterolün son yan zincirinin kesilmesi), mitokondri iç zarına transfer edilmektedir. Bu değişim sayesinde kolesterol pregnenolona dönüştürülmüş olur. Pregnenolon daha sonra sırasıyla 3β -hidroksisteroid dehidrogenaz, 17α -hidroksilaz, 17β -hidroksisteroid dehidrogenaz tip 3, 3β -hidroksisteroid dehidrogenaz gibi enzimlerle progesteron, hidroksiprogesteron, androstenedion ve testosterona dönüştürülür. Prostatı oluşturan hücrelerde testosteron daha aktif formu olan DHT'ye 5α -redüktaz enzimi ile çevrilmektedir. Testosteronun konjugatı olan androstenediol negatif geribildirim mekanizmasında testosteron üretiminin inhibe edilmesinde rol oynarken, bir diğer konjugatı androsteron idrar ile vücut dışına atılmaktadır [24].

AR, ligandı testosteron veya DHT ile aktive olan bir transkripsiyon faktörüdür [38]. Hücre çoğalması ve farklılaşmasında görev olan pek çok genin anlatımından sorumludur. AR nüklear reseptör süper ailesinin de bir üyesidir. Bu protein ailesi glikokortikoid, östrojen, progesteron ve mineralokortikoid reseptörlerini de içine almaktadır.

AR kodlayan gen X kromozomunun q kolu üzerinde 11. ve 12. bölgelerde bulunmaktadır. 9 kilobaz uzunluğundaki AR geni 8 ekzon içermektedir [39]. AR geninin N-terminal ucunda iki transkripsiyon aktivasyon domeni tanımlanmıştır. Bunlardan birincisi AR'nin transaktivasyon kabiliyetinden sorumludur [40]. İkinci domen ise DNA'ya bağlanma domenidir. Ekzon üçün sonunda bulunan bir diğer domen ise AR'nin başka proteinlerle etkileşime girebilen bölgesini kodlar. Genin, C-terminal ucunda ise ligand bağlama bölgesini kodlayan domen bulunmaktadır [41]. AR proteininde ise yine fonksiyonel protein domenleri ligand bağlama, DNA'ya bağlanma ve diğer proteinlerle etkileşim bölgeleridir. Ligandı bulunmadığı zaman AR sitoplazmada lokalize olmaktadır. Burada şaperon proteinlere [genellikle ısı şok proteinlerine (HSPlere)] yüksek ilgi ile bağlıdır. Ligand varlığında ise AR-şaperon kompleksinin kompozisyonu ve konformasyonu değişerek, AR serbestlenmekte ve liganda bağlanmaktadır. Bu serbestlenme ve ardından liganda bağlanma AR'nin nukleusa taşınması ile son bulmaktadır [41, 42]. Nukleusta dimerize olan reseptör ligand kompleksi hedef gendeki AR cevap elementlerine bağlanmakta ve bu genlerin anlatımını başlatmaktadır (Şekil 2.3). Androjenler çok sayıda hedef genin transkripsiyonunu başlatabilir. Bunlara örnek olarak prostat sepsifik antijen (PSA), prostatik asit fosfataz, birçok büyüme faktörü, hücre döngüsü ve apoptozu yöneten genler verilebilir [43-45].

Normal durumda testosteron, prostat epitel hücrelerinden yağda çözünen küçük bir molekül olması sebebiyle basit difüzyonla girdikten sonra, sitoplazmada 5 α -redüktaz enzimi ile DHT'ye çevrilmektedir. DHT daha sonra AR ile bağlanarak, AR'nin fosforlanmasını ve nukleusa göç etmesini tetiklemektedir. Erken evre PKa'da androjen metabolizmasında meydana gelen anormallikler nedeniyle sürekli androjen sinyali prostat epitel hücrelerinin bölünmesini ve kanser oluşumunu tetiklemektedir.



Şekil 2. 3. Androjen reseptörüne bağımlı prostat kanserinin moleküler mekanizması

Androjen metabolizmasındaki değişimlerle tetiklenen PKa'da, kanser gelişimi 5α-redüktaz enzimi inhibitörleri ile baskılanmaktadır. Klinikte kullanılan 5α-redüktaz enzimi inhibitörlerinden finasterid ve dutasteridin PKa'yı önleme başarısı % 20 olarak gösterilmektedir [46, 47]. Kullanılan bu inhibitörlerle DHT seviyelerinin sadece % 50 oranında azaldığı tespit edilmiştir [48]. Bunun nedeni olarak, prostat epitel hücrelerinin aktivitesi sonucu DHT seviyelerinin düşmediği gösterilmiştir [38]. Aynı zamanda steroidogeneze sorumlu pek çok enzimin de kanser gelişimi sırasında ifade düzeylerinin arttığı ve androjenlerin yeniden sentez edilmelerini uyardıkları gösterilmiştir [49, 50]. AR bağımlı PKa gelişimine reseptörün fazla anlatımı da neden olmaktadır. Androjen uzaklaştırma tedavisi almış hastaların yaklaşık % 80'inde AR geni kopyasının fazla sayıda olduğu saptanmıştır [51]. Bunun nedeni AR geninin fazla anlatımı ya da genin regülatör bölgelerindeki mutasyonlar olarak tanımlanmıştır. Aynı

zamanda, AR hipersensitivitesi de PKa gelişimini tetiklemektedir. AR'de meydana gelen mutasyonlar sonucunda reseptör çok düşük dozlarda androjenlere karşı cevap oluşturabilmektedir, diğer bir ifade ile hücrelerin androjenlere cevap verme eşiği çok düşüktür.

2.2.1.1. Androjenlerden Bağımsız Prostat Kanseri Gelişimi

Erken evre PKa tedavisi olarak androjen metabolizmasının inhibe edilmesini takiben, nüks eden ya da tedavi edilmemiş agresif tümörlerde anti-androjen tedaviye karşın tümör gelişimi devam etmektedir. Endokrin kontrol mekanizmasından kaçarak androjenlerden bağımsız olarak gelişen PKa'da, AR ve AR regülatörlerinde meydana gelen mutasyonların rol oynadığı gösterilmiştir. Brian Feldman ve David Feldman [52] androjen bağımsız PKa oluşumu nedenlerini şu şekilde sıralamışlardır:

- a. Büyüme faktörleri ile AR aktivasyonu
- b. Diğer steroid hormonlarla AR aktivasyonu
- c. AR sinyalinin saf dışı bırakılması
- d. AR koregülatörlerindeki mutasyonlar
- e. Prostat epitel hücrelerinde androjen bağımsız bölünen hücrelerin varlığı

a. Büyüme faktörleri ve non-steroidal moleküller ile AR aktivasyonu

İnsulin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), keratinosit büyüme faktörü (KGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF)'in AR'yi androjenlerden bağımsız olarak aktive edebildikleri gösterilmiştir [53]. Böylelikle androjenlerden bağımsız olarak AR hedef genlerinin anlatımı gerçekleşebilmektedir. Tirozin kinaz reseptörlerinin ligandları olan IGF-1, KGF veya EGF, hücre içinde kompleks sinyal kaskadlarının başlamasından sorumlu moleküllerdir. AR sinyal yolağı üzerine olan etkilerinin doğrudan mı yoksa dolaylı mı olduğu ise kesin olarak belirlenememiştir; bununla birlikte PKa'da fazla anlatımları tespit edilmiştir.

IGF-1 bu faktörler arasında en iyi AR indükleyici olarak bilinmektedir. LNCaP hücrelerinde PSA üretimini ve salınımını 5 kat artırdığı tespit edilmiştir [53]. Ayrıca AR antagonistisi olarak tanımlanan kasodeksin (bikalutamidin), IGF-1 ile başlatılan AR

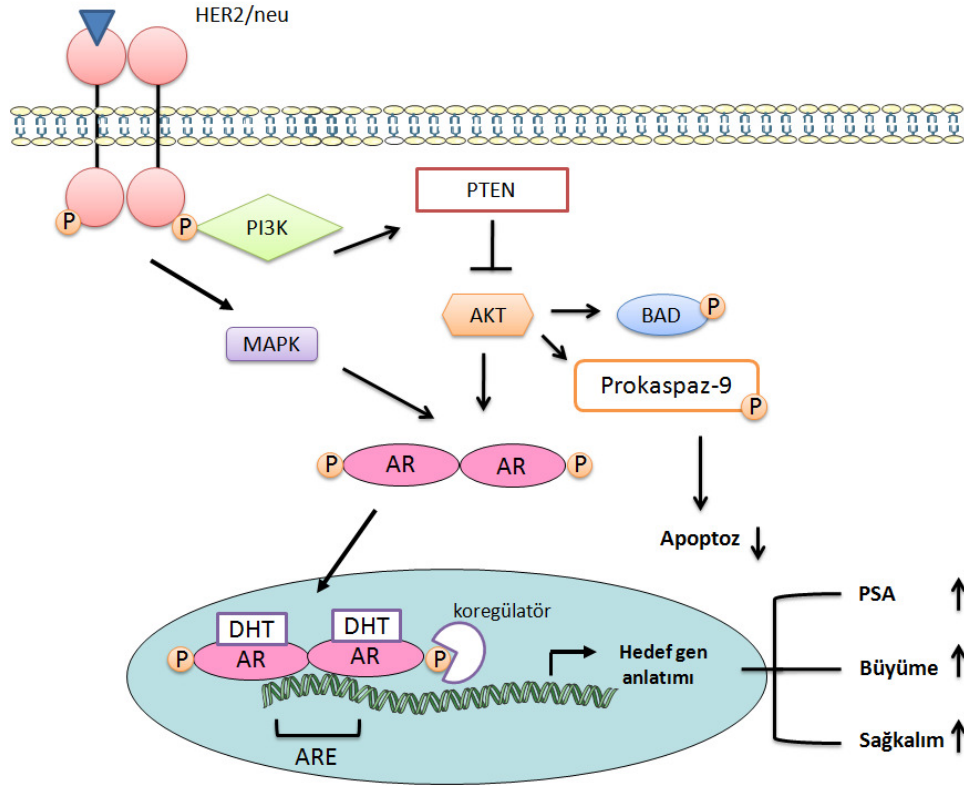
aktivasyonunu rekabet ederek bloke ettiği gösterilmiş ve büyüme faktörlerinin AR ligand bağlama domenlerini hedef aldığı ileri sürülmüştür [53]. Böylelikle androjenlerden bağımsız gelişen PKa'da AR'nin tirozin kinazlarla etkileşime girerek etki gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Daha önce meme ve ovaryum kanserlerinde de nuklear reseptör sinyal yollarının tirozin kinaz reseptörleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [54]. Özellikle meme ve ovaryum kanserlerinin % 20-30'unda insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, HER-2/neu) adı verilen EGF reseptör ailesinin bir üyesi olan molekülün fazla anlatım yaptığı tespit edilmiştir. HER-2/neu'nun östrojenik ligand yokluğunda östrojen reseptörünü (ER) aktive ettiği ve kanseri tetiklediği bilinmektedir [55, 56]. Benzer şekilde PKa vakalarında HER-2/neu fazla anlatımı saptanmış ve bu molekülün androjenlerden bağımsız olarak AR'nin fosforlanmasına yol açarak AR sinyal yolağını indüklediği ortaya konulmuştur [57]. Bununla birlikte, IGF-1 sinyalini kesebilen kasodeks isimli ilacın HER-2/neu tarafından başlatılan AR aktivasyonunu inhibe edemediği gösterilmiştir. Bu veri de HER-2/neu sinyalinin AR ligand bağlama domenini hedef almadığını işaret etmektedir [57]. Bu yüzden tedavi amaçlı olarak HER-2/neu reseptörünü bloke eden monoklonal antikör transtuzumab (herceptin) geliştirilmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır [58]. Yeh ve diğ. [59] HER-2/neu'nun AR'yi mitojenle aktifleştirilmiş protein kinaz (MAPK) yolağı ile fosforlayarak aktif hale getirdiği göstermiştir. MAPK bir protein serin/teronin kinazdır ve hücre dışından gelen uyarılara karşı gen anlatımı, mitoz, farklılaşma, çoğalma, hücre sağ kalımı, apoptoz gibi birçok hücreyel aktiviteyi kontrol etmektedir.

MAPK yolağı dışında diğer başka önemli sinyal yollarında görevli proteinlerin de AR'yi androjenlerden bağımsız olarak aktive edebileceği gösterilmiştir. Bu moleküllerden biri, tümör baskılayıcı protein olan fosfataz ve tensin homolog (PTEN) olarak belirlenmiştir. PTEN mutasyonlarının glioblastoma, meme ve prostat kanserlerinde rolü olduğu bilinmektedir [60]. PTEN, fosfotidilinositol-3 fosfat (PI3K)'dan 3 fosfatı uzaklaştıran lipid fosfatazıdır [61]. PI3K, AKT veya protein kinaz B adı verilen serin-treonin kinazları aktive edebilen bir ikinci mesajcıdır. AKT yolağı

kanser gelişiminde çok önem taşımaktadır, çünkü hücre içinde anti-apoptotik aktivite gösteren proteinlerin anlatımını tetiklemektedir (Şekil 2.4). Aynı zamanda Bad, prokaspaz-9 gibi pro-apoptotik proteinleri de fosforlayarak inaktif hale getirmektedir (Şekil 4) [62]. Normal hücrelerde PTEN, AKT'yi bloke etmekle görevlidir, böylece hücreler apoptoza gidebilirler. Tümör hücrelerinde ise PTEN fonksiyonunun kaybolması sonucunda, AKT sinyal yolağı aktif olacağından apoptotik sinyal baskılanmakta ve kontrolsüz hücre çoğalması meydana gelmektedir. AKT aynı zamanda hücre döngüsünün doğal inhibitörü p27 proteininin de anlatımını baskılayan bir molekül olarak tanımlanmıştır. AKT yolağının PKa oluşumundaki rolü ise 2000 yılında Graff ve diğ. [63] tarafından ortaya konulmuştur. AKT aktivitesi androjene bağımsız büyüyen PKa hücre hatlarında, androjene bağımlı olan hücre hatlarına göre daha fazla olarak saptanmıştır. Aynı zamanda androjene bağımlı büyüyen hücrelerde AKT fazla anlatımı olduğu durumda ise hücrelerin daha hızlı bölünüp çoğaldıkları ve p27 ifade düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir. Wen ve diğ. [64], AKT'nin HER-2/neu tarafından tetiklenen AR aktivasyonunda rol oynayabileceğini ortaya koymuşlardır. HER-2/neu'nun PI3K'yi fosforlaması, PI3K'nin AKT'yi fosforlamasını tetiklemektedir. Fosforlanarak aktif hale gelen AKT'nin ise AR'yi 213. ve 791. serinlerden fosforlayarak aktive etmesi ile andojenden bağımsız AR aktivasyonu olabileceği gösterilmiştir [64].

Bir diğer androjene bağımsız olarak AR'yi aktive eden önemli non-steroidal molekül interlökin-6 (IL-6) olarak belirlenmiştir. Hücre çoğalması ve programlı hücre ölümünde etkisi olan IL-6 prostat kanserli hastaların serumlarında yüksek dozda bulunmuştur [65]. Androjenlerden yoksun ortamda IL-6 varlığının PSA mRNA düzeyini iki kat artırdığı gösterilmiştir [66].



Şekil 2. 4. Büyüme hormonları ile prostat kanseri gelişiminin mekanizması

b. Diğer steroid hormonlarla AR aktivasyonu

AR'de meydana gelen somatik mutasyonlar PKa'nın ileri evrelerinde görülmektedir [67, 68]. PKa hücrelerinde 2 adet AR nokta mutasyonu saptanmıştır; bunlardan biri sıklıkla PKa modeli olarak kullanılan LNCaP PKa hücre hattında da bulunan 877 pozisyonundaki treoninin alanine dönüştüğü (T877A) mutasyondur [69]. AR mutasyonları genellikle reseptörün ligand spesifitesini değiştirmektedirler; böylelikle reseptör testosteron veya DHT yerine östrojen, progesteron gibi başka nuklear hormonlar, kortikosteroidler (kortizol, kortizon), ve antiandrojenler gibi non-androjenik faktörleri bağlayıp aktive olabilmektedir [70]. Örnek olarak, T877A mutasyonu androjene bağımsız PKa vakalarında görülmüş ve bu mutasyonun özellikle flutamid gibi androjen antagonistlerine karşı cevapsızlığa neden olduğu gösterilmiştir [71]. T877A mutasyonu dışında AR ligand bağlama bölgesini kodlayan L701H, V715M ve H874Y gibi başka mutasyonlar da tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar sırasıyla, AR'nin glikokortikoidlere

bağlanmasını, progesterona bağlanmasını ve flutamid gibi anti-androjenlerle aktive olmasını sağladığı saptanmıştır [72, 73].

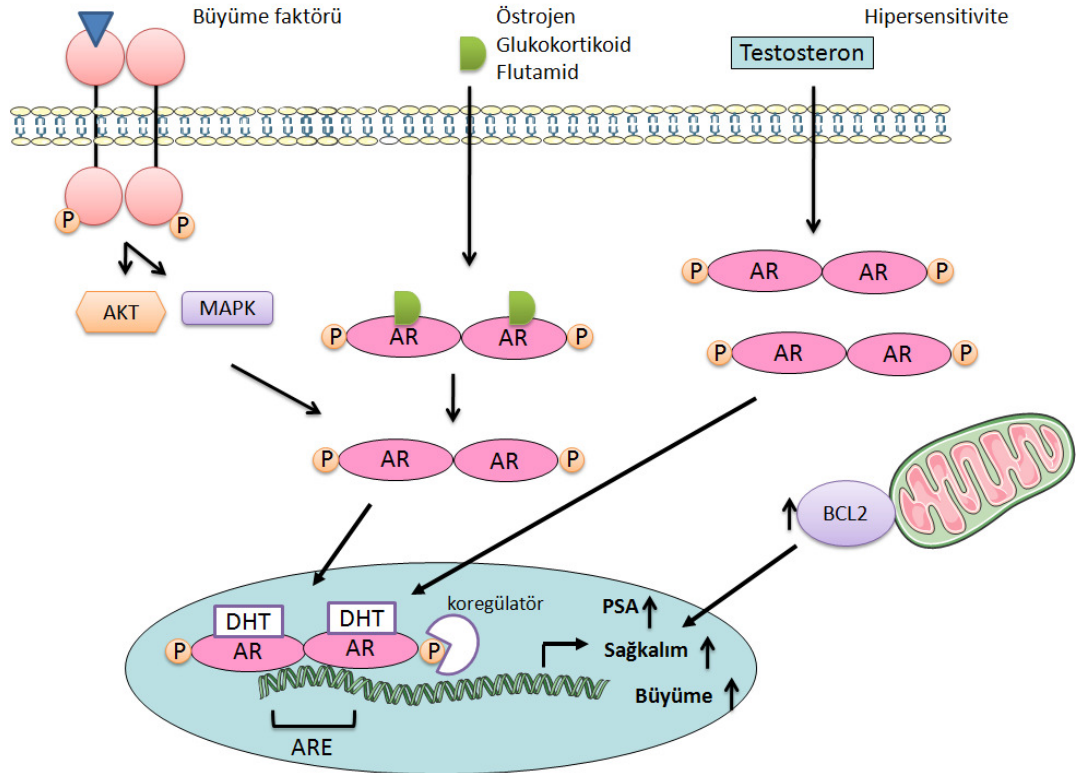
c. AR sinyalinin saf dışı bırakılması

AR'de meydana gelen mutasyonlar ya da steroid özelliğinde olmayan moleküllerle aktive olması dışında, AR'nin saf dışı bırakılıp başka faktörler tarafından da PKa oluşumunun tetiklenmesi olasıdır. Daha önce de bahsedildiği gibi, androjenlere bağımlı gelişen PKa'da androjenlerin eksikliği tümör hücrelerinin apoptozu ile sonlanmaktadır. Bu nedenle AR'nin PKa gelişiminde rol oynamadığı durum, hücre çoğalmasının ve apoptozun engellenmesinin başka faktörler tarafından düzenlenmesi ile söz konusu olmaktadır. Tümör hücrelerinin sağ kalımını sağlayan ve apoptotik sinyali baskılayan en önemli moleküllerin başında Bcl-2 proteini gelmektedir (Şekil 2.5). Normal şartlarda, prostat epitel hücreleri Bcl-2 anlatımı gerçekleştirmezler [74]; bununla beraber, premalignant olan prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) hücrelerinde Bcl-2 anlatımı yapılmaya başlanmaktadır. Furuya ve diğ. [75] PKa hücrelerinin Bcl-2 fazla anlatımı yaptıklarını tespit etmişlerdir. Bunun yanı sıra, Bcl-2'nin antisens oligonukleotidler tarafından bloke edilmesinin androjen bağımsız PKa ksenograft modelinde tümör çapının küçülmesini sağladığı ortaya konulmuştur [76]. Bu verilerden yola çıkarak Bcl-2'nin, androjenlere ve AR'ye bağlı kanser gelişimini saf dışı bıraktığı sonucuna varılmaktadır. Bcl-2'nin yanı sıra pek çok onkogen ve tümör baskılayıcıların androjen bağımsız PKa'yı tetiklediği belirtilmiştir. Bunların başında Ras, c-myc, retinoblastoma (Rb) ve p53 mutasyonları gelmektedir. Ras proteini küçük GTPaz'dır. Aktive olduğu zaman, hedefi olan diğer protein ve transkripsiyon faktörlerini indükleyerek çoğalma, büyüme, farklılaşma gibi hücre olaylarını koordine eden genlerin anlatımını başlatmaktadır. Dolayısıyla, Ras geninde meydana gelen mutasyonlarla kontrolsüz hücre çoğalması artmaktadır [77].

PKa gelişimini tetikleyen bir başka onkogen ise c-myc'tir; c-myc, DNA replikasyonu ve G₀/G₁ hücre döngüsü geçişini kontrol eden bir proteindir [78]. PKa vakalarında kanserin derecesine bağlı olmakla birlikte sıklıkla rastlanan bir onkogendir [79, 80]. Bir diğer PKa faktörü olan Rb, hücre döngüsünde hücrelerin G₁/S evresinden geçişini kontrol

eder. Eğer hücrede hasar görmüş DNA bulunuyorsa Rb, hücre döngüsünün S fazına geçmesini sağlayan E2F transkripsiyon faktörüne bağlanarak onu bloke etmekte ve hücre döngüsü durmaktadır [81]. Çocukluk çağı kanseri olan retinoblastoma nedeni olan Rb mutasyonlarına başka kanser türlerinde de rastlanılmıştır. PKa için Bookstein ve diğ. [82, 83] 3 farklı hücre hattında çalışmışlar ve bu hücre hatlarından androjen reseptörü anlatımı yapmayan DU145'te Rb'ye bağlı hücre çoğalmasının arttığını tespit etmişlerdir.

PKa gelişimini tetikleyen bir diğer molekül olan p53, normal şartlarda hücre döngüsünü negatif yönde etkileyen bir protein olarak tanımlanmıştır. DNA hasarı olduğu zaman hücre siklusunu durdurarak DNA tamiri için zaman kazandırmakta, eğer DNA tamiri mümkün değil ise apoptozu tetiklemektedir [84]. p53 inaktivasyonu PKa dahil olmak üzere insan kanserlerinin çoğunda (meme, kolon, akciğer gibi) tanımlanmıştır.



Şekil 2. 5. Farklı faktörlere bağlı prostat kanseri gelişimi

d. AR koreg lat rlerindeki mutasyonlar

AR tarafından hedef genlerin anlatımının başlatılabilmesi için koreg lat rlere ihtiyaç duyulmaktadır [85]. En iyi bilinen ve ilk izole edilip tanımlanan AR koreg lat r  nuklear reseptör koaktivatör 1 (NCOA1)'dir [86]. Bunun dışında, AR ile doğrudan bağlantıya girerek AR'nin transkripsiyonel aktivitesini arttıran genel transkripsiyon faktörü 2F polipeptit 2 (GTF2F2), AR'yi post-transkripsiyonel olarak modifiye edip aynı zamanda kromatinle doğrudan ilişkide olabilen histon asetil transferazlar veya HDAC1 gibi histon deasetil transferazlar,  -katenin, Foxa1, Oct1 gibi spesifik transkripsiyon faktörleri AR koreg lat rleri olarak bilinmektedirler [85, 87, 88]. AR koreg lat rlerinin yüksek aktivitesinin PKa gelişimini tetiklediği gösterilmiştir; özellikle NCOA1, androjen reseptör aktivatörü 70 (ARA70), ARA55, BAG1 (Bcl-2 assosiy  gen) gibi koreg lat rlerin fazla anlatımlarının PKa ile uyumluluk gösterdiği saptanmıştır [89-91].

e. Prostat hücrelerinde androjen bağımsız bölünen hücrelerin varlığı

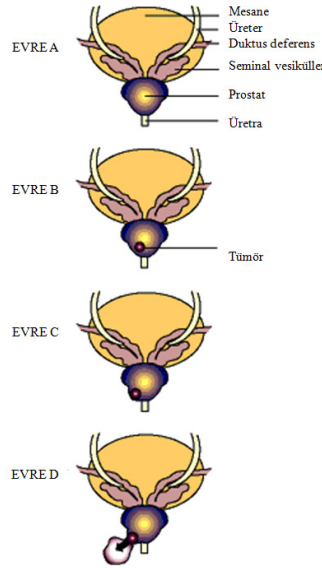
Androjen bağımsız PKa gelişimi nedeni olarak Isaacs [92], normal prostat dokusunda androjenlerden bağımsız çoğalabilen bir alt hücre populasyonunun olduğunu ileri sürmüştür. Prostat bezindeki kök hücreler olarak farz edilen bazal hücrelerin androjenlerden bağımsız  oğalabildikleri ve androjen eksikliği tedavisine cevap vermedikleri bilinmektedir [93]. Isaacs'a göre [92], eğer prostat epitel kök hücresi transforme olarak salınma yapabilen normal bir prostat epitel hücreesine dönüşüyorsa, öncelikle androjenlerin varlığında, androjen bağımlı olarak gelişimlerini devam ettireceklerdir. PKa durumunda ise androjen eksikliği ile bu hücreler elimine olacaklardır; fakat androjen bağımlı olmayan epitel kök hücrelerden gelişen prostat epitel hücreleri bu tedaviye cevap vermeyeceklerdir. Böylelikle androjen bağımsız PKa gelişimi söz konusu olacaktır. Isaac'ın hipotezini destekleyen en önemli bulgu prostat kök hücresi sayılan bazal hücrelerin, ileri evre PKa hücreleri gibi androjen bağımsız olduğunun 1998 yılında Bui ve diğ. [94] ile 1999 yılında Craft ve diğ. [95] tarafından gösterilmiştir. Craft ve diğ. [95] yaptıkları çalışmada, ileri evre PKa tümörlerinde 1/105 oranında androjen bağımsız hücre bulunduğunu tespit etmişlerdir; buradan yola çıkarak

PKa tümörlerinin androjenlere cevap açısından heterojen bir hücre popülasyonu oluşturdukları sonucuna varmışlardır.

2.3. PROSTAT KANSERİ EVRELERİ

PKa'nın yaygınlığı evrelendirme sistemi ile tanımlanır. Sıklıkla 3 evrelendirme sistemi kullanılır.

a. A-B-C-D Sistemi: PKa'nın ilk evresi olan A evresinde, prostatın az sayıda hücresi kanserlidir ve bu hücreler sadece prostat içerisinde yer almaktadırlar. Kanserli hücre popülasyonunun daha da artması ile tanımlanan evre B evresidir. Fakat yine prostat dokusu dışına çıkan kanser hücresi bulunmamaktadır. Zamanla, kanser prostatın daha büyük kısmını işgal etmekte ve ileri evrelerde kanser çevre dokulara yayılım göstermektedir. Bu evre C evresi olarak tanımlanmaktadır. D evresi ise kanserin lenf bezlerine, diğer organlara ve kemiklere metastaz yaptığı evre olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.6) [96].



Şekil 2. 6. Prostat kanseri evreleri (A-B-C-D Sistemi [97])

b. TNM Sistemi: TNM sisteminde, T tümör boyutunu, N lenf bezi tutulumunu, ve M ise diğer organlara sıçramayı belirlemektedir. Bu sistemle bütün olası yayılma durumları tanımlanabilmektedir (Tablo 2.2) [98].

Tablo 2. 2. Prostat Kanseri TNM Evreleme Sistemi. Ngyuen ve Campbell [98].

T Primer Tümör	
TX	Tespit edilemeyen primer tümör
T0	Primer tümör kanıtı yok
T1	Tümör klinik olarak saptanamıyor
T1a	Tümör dokunun %5'inden azında Evre A1
T1b	Tümör dokunun %5'inden fazlasında Evre A1
T1c	Tümör ancak iğne biyopsisi ile belirlenebiliyor Evre B0
T2	Tümör prostat dışına çıkmamış
T2a	Tümör tek bir lobun yarısında Evre B1
T2b	Tümör tek bir lobun yarısından fazla yer kaplıyor
T2c	Tümör her iki lobuda kaplıyor Evre B2
T3	Tümör kapsülden prostat dışına çıkıyor
T3a	Tek taraflı kapsül dışı yayılım Evre C1
T3b	Çift taraflı kapsül dışı yayılım
T3c	Tümör seminal veziküllere yayılıyor Evre C2
T4	Tümör seminal veziküller dışındaki dokulara yayılıyor
N- Bölgesel Lenf Düğümler	
NX	Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf düğümlerinde metastaz yok Evre D1
N1	Tek bir nodül ve çapı ≤ 2 cm
N2	Tek bir nodül ≥ 2 cm ≤ 5 cm
N3	Tek veya birden fazla 5 cm den büyük nodül
M- Metastaz	
MX	Uzak metastaz değerlendirilemiyor
M1	Uzak metastaz var
M1a	Bölgesel lenf nodları dışında tutulum var Evre D2
M1b	Kemiklerde metastaz var
M1c	Kemik metastazı olsun/ olmasın başka bölgelerde metastaz var

c. Gleason Skoru: PKa hücrelerinin üreme ve yayılım hızı hakkında bilgi sahibi edinmeyi sağlayan ve kanser hücrelerinin değişim dereceleri hakkında bilgi veren sisteme "Gleason skorlama sistemi" denilmektedir. Biyopsi ile tümörden alınan parçanın histolojik görüntüsünün normal hücre histolojik görünümünden ne oranda saptığı belirlenerek bir derece verilmektedir. Gleason skorunda 10 derece bulunmaktadır. Gleason skoru 2 ile 4 arası olan tümörler normal hücrelere çok benzeyen ve yavaş büyüyen hücrelerden oluşmaktadır. Buna karşılık Gleason skoru 10 olan tümörler aşırı çoğalma kapasitesine sahip tümörler olarak sınıflandırılmaktadırlar [99]. Düşük Gleason skorunda daha az agresif hücreler söz konusu iken, yüksek Gleason skoru teşhis edildiğinde, prostat dışına yayılım ihtimalinin yüksek olduğu bilinmektedir [100]. Buna göre değerlendirme şu şekilde yapılır:

Gleason Skor 2-4: İyi differansiye (iyi nitelikte farklılaşma gösteren) kanser hücreleri

Gleason Skor 5-6: Orta differansiye kanser hücreleri

Gleason Skor 7-10: Kötü differansiye kanser hücreleri

2.4. PROSTAT KANSERİ TEDAVİ YÖNTEMLERİ

PKa tedavisi kanserin evresi, hastanın yaşı ve genel sağlık durumu ile değişik tedavi seçeneklerinin yan etkileri göz önünde bulundurularak belirlenmektedir. PKa'nın evresine göre cerrahi müdahale, hormonal tedavi, ışınlama ya da kemoterapi gibi seçenekler uygulanmaktadır. Erken evrelerde, kanser prostat bezi içinde sınırlı iken uygulanabilecek tedavi seçenekleri arasında radikal prostatektomi bulunmaktadır; bu işlem prostatın ameliyat ile çıkartılmasıdır. Bir diğer tedavi seçeneği ise radyasyon tedavisidir; bu yöntemde, PKa'yı oluşturan kanserli hücreleri radyoaktif ışınlar aracılığı ile ortadan kaldırılmasını hedeflemektedir.

Eğer kanser ileri evrelere ulaşmış ise kanserin büyümesini yavaşlatmayı veya durdurmayı amaçlayan tedavi seçenekleri ön plana çıkmaktadır; bu seçeneklerden ilki hormonal tedavidir. PKa gelişiminde rol oynayan androjenlerin üretimini bloke edici ajanların uygulanması yani androjen eksikliği ilk seçeneklerden birini oluşturmaktadır. Hormonal tedavi iki şekilde uygulanabilmektedir:

1. Kısmi hormonal tedavi: Bu tedavi yöntemi ile testislerde testosteron üretimi durdurulmaktadır. Böylelikle androjene bağımlı gelişen PKa engellenmiş olmaktadır. Testosteron üretimi 2 şekilde engellenmektedir:

- a) Orşiektomi: Orşiektomi testislerin ameliyat ile alınması işlemidir. Testosteron üreten en önemli kaynak vücuttan uzaklaştırıldığı için tümörün büyümesi yavaşlamaktadır.
- b) Medikal kastrasyon: Testislerin testosteron üretimi ameliyat yapılmaksızın testosteron üretimini baskılayıcı ajanlarla üretiminin durdurulmasıdır. Bu ajanlara örnek olarak luteinleştirici hormon salgılama hormonu analogları (LHRH analogları) örnek verilebilmektedir [101].

2. Komple hormonal tedavi: Hem orşiektomi, hem de medikal kastrasyon (LHRH analogları enjeksiyonu) uygulaması testosteron seviyelerini düşürmektedir. Ancak, bu tedavi ile vücuttaki tüm testosteron etkisi tam olarak engellenememektedir. Böbrek üstü bezi kaynaklı testosteron az miktarlarda salgılanmaktadır. Bu nedenle, vücuttaki tüm testosteron seviyelerini indirgeyecek ajanlar kullanılmaktadır. Bu ajanlara "antiandrojenler" denir. Bu ilaçlar kan dolaşımındaki testosteronun prostat hücrelerine ulaşmalarını engellemektedirler. Medikal veya cerrahi kastrasyonun antiandrojen ilaçlar ile kombine edilmesine komple hormonal tedavi denir. Komple hormonal tedavi vücuttaki testosteronun etkisini tam olarak ortadan kaldırmakta ve tümörün büyümesini yavaşlatmaktadır.

2.4.1. Prostat Kanseri ve Kemoterapi

PKa'ya karşı ilk olarak 1989 yılında bir glikokortikoid olan prednizon Tannock ve diğ. [102] tarafından önerilmiştir. Fakat prednizonun PKa'ya karşı kesin bir çözüm olmadığı anlaşılmış üzerine, 2004 yılından itibaren taksan türevi olan docetaksel tedavisi üzerine yoğunlaşmıştır [103, 104]. Docetaksel anti-mitotik özellikte, porsuk ağacı *Taxus brevifolia*'dan izole edilen paklitaxel isimli molekülün yarı sentetik analogudur. Bunun yanı sıra docetaksel yüksek yan etkileri olan bir ajandır; bununla birlikte docetaksele cevap vermeyen hastalar için kemoterapi rejimine estramustin, talimomid gibi başka ilaçlarla kombine terapi modelleri geliştirilmiş, fakat yüksek yan etkilerden dolayı kesin sonuçlar alınamamıştır. 2005 yılında ise platin türevli satraplatin

kullanılmış ve faz çalışmaları devam etmektedir. Fakat yine kemik iliğinin baskılanması, kan değerlerinin değişimi ve nefrotoksiste gibi doz azaltmaya neden olan yan etkiler satraplatin ile gözlenmektedir [105].

Son yıllarda ise genel ve tüm organları etkileyebilen kemoterapi anlayışından çok hedefe yönelik tedaviler gündemdedir. Bu tedavi yöntemi genelde kanser etkeni olan molekül üzerine yönlendirilmiş antikor sistemleri üzerinden işlemektedir. Bu tedavi rejimi ile yüksek düzeyde seçicilik ve olumlu toksisite profilleri sağlanmaktadır. PKa tedavisi için klinikte kullanılan hedefe yönelik monoklonal antikor tedavileri genellikle anjiyogenezi (kanser hücrelerinin etraflarına gelişebilmek için yeni damar oluşturmaları) hedef almaktadır. Kanser hücreleri salgıladıkları vaskular endoteliyal büyüme faktörleri (VEGF) gibi ajanlarla yeni damar oluşumunu tetikleyebilirler. Bevacizumab adlı ajan VEGF'e karşı geliştirilmiş bir monoklonal antikordur [106]. Ayrıca, sunitinib gibi tirozin kinaz reseptörünü hedef alan antikorlar da kullanılmaktadır [107]. Hedefe yönelik tedaviler genellikle yine docetaksel, predinizon gibi ajanlarla ikili terapi şeklinde verilmektedirler [108, 109]. Prostat tümörünü oluşturan androjenlere cevap bakımından heterojenite gösteren hücre populasyonlarını hedef alan ve yan etkileri az olan bir ajan için halen çalışmalar devam etmektedir.

2.5. POLİAMİNLER

PA'lar, bütün prokaryotik ve ökaryotik canlılarda bulunan polikasyonik moleküllerdir. İlk defa 1968 yılında Antoni van Leeuwenhoek tarafından [110] insan semeninde kristaller olarak tanımlanmış ve daha sonra bu kristallerin PA'ların bir üyesi olan Spm fosfat olduğu belirlenmiştir. PA'lar doğada hayli yaygın olarak rastlanan ve mikromolar-milimolar konsantrasyonlarda birçok hücrel fonksiyonun gerçekleşmesinden sorumlu moleküller olarak tanımlanmışlardır. Memelilerdeki metabolizma yolları sıklıkla çalışılmış olup, bitki, bakteri ve protozalarda metabolizma farklılıkları tespit edilmiştir. Bazı prokaryotlarda doğal PA'lar olan Put ve Spd'nin sentezlendiği gözlemlenmiş ve bazı termofilik bakterilerde ise diğer bir doğal PA olan Spm'nin, daha fazla amin grupları içeren uzun moleküllere rastlanılmıştır. Parazitik organizmalarda ise konak hücrelerinde bulunmayan farklı metabolik enzimler

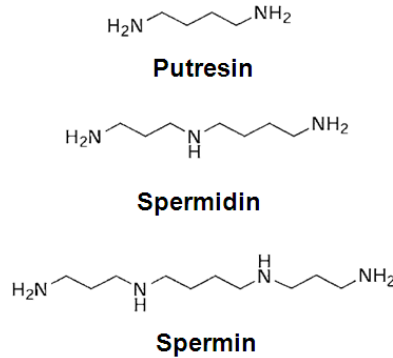
bulunmaktadır. Bu durum anti-parazitik ajanların geliştirilebilmesine olanak sağlamıştır [111].

PA'ların insan hücrelerinde DNA, RNA ve protein sentezi gibi önemli olayları düzenlediği anlaşıldıktan sonra metabolizmalarını hedef alan çeşitli analoglar ya da inhibitörler tasarlanarak potansiyel terapötik yanları hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamlarda araştırılmaya başlanmıştır. PA içeriğinin hücre içinde azaltılması ile hücresel fonksiyonlarda bozulmaya ve bazı durumlarda ise sitotoksik etkiye neden oldukları belirlenmiştir [112, 113].

2.5.1. Poliaminlerin Yapı ve Özellikleri

Biyolojik rolleri tanımlanmış sık karşılaşılan PA'lar diamin olan Put (1,4-diaminobutane), triamin olan Spd (1,8-diamino-4-azaoktan) ve tetramin olan Spm (1,12-diamino-4,9-diazadodekan)'dir (Şekil 2.7). Bununla birlikte tanımlanmış otuza yakın PA bulunmaktadır [114]. Yüksek derecede pozitif yük içermeleri bu moleküllerin biyolojik fonksiyonları açısından önem taşımaktadır.

PA'lar lineer alifatik moleküllerdir. Kimyasal yapıları bir amino grup ile başlamakta ($\text{H}_2\text{N}-$), bu grubu metilen zinciri ($-\text{CH}_2-$) takip etmektedir. Metilen grubunu takiben ikincil bir amino grubu ($-\text{NH}-$) gelmekte ve molekül başka bir amino grubu ile son bulmaktadır ($-\text{NH}_2$). Suda çözünebilen PA'ların, fizyolojik pH'da tüm amino grupları pozitif yüklüdürler.



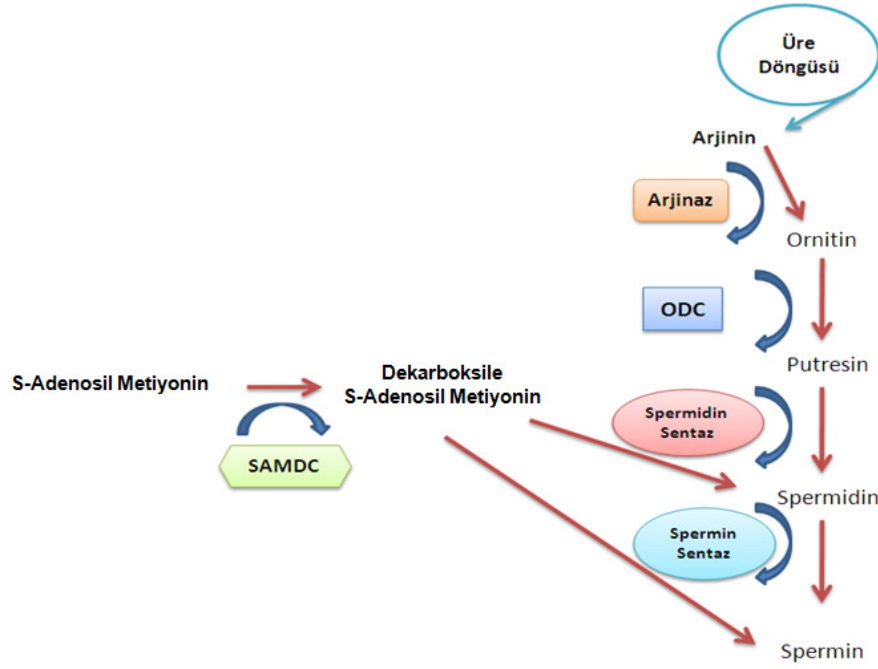
Şekil 2. 7. Poliaminlerin kimyasal yapıları

PA'lar bitki ve böceklerde birçok bileşenin yapısında bulunmaktadırlar. Bitkilerde sıklıkla alkaloidlerin yapısında, böceklerde ise toksin ve zehirlerin yapısında yer aldıkları 1990'lı yıllardan beri bilinmektedir [115, 116]. Bakterilerde de PA'ların varlığı gösterilmiştir. Özellikle *Escherichia coli*'de glutatyon molekülünün yapısında Spd türevli PA'ların varlığı gösterilmiştir [117].

Memelilerde, PA'ların hücre içi dengesi sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. PA miktarının azalmasının hücre bölünmesini durdurduğu veya tam tersi PA miktarının artmasının da toksik etkilere neden olduğu gösterilmiştir [118]. PA'lar pozitif yüklü olmaları dolayısı ile negatif yüklü moleküllere ve nükleik asitlere bağlanma eğilimindedirler. PA'ların hücre içinde pek çok önemli olayda görev yaptıkları gösterilmiştir. Hücre bölünmesi, apoptoz, protein-DNA etkileşimi, embriyonik gelişim, hücre döngüsü, hücre zarının stabilizasyonu, DNA, RNA stabilizasyonu gibi önemli hücresel işlemler bu görevlere örnek olarak verilebilir [118-120].

2.5.2. Poliamin Biyosentezi

PA biyosentez ve katabolizması hücre homeostası açısından önemli olduğundan dolayı, tüm ökaryotlarda sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. PA metabolizmasında görevli enzimler hücrenin sağlıklı bir şekilde yaşamına devam edebilmesi için hücrenin PA ihtiyacı doğrultusunda, PA'ları sentezlemek, yıkmak ya da birbirlerine dönüştürmede görevlidirler. PA metabolizmasının iki biyosentez yolağı bulunmaktadır. Bunlardan ilki ODC yolağı, ikincisi ise S-adenozilmetionin dekarboksilaz (SAMDC) yolağıdır (Şekil 2.8). İlk biyosentez yolağında substrat olarak ornitin kullanılmaktadır. Put, Spd ve Spm ortak öncü maddeleri olan ornitin amino asidi, üre siklusunda arjinin amino asidinin arjinaz enzimi aktivitesi ile meydana gelmektedir. Ornitin insanlarda fazla azotun ortadan kaldırılmasında görevli üre siklusunun önemli bir bileşenidir. SAMDC yolağında ise substrat olarak S-adenozilmetionin (AdoMet) kullanılmaktadır. Spd ve Spm sırasıyla Put'tan Spd sentaz enzimi ile Spd'ye, Spd'den Spm sentaz enzimi ile Spm'ye dönüştürülmektedir. Her iki enzim de aminopropiltransferazdır. Spd sentaz ve Spm sentaz dekarboksile AdoMet'ten bir aminopropil grubunu sırasıyla Put'a veya Spd'ye aktarmaktadırlar.



Şekil 2. 8. Poliamin biyosentez yolakları.

2.5.2.1. Ornitin Dekarboksilaz Yolağı

PA biyosentezinin ilk evresi ornitinin Put'e ODC enzimi katalizörlüğünde dekarboksilasyonudur. ODC bu evrede PA biyosentezinin kontrol noktasını oluşturmaktadır; bu nedenle ODC'nin sentezi ve yıkımı da sıkı bir şekilde denetlenmektedir. Yarılanma ömrü türler arası farklılık göstermekle beraber 10-60 dakika arasındadır. Enzim homodimer olarak aktif hale geçmekte ve kofaktör olarak da pridoksal L-fosfatı kullanmaktadır [121].

ODC'nin hücre büyümesi, farklılaşması, transformasyon ve apoptoz gibi bir çok olayda görevli olduğu belirlenmiştir. Özellikle PA'ların azalmasının hücre bölünmesine ket vurduğunun ortaya konulması ile beraber, bu süreci kontrol eden mekanizmaların ODC ile ilişkisi araştırılmıştır. Balasundaram ve Tyagi [122], ODC'nin enzimatik aktivitesinin bifazik bir şekilde hücre döngüsünün G_1 ve G_2/M fazlarında artış saptamışlardır. ODC aktivitesinin inhibe edildiği durumda ise hücre büyümesi ve transformasyonunun gerileyerek hücrelerin G_1 fazında kalmalarını indüklediği

bulunmuştur [123, 124]. Aynı zamanda ODC aktivitesinin indirgenmesi hücre içi PA seviyelerinin düşmesine, kromatin ve hücre iskeleti yapılarında bozulmalara, DNA replikasyonu, transkripsiyon, translasyon gibi önemli hücresel olayların aksamasına neden olduğu gösterilmiştir [125-127]. PA seviyelerinin ODC inhibisyonu ile azalması aynı zamanda oksidatif stres ve apoptozla son bulmaktadır. ODC aktivitesinin inhibe edilmesinin tam tersi olarak, fazla anlatımının bulunduğu hücrelerde de apoptotik mekanizmanın tetiklendiği bildirilmiştir [6]. Buradan yola çıkarak ODC'nin PA metabolizmasında ve hücre homeostasında önemli bir yer teşkil ettiği açıktır. ODC'nin özellikle transforme olmuş ve bölünme kontrolünü kaybetmiş tümör hücrelerindeki fazla anlatımının gözlemlenmesi, çeşitli ODC inhibitörlerinin geliştirilmesini sağlamıştır [128, 129]. Bu inhibitörlerden en çok araştırılan ODC'yi geri dönüşümsüz olarak inhibe etme özelliği olan olan D, L-alfa-difluorometilornitin (DFMO)'dir. DFMO, ilk defa 1980'li yıllarda sentez edilmiş, kanser ve enfeksiyöz hastalıklar gibi hiperproliferatif hastalıkların tedavisi amacı ile sunulmuştur [130]. Pek çok kanser türü DFMO'nun kemoterapötik etkisi için *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda test edilmiştir. CaCo-2 kolon kanseri hücre hattında DFMO'nun çeşitli karsinojenlere maruz kalan fare derisinde oluşan epidermal papillomaların DFMO ile gerilediği gösterilmiştir [131, 132].

Bununla birlikte DFMO'nun kanserli olmayan normal memeli hücre ve dokularına toksik etkileri ortaya konulmuştur. Normal dokulara zarar vermeyen dozlarının terapötik etkisinin bulunmadığı, etken olabilmesi için yüksek dozlarda uygulanması gerektiği fakat bu dozların normal dokularda toksik etki yarattığı saptanmıştır [133]; bu sebeple DFMO'ya olan ilgi kaybolmuştur. Fakat 1993 yılında ODC ve c-Myc onkogeni arasındaki ilişkinin ortaya konulması ile DFMO tekrar kanser araştırmalarında gündeme gelmiştir [134]. ODC'nin c-Myc onkogeninin transkripsiyonel bir hedefi olduğu anlaşılmış [135, 136], aynı zamanda ODC'nin de c-Myc'in anlatımını artırdığı gösterilmiştir [137]. Son yıllarda DFMO ile ilgili yapılan araştırmalar, uzun zaman süresince düşük dozlarda DFMO uygulamasının epitel kökenli hücrelerde hücre PA miktarını düşürdüğü ve ciddi yan etkilerin görülmediği sonucuna varılmıştır. Kolon, özafagus, meme ve prostat kanserlerinde DFMO'nun etkisi halen araştırılmaktadır.

Yapılan çalışmalar genelde DFMO ile çeşitli kemoterapötik ajanların kombine edilmesi üzerinedir. Kanser tedavisinde kombine terapi için önerilen diğer bir ajan da steroid kökenli olmayan anti-inflamatuar ajanlardır (NSAID) [138, 139]. NSAID'lerin, PA'ların hücre dışına atılmasını PA katabolizmasını hedef alarak gerçekleştirdikleri gösterilmiştir [140].

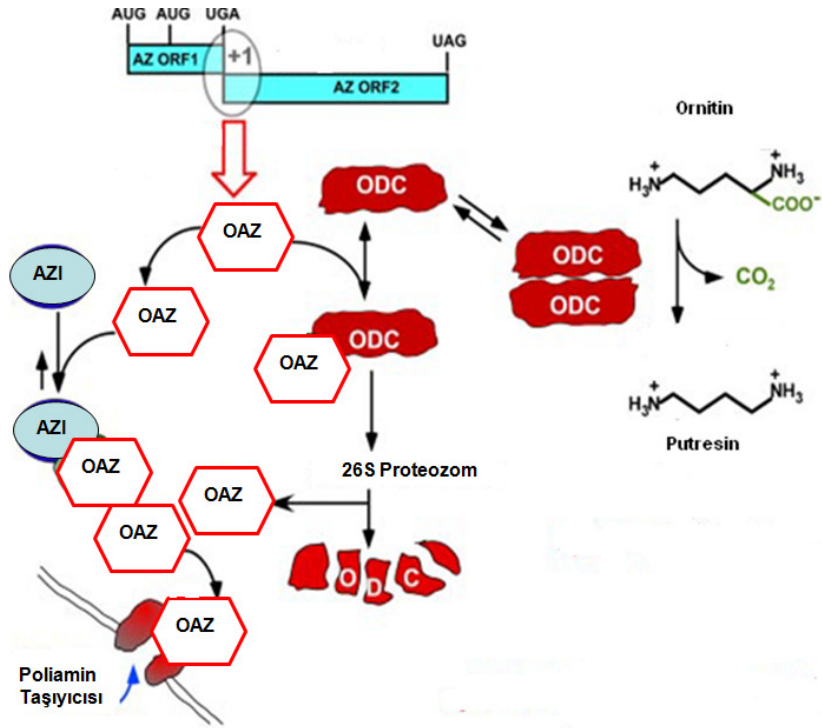
ODC, belirtildiği gibi hücrelere büyümeyi uyaran hormon, büyüme faktörleri, mitojenler ve tümör indükleyicilerle aktive olabilen bir protein olarak tanımlanmıştır. ODC'nin fazla anlatımının hücre transformasyonunu tetiklediği ve bir protoonkogen olabileceği de ileri sürülmüştür [141]. Bu yüzden ODC anlatımı da hücre içinde iyi düzenlenmiştir. Bu düzenlenme hem PA geribildirim mekanizması ile olmakta, hem de post-transkripsiyonel olarak gerçekleşmektedir. PA'lar, translasyonel ve post-translasyonel düzeyde ODC'nin geribildirim mekanizması ile yapımını kontrol etmektedirler. Yüksek PA düzeyi ODC aktivitesini engellemekte, tam tersi olarak düşük PA düzeyi ise ODC aktivitesini artırmaktadır [142]. Post-transkripsiyonel düzenlenme ise ODC mRNA'sının son kısmında bulunan GC bakımından zengin 5' translasyonu gerçekleşmeyen bölgenin (5' UTR), ODC'nin translasyonunu negatif yönde etkileyebileceği hipotonik stres koşulları altında gösterilmiştir [143]. ODC aktivitesi aynı zamanda hücre içinde ODC antizim (OAZ) ve antizim inhibitör (AZI) isimli iki önemli enzim ile çok sıkı bir şekilde düzenlenmektedir.

ODC fazla anlatımının ve yüksek ODC aktivitesinin neoplastik transformasyonu tetikleyerek kanser oluşumuna neden olması ODC'yi hedef olan inhibitörlerin geliştirilmesini sağlamıştır. Bunun yanı sıra ODC'nin hücre içinde nasıl düzenlendiği birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir [144]. Bir önceki kısımda bahsedilen PA geribildirim mekanizması ve post-transkripsiyonel düzenlenme dışında ODC'nin aktivitesinin OAZ tarafından düzenlendiği ortaya konulmuştur [145]. OAZ, ODC mRNA'sında açık okuma alanı 1 (open reading frame 1, ORF1) ve ORF2 füzyonu arasında bir çerçeve kayması ile translasyonu gerçekleşen ve yüksek PA seviyesi ile transkripsiyonu tetiklenen bir proteindir (Şekil 2.9).

OAZ'ın doğrudan ODC'ye bağlandığı ve oluşan OAZ-ODC kompleksinin 26S proteazom adı verilen ve proteinlerin peptid bağlarını kırarak degrade olmalarını sağlayan proteozom tarafından yıkıldığı gösterilmiştir (Şekil 2.9) [146]. ODC'nin 26S proteozoma OAZ ile bağlanması sonrası nasıl yönlendiği araştırılmış ve bu yönlendirmenin ubiquitinasyon adı verilen ve yıkılacak olan proteinlerin proteozoma yönlenebilmesi için takılan ubiquitin regülatör proteininin dışında olduğu bulunmuştur. Diğer bir ifade ile, ODC yıkımı için ubiquitinlenme söz konusu değildir [147]. Bunun yerine ODC ile kovalent olmayan bir bağ yaparak bağlanan OAZ, ODC'yi 26S proteozoma doğrudan yönlendirmektedir. Proteozomun ODC'yi yıkabilmesi için, ODC'nin karboksil ucunda COOH terminal bölgesinin varlığının gerekli olduğu da Coffino ve diğ. [148] tarafından gösterilmiştir.

OAZ'ın aktivitesi de bir başka protein tarafından kontrol edilmektedir. Antizim inhibitörü (AZI) olarak adlandırılan ve 1982 yılında Fujita ve diğ. [149] tarafından keşfedilen protein, dolaylı olarak da ODC'nin düzenlenmesinde rol almaktadır. AZI'nın AZ'ye olan ilgisi, ODC'nin AZ'ye olan ilgisinden daha fazla olarak tespit edilmiş ve bu sayede AZI'nın AZ-ODC kompleksini bozarak direkt olarak AZ'ye bağlandığı ve ODC'nin serbestlenerek proteozomal yıkıma uğramadığı gösterilmiştir (Şekil 2.9) [150, 151]. AZI ve ODC proteinlerinin amino asit dizilerinin yüksek homoloji gösterdiği, aralarındaki farkın ise AZI'nın ODC gibi dekarboksilasyon sağlayan aktif bölgesinin olmaması olarak açıklanmıştır [152].

AZI'nın AZ'yi ve dolayısıyla ODC aktivitesini düzenliyor olması bu proteinin hücresel PA düzeyi ve hücre büyümesinde rolü olabileceğini ortaya koymuştur [153]. Ayrıca AZI'nın prostat, mide, deri kanserlerinde fazla anlatımı gösterilmiştir [154-156].



Şekil 2. 9. Ornitin dekarboksilazın, ornitin dekarboksilaz antizim ve antizim inhibitörü ile düzenlenmesi. Pegg [147]

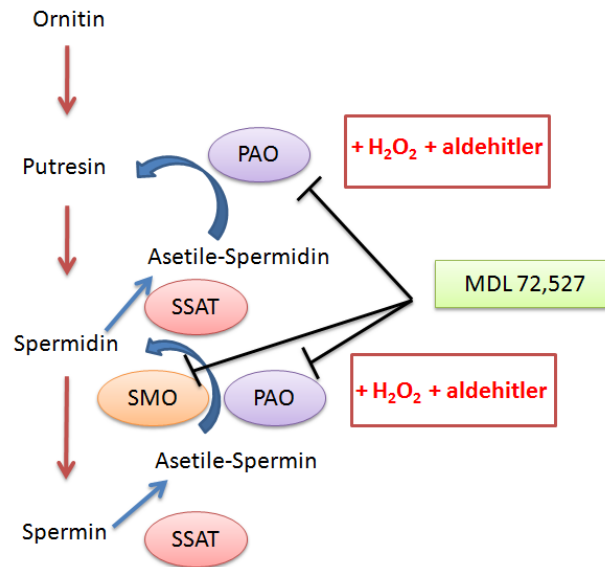
2.3.3.2. S-Adenozil metiyonin Dekarboksilaz Yolağı

PA'lar üre siklusunda görevli ornitinden ODC enzimi katalizörlüğünde elde edilebildiği gibi, AdoMet'i kullanılarak da elde edilebilmektedir. SAMDC'nin AdoMet'i dekarboksilleyerek, dekarboksile AdoMet (dcAdoMet) formuna dönüştürmekte ve bu reaksiyon sonucunda karbondioksit (CO_2) açığa çıkmaktadır. dcAdoMet, Spd sentaz ve Spm sentaz enzimleri için substrat oluşturmakta ve meydana gelen reaksiyonlarda dcAdoMet aminopropil gruplarını kaybederek Spd ve Spm'ye dönüştürülmektedir. SAMDC insanda 38 kiloDalton (kDa)'luk inaktif proenzim olarak sentezlenip, otolitik kesime uğrayarak aktif hale gelmektedir. Enzim aktivitesi transkripsiyonel, post-transkripsiyonel, translasyonel ve proenzim olarak üretilmesi dolayısı ile sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. SAMDC aktivitesi hücre tipine, büyüme oranına ve hücre içi PA düzeyine göre değişiklik göstermektedir [157].

SAMDC inhibitörlerinden metilglioksal-bis(guanilhidrazon) (MGBG) 1990'lı yıllarda özellikle melanoma, akciğer, meme, PKa türlerinde potansiyel anti-kanser ajan olarak özellikle *in vitro* çalışmalarla desteklenmiş [158, 159] fakat hücresel PA'ların üretilmesinde daha çok ODC yolağının kullanıldığından anlaşılmasından sonra anti-kanser terapi odaklı olarak ODC inhibitörü DFMO daha çok dikkat çekmiştir.

2.3.4. Poliamin Katabolizması

PA katabolizması, PA homeostasisının kontrol edilmesi ve terapötik ilaçlara etkin cevap oluşturulması görevlerine sahiptir. Özellikle anti-kanser ilaçlara karşı oluşan cevapta oynadığı rollerle ilaç tasarımı açısından önemli bir hedef haline gelmiştir. PA katabolizması iki aşamadan oluşan bir süreçtir. Bu sürecin ilk basamağı bir asetiltransferaz enzimi olan SSAT ile düzenlenirken, ikinci basamak ise bir oksidasyon enzimi olan PAO enzimi ile düzenlenmektedir (Şekil 2.10). İkinci basamakta PAO enziminden başka SMO enzimi, Spm'nin okside edilmesinde görev almaktadır (Şekil 2.10). PA katabolik enzimleri görevlerini yerine getirirken açığa reaktif oksijen türleri ve başka toksik yan ürünler açığa çıkmaktadır.



Şekil 2. 10. Poliamin katabolizma yolağı.

2.3.4.1. Spermidin-Spermin Asetil Transferaz

PA biyosentez yolağının geri dönüşümsüz olarak işlemekte olduğu ortaya konulmuş fakat Spd ve Spm'in Put'e geri dönüşümünün SSAT ile mümkün olduğu gösterilmiştir [9]. SSAT, Spd ve Spm'in N¹ pozisyonuna asetil koenzim A'dan aldığı asetil grubunu transfer etmekle görevlidir. Bu şekilde asetile PA'lar oluşmaktadır. Asetile poliaminler hücreden doğrudan olarak atılabilir, ya da PAO için substrat oluşturabilirler. SSAT anlatım düzeyinin özellikle toksik ajanlar, büyüme faktörleri, PA'lar tarafından tetiklendiği gösterilmiştir [9]. İnsanda SSAT proteini X kromozomu üzerinde bulunan *SAT1* ve *SAT2* ile kodlanmaktadır. *SAT1*'in kodladığı SSAT altı ekzon tarafından kodlanan 20 kDa'luk SSAT proteinini kodlamaktadır [160]. *SAT2*'nin kodladığı SSAT2 ise poliamin katabolizmasında önemli rol oynamamaktadır [161].

SSAT anlatımının, PA'ları taklit eden dietilnorspermin (DENSp_m), bis(etil)norspermin (BENSp_m) gibi PA analogları ile arttığı gösterilmiştir [162]. PA analogları ile meme, melanoma ve akciğer kanserlerinde SSAT transkripsiyonunun arttığı gösterilmiştir [163-165]. Coleman ve diğ. [166], SSAT aktivitesindeki bu artışın nedeni olarak PA ve PA analoglarının, enzimi stabilize ederek yarı ömrünü uzattıkları ve aynı zamanda ubiquitinasyonunu engelleyerek proteozomal yıkımdan korudukları şeklinde açıklamışlardır. Ayrıca, SSAT anlatımının çeşitli transkripsiyon faktörlerinin kontrolü altında olduğu gösterilmiştir. Bu transkripsiyon faktörleri SSAT geninin promotor bölgesinde 5'TATGACTAA3' dizisine bağlanmaktadır [167]. Bu dizi PA cevap elementi (PRE) olarak da isimlendirilmektedir. PA analoglarının, NF-E2 ile ilişkili transkripsiyon faktörü-2 (Nrf-2) ve bir kofaktör olan PA-değiştirici faktör 1 (PMF-1) adı verilen faktör ile SSAT anlatımını tetikleyebildikleri gösterilmiştir [168]. SSAT anlatımının Nrf-2 dışında, nuklear faktör kappa B (NFkB) ve peroksizom proliferatörle aktive olan reseptör (PPAR γ) gibi başka transkripsiyon faktörleri tarafından da anlatımının tetiklenebildiği ortaya konulmuştur. SSAT anlatımı ve aktivitesinin PA ve PA analogları dışında çeşitli kemoterapötik ajanlarla da tetiklenmektedir. Bu ajanlar arasında sulindac gibi NSAID'ler, 5-fluorurasil (5-FU), platin türevli kemoterapötikler bulunmaktadır. Bu ajanlardan sulindac, PPAR γ ile; aspirinin ise NFkB transkripsiyon faktörü aracılığı ile kolon kanseri hücrelerinde SSAT anlatımını tetiklediği

gösterilmiştir [169, 170]. 5-FU'nun ise HCT116 kolon kanseri hücrelerinde SSAT anlatımını artırarak apoptozu tetiklediği bildirilmiştir [171]. SSAT anlatımı ve aktivitesindeki artışın hücre büyümesi ile ters orantılı olduğu ve apoptotik hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir. Chen ve diğ. [12] SK-MEL-28 melanoma hücreleri ile yaptıkları çalışmada PA analogları uygulamasını takiben SSAT anlatımının artmasının, apoptozun erken evre düzenlenmeleri için gerekli olduğunu göstermişlerdir.

Tüm bu sonuçlar PA metabolizmasını hedef alan PA analogları dışında kalan çeşitli kemoterapötik ajanların, hedef aldıkları moleküler mekanizma haricinde, PA katabolizmasını da devreye sokarak, etkilerinin artmasına neden olduklarını göstermektedir. Özellikle kanser terapisinde klasik kemoterapötik ajanlarla, PA metabolizmasını hedef alan ajanların kombine edilmesi umut verici sonuçları ortaya çıkarmaktadır.

2.3.4.2. Poliamin Oksidaz

İlk defa 1977 yılında Holtt tarafından sıçan karaciğerinden saflaştırılan PAO, SSAT tarafından asetile edilen Spd ve Spm'yi oksitleyen bir enzimdir [172]. Bir diğer ifade SSAT Spd ve Spm'yi asetilleyerek, asetile PA'ları PAO için substrat haline getirmektedir. PAO asetile Spd'i oksitleyerek Put'e, ya da asetile Spm'yi oksitleyerek Spd'e dönüşümü katalizler. Bu işlem sırasında N-asetil-3-aminopropanal ve hidrojen peroksit (H_2O_2) açığa çıkmaktadır [173]. Wu ve diğ., [174] insanda PAO enzimini 511 amino asitten oluşan bir protein olarak tanımlamışlardır. PAO'nun asetile PA'ların yanı sıra DENSpm, sikloheptilmetil-diazaundekan (CHENSpm) gibi PA analoglarını da okside edebildiği gösterilmiştir [175, 176]. Wang ve diğ., [177] PAO fazla anlatımı yapan A549 akciğer kanseri hücreleri ile yaptıkları çalışmada, hücrelerin PA analoglarına karşı dirençli hale geldiklerini ortaya koymuşlardır. 1985 yılında Bey ve diğ., [178] PAO'nun aktivitesini anlayabilmek için N^1 , N^4 -bis (butadenil)-1,4-diaminobutan (MDL 72,527) isimli inhibitörü ilk kez tanımlamışlardır. MDL 72,527 aynı zamanda bir diğer PA oksidaz olan SMO'yu da inhibe edebilmektedir [179].

2.3.4.3. Spermin Oksidaz

SMO, PA katabolizma enzimleri arasında en son keşfedilen enzimdir. Spm'nin Spd'e dönüştürülmesini katalizlemektedir. Bu reaksiyon sonucunda 3-aminopropanal ve H₂O₂ açığa çıkmaktadır. SMO insanda 20. kromozom üzerinde bulunmaktadır. 555 amino asitlik 61 kDa ağırlığında SMO proteinini kodlamaktadır [180]. Akciğer kanseri hücrelerinde, bir çok PA analogunun SMO anlatımını, SMO transkripsiyonunu ve mRNA yarı ömrünü iki kat artırarak tetiklediği gözlemlenmiştir [181]. Devereux ve diğ. [179], Spm'nin SMO ile okside edilmesi sonucu açığa çıkan H₂O₂ ile apoptozun indüklendiğini ileri sürmüşlerdir. PAO'dan farklı olarak SMO'nun, PA analoglarını hücre içinde okside ederek etkilerini azaltmadığı ortaya konulmuştur [180].

2.3.5. Poliamin Taşınması

PA'ların memeli hücrelerinde halen tam olarak nasıl bir mekanizma ile hücre içine alındıkları bilinmemekle beraber çeşitli organizmalarda yapılan çalışmalar mevcuttur. Bir parazit olan *Leishmania major*'da bir PA permeaz keşfedilmiştir [182]. Bununla beraber diammin ve PA transport aktivitesi memelilerde, her doku ve hücre tipinde tespit edilmiştir [183]. Genellikle yüksek miktarda PA'nın hücre içine alınması aktif hücre çoğalması ve tümörijenik transformasyon ile uyumluluk göstermektedir. Memeli PA taşınmasının, mitozun teşvik edilmesi ile ve ODC ile birlikte arttığı gösterilmiştir [184]. PA'lar insanlarda farklı yollarla hücrelere alınır. Bu yollar:

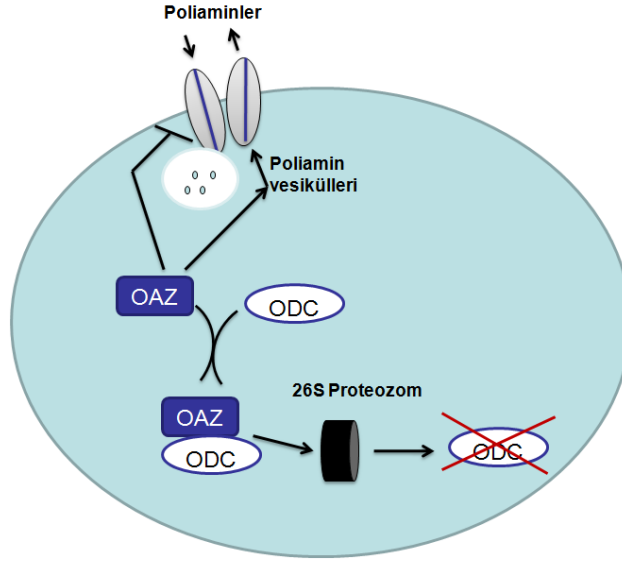
- 1- Diyet
- 2- Gastrointestinal mikroflora
- 3- Dokular arası taşıma

Günlük diyetle insanlar besinlerden yeterli derecede PA almaktadırlar. Farklı besinlerin PA içerikleri çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir [185]. Bağırsaktan pasif difüzyonla alınan PA'lar bütün dokulara ulaşabilmekte ve dokular arasında da taşınabilmektedirler. 1987 yılında Byers ve diğ. [186], memelilerde hücre membranında iki çeşit PA taşıyıcısı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bunlardan biri Put, diğeri Spd ve Spm için geçerli taşıyıcılar olarak gösterilmiştir. Bu taşıyıcıların Ca⁺², Mg⁺², Mn⁺²'ye ihtiyaç duydukları

ileri sürülmüştür. 1995 yılında ise Lessard ve diğ. [184], PA'ların ortak bir taşıyıcısı olduğunu ileri sürmüşlerdir. PA taşıyıcıları için araştırmalardan çeşitli sonuçlar elde edilmiştir. Kesin olarak bilinen ise DFMO ile Put ve Spd azalmasının, PA alımını artırdığı ve belirli PA düzeyinden sonra hücre içine alımın durduğu yönündedir. Bu geribildirim mekanizmasının ise OAZ ile sağlandığı ortaya konulmuştur (Şekil 2.10) [187]. Son olarak Soulet ve diğ. [188], floresan madde ile işaretleyerek PA'ların, hücre içine reseptörleri ile bağlanarak, reseptör aracılı klatrin örtülü olmayan PA taşıyıcı vesiküller ile taşındıklarını ortaya koymuşlardır (Şekil 2.11).

Vesiküllerin kapasitesinin ve PA taşıyıcılarının ifade düzeylerinin OAZ ifadesini de aynı şekilde uyardığı ve tam tersi olarak PA seviyelerinin azalmasının ise OAZ ifadesini azalttığı Poulin ve diğ. [189] tarafından ileri sürülmüştür. OAZ'ın plazma membranı ve PA taşıyıcı vesiküller ile doğrudan bağlantılı olabileceği yine Poulin ve diğ. [189] tarafından ele alınmıştır.

PA'ların hücre içine alındıktan sonra nerede konumlandıkları ise bir diğer araştırma konusu olmuştur. Hücredeki dağılımları genellikle sitoplazmik olarak düşünülürken, Watanabe ve diğ. [190], Spd ve Spm'nin DNA, ribozomal RNA, transfer RNA'ya bağlı olarak bulunduklarını ve çok az bir kısmının ise makromoleküllere bağlı bulunduklarını göstermişlerdir.



Şekil 2. 11. Poliaminlerin hücrede taşınması.

2.3.2. Poliaminlerin İşlevleri

PA'ların insan hücrelerinde çeşitli etkileri gösterilmiştir. Bunların arasında nükleik asitlerle etkileşim, protein sentezi, hücre devrinin ilerlemesi ve hücre çoğalması gibi önemli olaylar yer almaktadır. PA'lar katyonik özellikte olduklarından negatif yüklü yapılara bağlanma eğilimindedirler. DNA, RNA, protein ve negatif yüklü fosfolipidlerle bağlanabilmektedirler. Aynı zamanda katyon kanallarında da düzenleyici olarak görev almaktadırlar. PA'lar ribozomları, membranları, nükleik asitleri stabilize ederek hücreleri lipid peroksidasyonundan ve serbest radikallerden korumaktadırlar .

2.3.2.1. Gen Anlatımındaki Fonksiyonları

PA'lar özellikle DNA'ya bağlanma özelliğindedir. DNA üzerinde yer alan fosfat gruplarını nötralize ederek ve DNA'nın erime noktasını yükselterek, DNA'yı stabilize etmektedirler [191, 192]. Ayrıca Spd ve Spm'nin kromozomlarla doğrudan bağlantı halinde oldukları immunohistokimyasal çalışmalarla ele alınmıştır [193]. PA biyosentezi inhibe edildiğinde kromatinlerin nükleazlara karşı hassas olduğu gösterilmiştir [194]. PA'ların aynı zamanda DNA ile doğrudan etkileşimi de söz konusudur. PA'lar bu etkileşimle DNA'nın konformasyonel değişimini sağlayabildikleri gibi (B-DNA'dan Z-DNA'ya dönüşümü tetiklemektedirler) [195], gen anlatımına da etki etmektedirler. Bu etki ise genellikle transkripsiyon faktörlerinin

DNA'ya bağlanmasını koordine etmeleri sayesinde gerçekleşmektedir. Örnek olarak ER aynı zamanda gen anlatımını koordine eden bir transkripsiyon faktörüdür ve bu reseptörün gen anlatımını başlatabilmesi için özellikle Z-DNA formunda PA'ların gerekli olduğu gösterilmiştir [196]. Ayrıca PA'ların HSP ve aktivatör protein-1 (AP-1) adı verilen ve hücrede bölünme, strese karşı cevap oluşturma, sağ kalım, apoptoz gibi çok önemli olayları koordine eden transkripsiyon faktörleri için de gerekli oldukları ortaya konulmuştur [197]. Aynı zamanda transkripsiyon faktörü E3, transkripsiyon baskılayıcı protein 1 gibi transkripsiyon faktörlerinin DNA ile olan etkileşimleri için de PA'ların varlığı gereklidir [198].

2.3.2.2. Protein Sentezindeki Fonksiyonları

PA'ların protein sentezinin düzgün bir şekilde gerçekleşmesi için gerekli olduğu 1985 yılında Höltta ve Hovi tarafından [199] ortaya konulmuştur. Lenfositlerde gerçekleştirdikleri çalışmada, DFMO ile PA biyosentezini engellediklerinde protein sentezinin azaldığını, aynı zamanda protein sentezi sırasında oluşan poliribozom yapısının baskılandığını göstermişlerdir. 1985 yılından bu yana PA'ların proteinler ve protein sentezi üzerine etkisi konusunda pek çok araştırma yapılmış ve 2000 yılında Igarashi ve Kashiwagi [200] PA'ların RNA'lar ile kompleks halinde bulunduğunu ve protein sentezini birçok farklı aşamada etkilebileceklerini ortaya koymuşlardır; bu aşamalar mRNA, 30S ribozomal alt ünitelerin bir araya gelmesi ve tRNA oluşumudur.

Diğer yandan, Spd'nin ökaryotik hücrelerde translasyon başlatıcı faktör 5A'nın (eIF-5A) öncü maddesi olduğu gösterilmiştir. eIF-5A arkelerden memelilere kadar korunmuş bir proteindir [201]. eIF-5A'nın translasyonu başlatabilmesi için post-translasyonel değişimler geçirmesi gerekmektedir. Bu değişimlerden en önemlisi hipuzinlenmedir. Hipuzinlenme eIF-5A'nın lizin rezidülerinde gerçekleşen bir reaksiyondur. Hipuzinlemenin gerçekleşmesi için Spd'ye ihtiyaç vardır. Deoksihipuzin sentaz enzimi Spd'yi keserek 4-aminobutil kısmını eIF-5A'nın amino grubundaki lizine transfer ederek deoksihipuzin yapımını sağlar. Deoksihipuzin hidroksilaz enzimi ise deoksihipuzine bir hidroksil grup ekleyerek hipuzinin son halini almasını sağlar. Buradan yola çıkarak Spd'nin eIF-5A'nın işlevini yerine getirmesi ve dolayısı ile translasyon için önemli bir molekül olduğu ortaya konmuştur [202, 203].

2.3.2.3. Hücre Çoğalmasındaki Fonksiyonları

Yapılan çalışmalar PA biyosentezinde görevli enzimlerin anlatımlarının hücre büyümesi ve bölünmesi ile ilgili olduklarını göstermiştir. Özellikle transforme olmuş malign meme, prostat gibi tümör hücrelerinde hücre PA düzeyleri ve ODC protein ifadesi artışı bulunmuştur [204, 205]. Aynı zamanda hücre içi PA havuzunun azalması veya ODC'nin DFMO ile baskılanması hücre büyümesine ket vurmuştur [206]. Bununla birlikte PA katabolizmasında da meydana gelen veya PA'ların hücre içine alımı, ya da dışına atılımında rol oynayan OAZ anlatımındaki aksaklıkların yine PA metabolizmasının hücre çoğalması için önemli moleküller olduklarını göstermektedir.

PA'ların hücre çoğalmasına etkileri birçok açıdan ele alınabilmektedir. Örnek olarak PA biyosentez enzimi ODC'nin onkogenik özellikteki c-myc ile transkripsiyonun arttığı, yani c-Myc'in transkripsiyonel hedeflerinden biri olduğu gösterilmiştir [135]. C-myc'in hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını tetiklediği bilinmektedir ve pek çok kanserde fazla anlatımı belirlenmiştir [207, 208]. PA'lar, hücre çoğalmasını hücre döngüsünü etkileyerek gerçekleştirmektedirler. DFMO uygulaması ile hücre PA düzeyleri azaltıldığında, kolon, meme ve PKa hücrelerinin hücre döngüsünün farklı evrelerinde durdukları tespit edilmiştir [209, 210]. PA eksikliğinin, hücre devrini p21^{WAF1/CIP1} ve p27^{KIP1} gibi sikline bağlı kinaz inhibitörlerini aktive ederek durdurduğu belirlenmiştir [211, 212]. Aynı zamanda PA'ların, hücre döngüsünü kontrol eden ve tümör baskılayıcı protein olan p53 ile etkileşimde olduğu gösterilmiştir. Bağırsak hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar DFMO ile hücre içi PA havuzu indirgendiğinde, p53 anlatımının arttığını, hücrelerin hücre döngüsünün G₁ fazında durduğunu ortaya koymuşlardır [213, 214].

PA eksikliği, hücre döngüsüne ket vuran proteinlerin dışında, döngünün doğru bir şekilde ilerlemesini sağlayan siklinlerin protein ifadeleri üzerine de etki etmektedir. PA analogları veya DFMO uygulanan meme ve serviks kanseri hücrelerinde siklin A, B1, D1 protein ifadelerinde değişimler gözlemlenmiştir [215, 216]. Buna ek olarak PA biyosentezinin hücre döngüsü boyunca bifazik olarak değiştiği ve G₁/S, S/G₂ geçiş noktalarında biyosentez enzimi ODC'nin en yüksek ifadeye sahip olduğu Oredsson

[217] tarafından ele alınmıştır. DFMO varlığında siklin A ifade düzeyinin azaldığı ve buna bağlı olarak hücre döngüsünün DNA replikasyon fazı olan S fazına girmesini sağlayan siklin A/sikline bağımlı kinaz 2 (CDK2) kompleksinin oluşmadığı ve hücre çoğalmasının durduğu aynı çalışmada ele alınmıştır. PA konsantrasyonunun hücre döngüsünde önemli hücresel kontrol noktalarının hem pozitif ve hem de negatif yönde düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiş ve PA konsantrasyonunun döngü boyunca kontrol edilmesi gerektiği belirtilmiştir [218].

2.3.6. Poliamin Homeostazı ve Prostat Kanseri

17. yüzyılda Van Leeuwenhoek tarafından insan semeninde en önemli üç PA'dan biri olan Spm tanımlanmıştır. Prostat dokusu ve prostatik salgılar PA'ların tanımlanmasında o zamandan beri önemli olmuşlardır. İnsan vücudunda diğer organlara oranla PA konsantrasyonu en fazla prostat dokusunda bulunmaktadır. Sıçan prostatı üzerinde Fjosne ve diğ. [219] tarafından yapılan çalışmalar prostatik PA'ların androjenlerin kontrolü altında olduğunu ortaya koymuştur. Prostat hiperplazisi ve kanserinde, hücre PA ve ODC düzeyi kayda değer bir şekilde yüksektir [220]. Pek çok araştırma, ODC mRNA ve aktivitesinin androjenlerle indüklendiğini ortaya koymuştur [221, 222]. Androjenler ve ODC anlatımı arasındaki bağlantı ise sıçan ODC geni üzerine yapılan çalışmalarla elde edilmiştir. *ODC*'nin promotör bölgesinde androjene-cevap-elementi-benzeri dizinin yer aldığı ve AR'nin bu bölgeye bağlanarak ODC anlatımını tetiklediği gösterilmiştir [221]. Buradan yola çıkarak ODC aktivitesinin DFMO ile inhibe edilmesi, tümör kütesinin küçülmesine, testosteronla veya IGF-1'la indüklenen prostat büyümesinin bloke edilmesine neden olmuştur [223]. Ayrıca, Schipper ve diğ.[14], dört farklı insan PKa hücre hattında (PC3, TSU-pr1, DU145 ve JCA-1) PA homeostazını araştırmışlar ve PC3 ile TSU-pr1 gibi yüksek malignite gösteren hücre hatlarında, daha yüksek PA ve ODC düzeyine, düşük SSAT aktivitesine sahip olduklarını göstermişlerdir. Bunun yanı sıra 1998 yılında Shantz ve Pegg [224], ODC'yi bir protoonkogen olarak varsaymışlar ve PA'ların ve metabolik enzimlerin PKa teşhis ve tedavisinde potansiyel hedefler olduklarını ileri sürmüşlerdir. Schipper ve diğ.'de [225] farklı evrelerdeki prostat tümörü biyopsilerinde ODC ifade düzeylerini araştırmış ve hızlı büyüyen tümörlerde ODC anlatımını en fazla olarak bulmuşlardır. Buradan yola

ıkararak ODC'yi PKa'da bir biyobelirteç olarak işaret etmişlerdir. Aynı zamanda yine farklı tümörlerde PA düzeylerini ölçmüşler ve tümörlerdeki Spm seviyeleri ile biyopsilerin farklılaşma ve malignitesinde paralellik tespit etmişlerdir. Bu nedenle, tümör Spm düzeyindeki artışın da PKa biyobelirteci olarak klinikte kullanılması ne sürülmüştür.

PA'lar ya da PA'ların asetile formları hücreler tarafından salgılanabilmektedirler. Sirküle olan PA'lar başka hücreler tarafından alınıp tekrar kullanılabilirler. PA'ların bir kısmının kandaki lipoproteinler ve anti-poliamin antikorları tarafından taşındığı ne sürülmüştür. Fakat Moulinoux ve diğ. [226], sirküle olabilen Spd ve Spm'nin % 95'ten fazlasının kırmızı kan hücreleri ile taşınabildiklerini göstermişlerdir. Aynı zamanda, yine aynı çalışma ile kırmızı kan hücrelerindeki PA düzeylerindeki artışı PKa ile ilişkilendirmiştir.

PA'lar aynı zamanda PKa tümörlerinin görüntülenmesi için de kullanılmıştır. İntervenz olarak sıçanlara verilen radyoaktif işaretli ¹⁴C- Put'in prostat dokusunda biriktiği ilk olarak 1975 yılında Clark ve Fair [227] tarafından gösterilmiştir. Pozitron emisyon tomografisi yöntemi ile daha hassas bir şekilde tümör görüntülenmesi yapılmaya başlandığı yıllarda floresan etiketli Put kullanılarak PKa görüntülenmiş fakat izotopun sağlıklı prostatı da işaretlemesi Put'un PKa için bir biyobelirteç olamayacağını göstermiştir [228].

PKa gelişiminde PA'lar önemli bir yer teşkil etmektedir. Bu nedenle PA homeostazının tümör hücrelerinde bozulmasını hedef alan kemoterapötikler üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Bu alışmalarda PA biyosentez inhibitörleri DFMO ve MGBG zerine yoğunlaşılmış ve *in vitro*'da hücre çoğalmasına ket vurma ve hücreleri apoptotik lme götürme konusunda cevaplar alınmasına karşın *in vivo* koşullarda başarılı sonuçlar alınamamıştır. Bunun ana nedeni olarak, bu bileşiklerin PA enzimlerinin yıkılmasındaki yetersizlikleri, tek bir inhibitörün tüm hücre içi PA'ları indirgeyememesi ve bu nedenle hücre içi PA havuzunun yinelenmesi gösterilebilir [229]. Bu nedenle son dönemde amaç hem hücre içi PA'ların konsantrasyonunu indirgeyen hem de PA katabolizma

enzimlerini indükleyerek hücre içi PA düzeyinin azalmasını sağlayan kemoterapötiklerin keşfi yönündedir; son yıllarda bu amacı hedefleyen PA analogları üzerine çalışılmaktadır.

PA analogları, PA biyosentezini engelleyip katabolizma enzimlerini uyarak hücreSEL doğal PA miktarının azaltılmasını hedef alan ajanlardır. Bu zamana kadar en iyi cevap alınan PA analogları genellikle Spm'nin bis (etil) analoglarıdır. Bu bileşiklerin apoptotik etkileri akciğer, melanoma, prostat, kolon, meme, beyin kanserleri hücre hatlarında gösterilmiştir. Örnek olarak PKa hücre hatları PC3 ve DU145'te 1,12-diaziridinil-4,9-diazadodekanın (BIS), apoptozu tetiklediği belirtilmiştir [230]. Bunun dışında, PA analoglarından (N1,N12-bis(etil)spermin (BESpm) ve N1-etil-N11-[(siklopropil)-metil]-4,8-diaza-andekan (CPENSpm)) ise akciğer ve meme kanseri hücre hatlarında etkili olmuşlardır [230]. Son yıllarda sıklıkla PKa'ya karşı kullanılan bir diğer analog da DENSPm'dir. Farklı PKa hücre hatları üzerinde DENSPm'nin mikromolar konsantrasyonları hücre çoğalmasını engellemiştir [225, 231]. Bununla birlikte kullanılan PA analoglarında karşılaşılan problemlerden biri de normal hücrelerde meydana getirdikleri toksisitedir. Halen bilim dünyası normal dokulara daha az zarar verip sadece malign dokuları hedef alan kemoterapötiklerin arayışı içerisinde.

2.4. APOPTOZ

Çok hücreli organizmalarda istenmeyen ya da biyolojik potansiyelini yitirmiş hücrelerin elimine olması normal gelişim ve homeostazın sağlanması için gereklidir. Programlanmış hücre ölümü bu istenilmeyen ve ölen hücrelerin morfolojik karakteristik özelliklerine bakılarak ortaya çıkan bir terimdir. Bu morfolojik özellikler hücre büzülmesi, kromatin kondensasyonu ve plazma membranının bozulması şeklindedir. 1972 yılında ilk kez Kerr ve diğ. [232] dokuların normal gelişimleri süresince kinetiklerini belirleyen hücre ölüm tipine "apoptoz" adını vermişlerdir. Bu alanda yapılan çalışmalar apoptozu yöneten birçok molekülün türler arasında korunduğunu fakat yüksek organizmalarda daha kompleks mekanizmaların yer aldığını açığa çıkarmıştır.

Apoptoz embriyonik evre gelişimi ve doku homeostazının korunmasında çok önemli fizyolojik roller oynamaktadır. Normal şartlarda çok hücreli organizmalarda hücre hasarlarının bloke edilmesi ya da hücrenin tamamen yok edilmesi apoptotik mekanizma ile gerçekleşmektedir. Apoptotik ölümden meydana gelen aksaklıklar kanser, nörodejeneratif ve otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Apoptotik hücre ölümünün tetiklenip tetiklenmemesi hasarın boyutuna, hücrenin tipine bağlı olarak gelişmektedir.

Apoptoz sırasında gözlemlenen morfolojik değişimler karmaşık moleküler mekanizmalarla düzenlenmektedir. Bu moleküler mekanizmaların aydınlatılması basit yapıları canlılardan bir nematod olan *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) ya da meyve sineği *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*)’de gerçekleştirilmiştir. Özellikle doku homeostazında apoptozun rolü *C.elegans*’daki çalışmalarla ortaya konulmuştur. *C.elegans*’da erişkin birey oluşurken 1090 hücreden 131’i apoptoz yolu ile ortadan kaldırılmakta ve burada *Ces*, *Egl* ve *Ced* gibi genlerle kodlanan çeşitli proteinler fonksiyonellik göstermektedirler [233]. Özellikle CED protein ailesi apoptotik mekanizmayı başlatan CED-4, CED-9 ve devam ettiren CED-3 gibi proteinleri içermektedir [234]. İnsanda ise bu genlerin homologları tanımlanmış ve apoptozu yönlendiren proteinler ve sinyal mekanizmaları aydınlatılmıştır.

Apoptik hücre ölümü dışında başlıca iki tip hücre ölümü tanımlanmıştır. Bunlardan “nekrotik ölüm”, bir veya daha fazla sayıda hücrenin, dokunun ya da organın çeşitli hasarlara maruz kalması sonucu görülen patolojik ölüm, apoptozdan farklı bir şekilde ilerlemektedir. Nekrotik hücreler ani toksik etkiler sonucu hücre zarının geçirgenliğinin ve osmotik dengesinin bozulması, hücrenin şişerek hücre içeriğinin dış ortama dağılması ile karakterize edilir. Bu durum nekrotik hücre ölümünün meydana geldiği ortamda inflamasyon oluşması ile devam etmektedir. İnflamasyon, hücre parçalanması sonucu uyarılan damar endotelinden geçerek nekrozun olduğu bölgede kümelenen lökositler ile tetiklenmektedir [235].

Hücre ölümü tiplerinden bir diğeri ise “otofaji” olarak adlandırılan, hücre içinde uzun ömürlü makromoleküllerin ve organellerin vesiküller içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozomla birleşerek burada parçalanmasıdır. Sonuç olarak açığa çıkan yapıtaşları ise hücreler tarafından tekrar kullanılmaktadır. İlk araştırmalar otofajiyi, stres karşısında hücre homeostazının korunması için etkili bir yol olarak tanımlamış fakat birçok hücreyel olayda önemli bir düzenlenme olduğı da ortaya koyulmuştur [236]. Bu hücreyel olaylar arasında metabolizmanın düzenlenmesi, morfogeneze, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü yer almaktadır. Otofajinin moleküler mekanizması ve biyokimyasal özellikleri apoptotik ve nekrotik hücre ölümünden farklıdır. Otofaji sırasında gözlemlenen en belirgin özellik sitoplazmada oluşan çift zarlı vesiküllerin oluşmasıdır.

Apoptotik hücre ölümü, diğere hücre ölümünden biyokimyasal olarak farklı gelişip sonuçlanmaktadır. Apoptotik hücre ölümü sırasında diğere iki hücre ölümünden farklı olmak üzere hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması ve hücrenin “apoptotik cisim” adı verilen parçacıklara ayrılması gözlemlenmektedir [237]. Bu morfolojik değişiklikler kaspaz adı verilen sistein aspartat proteazlar ile gerçekleştirilmekte ve nukleer DNA ile proteinler bu proteazlar tarafından kesilmektedirler. Bu işlem sonucunda oluşan apoptotik cisimler komşu hücreler tarafından inflamatuvar cevap olmaksızın fagositoz ile ortadan kaldırılmaktadırlar.

2.4.1. Apoptozun Moleküler Mekanizması

Apoptotik ölüm sırasında meydana gelen değişimler farklı protein ailelerinin üyeleri tarafından düzenlenmektedir. Apoptoz tetikleyici ajanın tipine ve bu ajana maruz kalma süresine bağılı olarak apoptotik proteinlerin ifade düzeylerindeki değişim ile apoptoza özgü değişimler gözlemlenmektedir. Bu protein aileleri “kaspazlar” olarak bilinen sistein proteazlar ve Bcl-2 (B-hücre lenfoma 2) ailesidir. Bunlar dışında hücre membranında bulunan ölüm reseptörleri de mevcuttur. Bu proteinlerin aktivasyonu, apoptoza özgü olan mitokondri membran potansiyelinin ($\Delta\psi_m$) bozulması, nukleus zarının bozulması, DNA kırıkları oluşumu, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin oluşması gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur.

2.4.1.1. Kaspazlar

Apoptotik mekanizmada görevli genler ilk kez *C. Elegans*'ta belirlenmiştir. *C. elegans*'ın gelişimi sürecinde 1090 somatik hücreden 131'i apoptoz ile ölmektedir. Bu organizmada hücre ölümünü yöneten proteinler CED protein ailesinin üyeleridir. *Ced-3* bir sistein proteazı kodlamaktadır. CED-3'ün memelilerdeki homologue ise kaspazlar adı verilen ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan ve hedef proteinlerde aspartik asitten sonraki peptid bağı kırarak bir grup enzimlerdir. Bu enzimler apoptozun son devresindeki hücrel substratların yıkımından sorumludurlar. Aynı zamanda apoptozun başlatılmasında da rolleri bulunmaktadır. Kaspazlar inaktif formları olan prokaspazlar şeklinde sentezlenmektedirler. Prokaspazlar bir terminal pro-bölgesi, büyük alt ünite ve karboksil uca küçük alt ünitelerden oluşmaktadır. Prokaspazlar, homodimerizasyon, proteolitik yıkım ya da başka proteinlerle etkileşime girerek aktive edilmektedirler. Proteolitik yıkım sonucu pro- bölgesi enzimden uzaklaştırılıp, büyük ve küçük alt ünitelerin etkileşimi ile enzimler aktif hallerine dönüşmektedirler. Hücre ölümü sırasında meydana gelen morfolojik değişimler, bu enzimlerin etkileri sayesinde gelişmektedir [238]. Memelilerde kaspazların 14 izoformu bulunmaktadır ve üç grupta incelenmektedirler.

- a) Başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, 8, 9, 10)
- b) Etkili kaspazlar (kaspaz-3, 6, 7)
- c) İnflamatuar kaspazlar (diğerleri)

Başlatıcı kaspazlar mitokondri ya da hücre zarı kökenli apoptotik uyarı sonrası ölüm sinyallerini başlatarak, etkili kaspazların aktivasyonundan sorumludurlar. Etkili kaspazın aktif hale gelmesi, başlatıcı kaspazın etkili prokaspazı inaktif halde tutan amino asit dizisini kesmesi ile gerçekleşmektedir. Aktif hale gelen etkili kaspaz, hücrel hedefinin tetrapeptit motiflerini tanıyarak ve bir aspartat rezidüsünün karboksil tarafından hedefi keser. Bu hedef proteinlere örnek olarak DNA onarım enzimleri, poli ADP riboz polimeraz (PARP), laminler (nükleus membranının bütünlüğünü sağlayan proteinler), hücre iskeleti proteinleri verilebilir. Kaspazlar dolaylı yoldan DNA'nın da

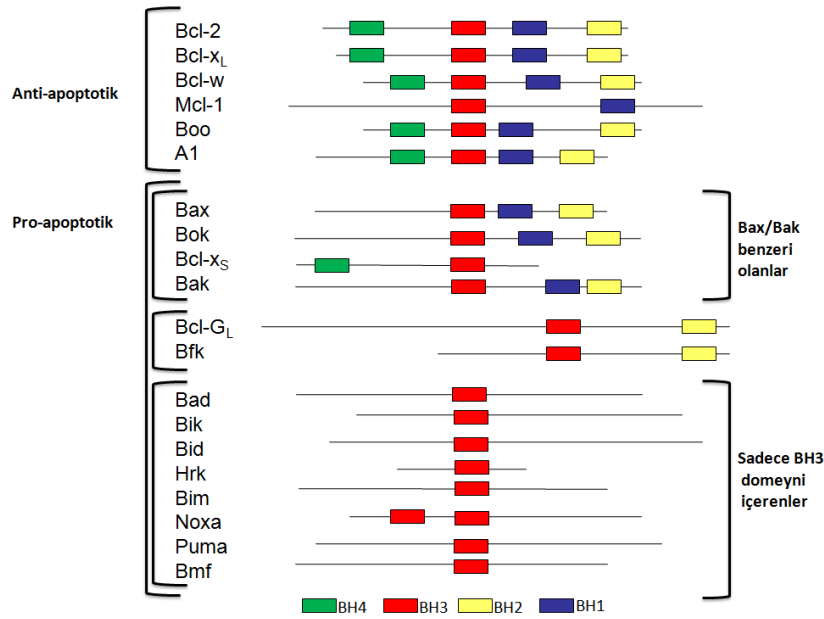
parçalanmasını gerçekleştirirler. Proteaz olmaları nedeni ile doğrudan DNA üzerine etki etmezler, fakat DNA nukleazların inhibitörlerini yok etmektedirler [239].

C. elegans'ta keşfedilen bir diğer önemli molekül ise *Ced-4*'tür ve memelilerdeki homologue *Apaf-1* (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1)'dir. Apaf-1 mitokondri kökenli apoptotik sinyal sonucu başlatıcı prokaspaz-9'u aktif hale getirmektedir. Kaspazlar hücrede pro-domenler halinde inaktif durumda olup, katalitik aktif bölgeleri kesildiği takdirde aktivasyon kazanmaktadırlar. Kaspazların aktif formlarına dönüşmelerini sağlayan başlatıcı kaspazlar ya da Apaf-1 haricinde, hücre içinde işlevlerini bloke edici faktörler de bulunmaktadır. Bu faktörlere örnek olarak, apoptoz inhibitörü protein (IAP) ailesi ve HSP'ler örnek verilebilir. IAP üyeleri kaspazlara doğrudan bağlanarak kaspazları inaktif hale getirebilmektedirler [240]. Doğal kaspaz inhibitörleri dışında, yapay olarak inhibitörler de geliştirilmiştir. Bu inhibitörler kaspazların aktif bölgelerine bağlanarak substratlarla iletişime girmelerini engellemektedirler. Bu inhibitörler genellikle aldehit ya da fluorometilketon (FMK) taşımaktadırlar [241]. Yapay inhibitörlerin kullanımı genellikle bir ajanın apoptotik etkisinin kaspazlarla ilişkili olup olmadığının kontrolünü kapsamaktadır.

2.4.1.2. *Bcl-2 Ailesi*

Apoptotik hücre ölümünü tetikleyen uyarı, hücre membranında lokalize olan ölüm reseptörleri ya da mitokondri kaynaklı olabilmektedir. Bir çok hücrede ölümü tetikleyen kaynak ne olursa olsun apoptotik sinyal genellikle Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından düzenlenmektedir. İlk olarak Burkitt lenfomasında hücre sağkalımını tetikleyen protein olarak keşfedilen Bcl-2 proteini kapsayan Bcl-2 ailesi iki ana gruba ayrılmaktadır [242]. Bu gruplardan biri pro-apoptotik, apoptozu indükleyici; diğeri ise anti-apoptotik, apoptozu baskılayıcı etkilere sahip proteinlerden oluşmaktadır. Birbirlerinden farklı etkilere sahip bu proteinlerin işleyişi yapılarında bulunan dört bölge tarafından düzenlenmektedir. Bcl-2 homoloji bölgeleri (BH) olarak adlandırılan bu bölgeler BH1, BH2, BH3 ve BH4 adını almaktadırlar (Şekil 2.12). Bcl-2 ailesi üyesinin BH1, 2 ve 3 bölgeleri bir diğer üyenin BH3 bölgesine bağlanarak etkileşim kurmaktadır. Pro-apoptotik üyeler kendi içinde iki alt gruba ayrılmaktadırlar. Bu alt grublardan biri yapılarında BH1, BH2, BH3 bölgelerini içerirler (Örnek: Bax, Bak), diğeri alt grup

üyeleri ise sadece BH3 bölgesini içeren üyelerden (Bid, Bad, Bim) oluşur (Şekil 2.12). Anti-apoptotik üyelerde (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1) ise bu üç bölgeye ek olarak BH4 bölgesi bulunmaktadır. Pro- ve anti-apoptotik üyelerin protein ifadelerindeki denge hücre sağkalımı ya da ölümü arasındaki seçeneği belirlemektedir. Anti-apoptotik üyelerin fazla anlatımı apoptozun baskılanmasını, pro-apoptotik üyelerin fazla anlatımı hücre sağkalımını engellemektedir.



Şekil 2. 12. Memelilerde Bcl-2 ailesi üyeleri. Strasser [242].

Bcl-2 proteinleri mitokondri membranının dış zarında lokalize olarak, mitokondriden apoptotik sinyal başlatıcı sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AIF) gibi moleküllerin salınımını, mitokondri membran potansiyelini bozarak gerçekleştirmektedirler. Mitokondri membranının sitoplazmaya bakan yüzündeki karboksil terminal bölgeleri sayesinde diğer Bcl-2 ailesi üyeleri ile etkileşime girebilmektedirler [243]. Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin mitokondri membran potansiyeline nasıl etki ettikleri ise, bu üyelerin iyon kanalları oluşturabilme yeteneği ile açıklanmaktadır [244]. Etkilerinin bakteriyel toksinlerin por meydana getirme etkisine benzer olduğu gösterilmiştir [244]. Oluşturdukları porlar, spesifik olmayan taşıyıcılar olarak

tanımlanmışlardır. Pro-apoptotik proteinlerin aksine, Bcl-2 anti-apoptotik proteini bu porların açılmasını ters yönde etkilemektedir.

Bcl-2 ailesi üyelerinin tümör hücrelerinde fazla anlatımı aynı zamanda kemoterapi direncini de tetiklemektedir. Yumurtalık, meme, PKa hücrelerinde Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1 fazla anlatımının platin türevli, ya da doksorubisin gibi DNA ile etkileşen kemoterapötik ajanlara direnç sağladığı gösterilmiştir [245-248]. Bunun yanı sıra, kemoterapötik ilaçların klinikte kullanılabilirliği pro-apoptotik proteinleri nasıl tetikleyebildiği ile ortaya konulmakta, özellikle pro-apoptotiklerin, anti-apoptotiklere protein ifadesi bakımından üstünlüğü önem taşımaktadır. Bax ve Bak, gibi pro-apoptotik proteinlerin beyin, testis, PKa hücrelerinde çeşitli kemoterapötik ajanların tetiklemesiyle arttığı ve hücreleri apoptotik ölüme götürdüğü gösterilmiştir [249-251]. Aynı zamanda normal dokularda da fonksiyonellik göstermektedirler. Örnek olarak trombositlerin apoptozdan korunması, trombosit reseptörü adı verilen molekülün Bax ve Bak anlatımını inaktive etmesiyle gerçekleştirdiği gösterilmiştir [252].

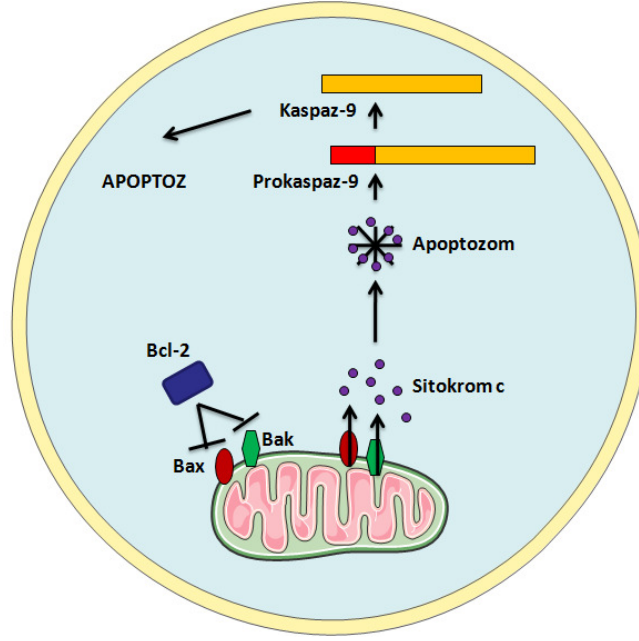
2.4.2. Apoptoz Tipleri

Apoptotik sinyalin alınması ve mekanizmanın gerçekleşmesi memeli hücrelerinde iki yoldan meydana gelmektedir. Bunlardan biri “iç yolak” olarak bilinen mitokondri aracılı mekanizma, diğeri ise “dış yolak” olarak adlandırılan hücre membranı aracılı mekanizmadır. Her iki mekanizma kaspaz adı verilen proteinleri aktive etmesi yönünden kesişerek apoptozun sonlanmasını sağlamaktadırlar.

2.4.2.1. İç Yolak

Mitokondri, hücrede ATP üretiminin kaynağı olmasının yanı sıra, hücre içinden ya da dışından gelen ölüm sinyallerinin birleştiği bir organeldir [253]. Çift katlı membran yapısına sahip mitokondri membranının hasar görmesi hücre ölüm sinyalini başlatmaktadır. Dış zardaki potansiyel kaybı sonucu, mitokondrinin iki zarı arasında bulunan elektron taşıma zincirinin üyesi olan sitokrom c, AIF, DIABLO ya da diğeri ismi ile ikincil mitokondri kökenli aktivatör (SMAC), bir DNaz olan endonükleaz G gibi proteinler sitoplazmaya salınmaktadır [254]. Sitokrom c, sitoplazmaya çıktıktan sonra inaktif monomerler halinde bulunmakta olan Apaf-1 molekülüne bağlanarak

apoptozom adı verilen kompleksin oluşmasını sağlamaktadır (Şekil 2.13). Apoptozom, prokaspaz-9 ile etkileşime girip pro- kısmının yıkımını sağlamakta ve aktif formu olan kaspaz-9 oluşumunu uyarmaktadır (Şekil 2.13). Böylelikle başlatıcı kaspaz-9, etkili kaspazların proteolitik yıkımını sağlayarak onları aktif hale getirmekte ve apoptozun gerçekleşmesini tetiklemektedir [255]. Mitokondride dış zar potansiyelinin bozulması Bcl-2 ailesi tarafından düzenlenmektedir. Mitokondri dış zarında lokalize olan pro- ve anti-apoptotik proteinlerin oranı apoptozun tetiklenmesinde kilit rol oynamaktadır. Bcl-2, Bcl-x_L mitokondriden apoptotik faktörlerin salınımına ket vururken, Bax, Bad, Bim, Bmf, Bid gibi pro-apoptotikler mitokondri membran potansiyelini, dış zarda meydana getirdikleri porlarla bozarak sitokrom c gibi faktörlerin sitoplazmaya çıkışını uyarmaktadırlar (Şekil 2.13) [254]. Pro-apoptotik üyeler normal koşullarda inaktif durumdadır, bu nedenle mitokondriyal zarın bütünlüğü korunmaktadır. Ancak çeşitli kimyasal ajanlara maruz kalma, büyüme faktörünün uzaklaştırılması, kalsiyum artışı, UV ışınları gibi dış faktörler pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin ifadelerinin artmasına yol açmaktadır. Anti-apoptotik Bcl-2 üyelerini inaktif hale getiren pro-apoptotikler, mitokondri dış zarında por yapılarını oluşturarak zar potansiyelinin değişimine yol açmaktadırlar. Sonuç olarak açığa çıkan moleküllerle aktif hale gelen kaspazlar hücre içindeki hedefleri olan hücre iskeleti bileşenleri aktin, miyozin, spektrin, nuklear lamina, DNA, transkripsiyon faktörleri, ribozomlar, RNA, Golgi ve endoplazmik retikulum gibi tüm bileşenleri yıkmaktadırlar. Mitokondri zar potansiyelinin bozulmasıyla beraber ise hücre membranının fosfolipit kompozisyonu değişmekte ve membranın dış kısmına fosfatidilserin geçişi olmaktadır. Bu değişim apoptotik hücrelerin makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilmesi için sinyal oluşturmaktadır. Meydana gelen apoptotik cisimlerin fagositozuyla apoptotik süreç tamamlanmaktadır.



Şekil 2. 13. Apoptotik iç yolağın moleküler mekanizması.

2.4.2.2. Dış Yolak

Mitokondri dışında da hücre membranında lokalize olmuş farklı reseptörler tarafından apoptotik ölüm tetiklenebilmektedir. Bu reseptörler; tümör nekrozis faktör (TNF), Fas reseptörü, ölüm reseptörü 3 (DR3), TNF ile ilişkisi apoptoz indükleyici ligand reseptör (TRAIL) adını alan reseptörlerdir [256].

Ölüm reseptörleri ile tetiklenen apoptoz iki şekilde gerçekleşmektedir.

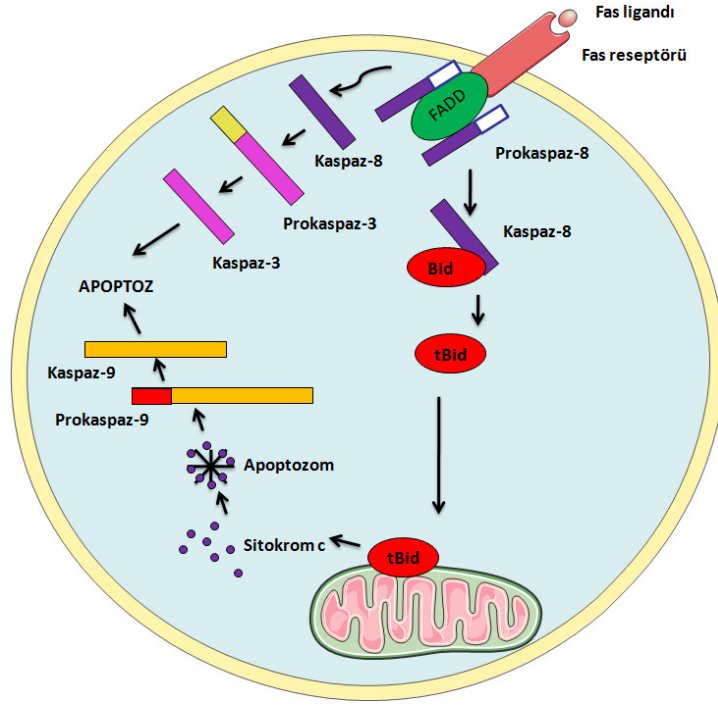
a) Reseptörler hücre zarında transmembran halde bulunurlar ve hücre içi kısımları prokaspaz-8 ile etkileşime girebilmektedir [257]. Bu etkileşim sonucunda prokaspaz-8'in pro kısmı kesilerek aktif kaspaz 8'e dönüşmektedir. Kaspaz-8, etkili kaspazlar olan kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'nin aktifleşmesine yol açmaktadır. Kaspaz aktivasyonu hücre içi makromoleküllerin parçalanması ile son bulmaktadır (Şekil 2.14).

b) İkinci yolda ise reseptörlerin hücre içi kısmı ile aktif hale gelen kaspaz-8, Bcl-2 ailesi proteinlerinden biri olan Bid'in proteolitik kesilmesine ve mitokondriye yönelmesine

neden olmaktadır. Bid bu noktada mitokondri iç ve dış yolları arasında bir köprü görevi görmektedir. Bid, diğer pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri gibi sitokrom c, SMAC gibi proteinlerin sitoplazmaya salınmasını tetiklemektedir (Şekil 2.14) [258].

TNF ve TRAIL reseptörleri immun sistem düzenleyicileri olarak bilinmesi ile beraber, gelişim süresince de önemli roller oynadıkları ortaya konulmuştur [259]. Bu reseptörlerin apoptotik ölümü aktive etmeleri için sadece ligandları ile bağlanmaları yetersizdir. Reseptörün hücre içi kısmında bulunan ölüm domeni sayesinde kaspaz-8'i aktif hale getirmektedirler [260]. Ölüm reseptörleri, prokaspaz-8 ve prokaspaz-10 ile etkileşime girerek ölüm indükleyici sinyal kompleksinin (DISC) oluşmasını sağlamaktadırlar. Hücre içinde kaspaz-8'in homoloğu olan FLICE inhibitör proteini (FLIP) ise anti-apoptotik rol oynayarak kaspaz-8 ya da kaspaz-10'un aktive olmasını inhibe etmektedir [261]. Sisplatin, 5-FU, doksorubisin gibi kemoterapötik ajanların çeşitli kanser hücrelerinde TNF, TRAIL ve kaspaz-8 anlatımını artırarak etki ettiği gösterilmiştir [262, 263].

Fas reseptörü, bir sitokin reseptörü olup, TNF reseptör ailesindeki gibi hücre içinde ölüm domeni barındırmaktadır. Bu domeyne Fas ilişkili ölüm domeni (FADD) adı verilir. Apoptozu indükleyen hücre dışı sinyallere bir diğer örnek sfingomiyelindir. Sfingomiyelin, hücre membranının yapı taşlarından biridir. Bu molekül ölüm reseptörleri aracılığıyla aktive olan sfingomiyelinaz tarafından seramide dönüştürülür. Seramidin Bid anlatımını artırarak mitokondriyal yolak üzerinden apoptozu tetiklediği gösterilmiştir [264].



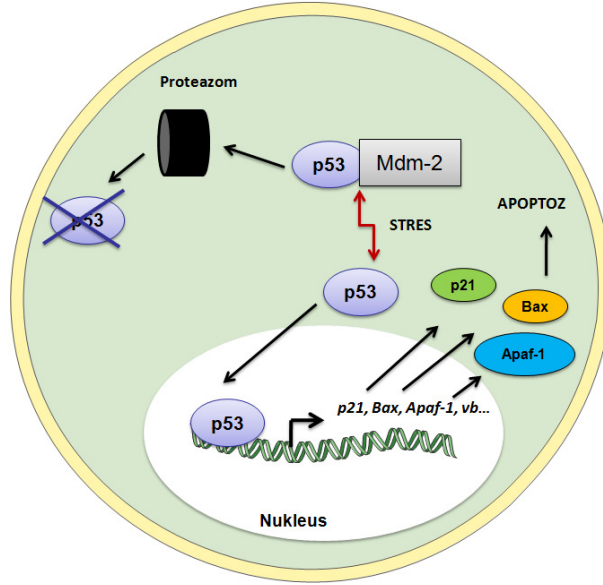
Şekil 2. 14. Apoptoz dış yolağının moleküler mekanizması.

2.4.3. p53 ve apoptoz

p53, hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. p53 aktivitesinin hücre döngüsü dışında apoptozun indüklenmesi, farklılaşma, rekombinasyon gibi hücre olaylarını düzenlediği gösterilmiştir [265]. Bu nedenle p53 mutasyonları pek çok kanser ile ilişkilendirilmiş ve tümör supresör proteinler sınıfında gösterilmiştir [266, 267]. p53'ün tümör baskılayıcı özelliği hücre döngüsü inhibitörleri ve apoptotik proteinlerin ifadelerini düzenleyebilmesinden ileri gelmektedir. Bir transkripsiyon faktörü olarak, hem hücre döngüsünün doğal inhibitörleri olan p21, p16 gibi proteinlerin anlatımına, hem de Bcl-2 ailesi üyelerinin anlatımına etki etmektedir [268, 269]. Mitokondri membran potansiyelini düzenleyen Bcl-2, Bcl-x_L, Bax, Puma, Noxa, Apaf-1 protein ifadeleri p53 öncülüğünde artmaktadır [270-272]. Beyin ve kolorektal kanseri vakalarında 5-FU gibi kemoterapötik ajanlarla p53'ün Bax anlatımını uyarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir [273, 274]. p53'ün apoptotik iç yolağı haricinde dış yolda görevli proteinlerin anlatımlarını tetikleyerek de apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Plazma membranında lokalize olan Fas, DR4, DR5, TRAIL

anlatımlarının çeşitli apoptoz indükleyici ajanlarla arttığı bilinmektedir [275, 276]. Transkripsiyonel düzenlenme haricinde p53, Bcl-xL veya Bcl-2'yi bağlayarak Bax gibi pro-apoptotik proteinlerin mitokondri membranına lokalize olmasını, diğer bir ifade ile pro-apoptotik proteinlerin membran potansiyelini bozmasını sağlamaktadır [277].

p53 normal şartlarda hücre içinde düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır ve aynı zamanda sitoplazmada Mdm2 adı verilen protein ile bağlı olarak sıkı kontrol altında tutulmaktadır. Normal şartlarda Mdm2 sitozolde p53 ile bağlı halde bulunmakta ve böylelikle p53 hedef genlerinin transkripsiyonel aktivitesini engellemektedir. Bu işlemi p53'ün N-terminal ucunda bulunan transaktivasyon bölgesine bağlanarak gerçekleştirmektedir [278]. Mdm2 bu şekilde p53'ü ubiquitinleyip proteazoma yönlendirmektedir (Şekil 2.15) [279]. Hücre herhangi bir stres faktörüne maruz kalırsa p53, Mdm2 ile ayrılarak nukleusa göç etmekte ve burada hücre devri inhibitörlerinin ve pro-apoptotik proteinlerin anlatımını değiştirerek apoptotik mekanizmayı tetiklemektedir (Şekil 2.15).



Şekil 2. 15. p53 ve apoptoz ilişkisinin moleküler mekanizması.

2.5. BRASSINOSTEROİDLER

Brassinosteroidler (BRler), bitkiler aleminde büyümeyi teşvik edici ajanlar olarak bilinen bitkisel hormonlardır. İlk defa 1970 yılında Mitchell ve diğ. [280] tarafından şalgam (*Brassica napus*) polenlerinden elde edilen özütlerde tanımlanmış, bitki uzamasını ve hücre bölünmesini tetiklediği gösterilmiştir. BR'ler, hayvanlarda embriyonik, post-embriyonik gelişim ve organizmanın homoestazının sağlanması gibi rolleri iyi tanımlanmış steroid hormonlara yapısal olarak benzemektedirler. BR'ler bitkilerde pek çok fizyolojik olayı hem somatik hem de reproduktif gelişim sürecinde kontrol etmektedirler. BR'lerin bitkilerdeki rolleri bir çok *in vitro* ve *in vivo* denemeler ile ortaya konulmuştur [281, 282]. Bu çalışmalarla BR'lerin bitki organlarının uzaması, yaprak morfogenezi, senesens, fertilité, polen ve meyve gelişimindeki rolleri belirlenmiştir [16, 18, 283]. BR biyosentezi ve sinyal yollarının keşfi ile BR duyarsız mutantların tere (*Arabidopsis thaliana*) bitkisinde geliştirilmesi, bu moleküllerin bitki gelişimi için en az oksin, sitokinin ve giberellinler kadar önemli olduklarını meydana çıkarmıştır [284, 285].

2.5.1. Brassinosteroidlerin Yapı ve Özellikleri

Brassinosteroidler ilk olarak *Brassica* cinsi bitki polenlerinden elde edilmiştir. BR'lerin tanımlanan ilk üyesi brassinolid 40 kg polenden 4 mg kristal halinde izole elde edilmiş ve steroid yapıdaki ilk bitki bileşeni olarak tanımlanmıştır [286]. Şu anda yaklaşık 58 bitki türünden izole edilmiş olan brassinosteroid türevleri farklı bitki türlerinde farklı miktarlarda bulunmaktadır.

BR'ler yapısal olarak omurgalılar ve böceklerde bulunan, büyüme ve gelişmeyi düzenleyen steroid hormonlara benzerlik gösteren doğal polihidroksi steroidler olarak tanımlanmışlardır [287]. Doğal BR'ler bir 5 α -kolestan iskeletine sahiptir ve birbirine bitişik A, B, C, D halkaları ile 17. karbona bağlı alkil yan zincirden oluşan klasik bir steroid kimyasal yapısına sahiptirler (Şekil 2.16) [288]. BR'lerin en yaygın olarak görülen iki tipi brassinolid ve onun öncü maddesi kastasterondur [16].

BR'ler bitkilerde pek çok fizyolojik süreci yönetmektedir. Bunlar arasında gen anlatımının düzenlenmesi, hücre bölünmesi ve uzaması, çimlenme, vegetatif ve reproduktif gelişim, iletim dokusunun farklılaşması, kök büyümesi ve bitki homeostazın sağlanması sayılabilir. *Arabidopsis thaliana* bitkisiyle yapılan pek çok çalışma BR'lerin bitki uzaması için önemini ortaya koymuştur. BR'ye duyarsız ya da mutant bitkilerin kontrol gruplara göre cüce kaldığı belirlenmiştir [285]. BR'lerin dikotil bitkilerde epikotil ve hipokotil uzamasını teşvik ettiği, aynı zamanda koleoptil büyümesini artırdığı gösterilmiştir [289].

Dünyada gün geçtikçe artan insan popülasyonu ile besin ihtiyacı arasındaki doğrusal orantı dikkate alındığında, yenilebilir bitkisel besin kaynaklarından yüksek verim sağlamak önemli bir amaç olmuştur. Tahıllardan yüksek verim sağlamak amacıyla kullanılan kimyasal gübreler hem ürünlerin hem de insanların sağlığını tehdit etmektedir. Bu yüzden doğaya ve insana dost doğal hızlandırıcıların keşfi için gelişmiş ülkeler rekabet etmişlerdir. Tohumun çimlenmesi, çiçeklenme, olgunlaşma, vegetatif ve reproduktif gelişim, kök inhibisyonu gibi bitki gelişimi için önemli fizyolojik olayları koordine etmesi BR'lerin neden ürün verimini arttırmak için kullanılabileceğinin bir göstergesi olarak işaret edilmiştir. Bu sebeple, tarla denemeleri gerçekleştirilmiş ve BR'lerin hem ürün kalitesini hem de sayısını artırdığı gözlemlenmiştir [290].

Büyüme ve gelişmenin dış kaynaklı olarak BR alan bitkilerin hem abiyotik hem de biyotik stres koşullarına dayanıklılıklarının arttığı gösterilmiştir [291]. Gelişmekte olan ülkelerde bitkisel ürün verimine ket vuran ana öge çevresel koşulların uygun olmaması ve abiyotik stres (sıcaklık, ağır metaller, pestisidler, tuzluluk gibi)'tir. BR'lerin abiyotik strese karşı aktif koruyucu etkisi çeşitli antioksidan enzim reaksiyonlarını baskılaması veya artırması, protein sentezine olan etkisi ve çeşitli koruyucu moleküllerin sentezini uyarması şeklindedir [18, 292, 293]. Tohum verimini azaltan hatta ket vuran streslerin başında gelen ve kuraklık ile meydana gelen tuzluluk stresinde BR'lerin rolü *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir. Tuza dirençli ve dayanıksız arpa bitkileri EBR uygulaması sonrası fotosentetik kapasitelerini artırmış, bitkilerin nukleus, kloroplast yapılarını koruyarak tuzluluk stresi altında daha iyi fotosentez yapmalarını indüklemiştir [294].

Tuzluluk stresi dışında metal stresine karşı BR'lerin etkisi gösterilmiştir. Özellikle *Brassica juncea*'da ve pirinç bitkilerinde yapılan çalışmalar, 24-epibrassinolid ve 28-homobrassinolid'in ağır metal ve pestisid stresine karşı etkili olduğu ortaya konulmuştur [295, 296]. Aynı zamanda kadmiyum stresi altında antioksidanlarla olan etkileşimi de gösterilmiştir [297] .

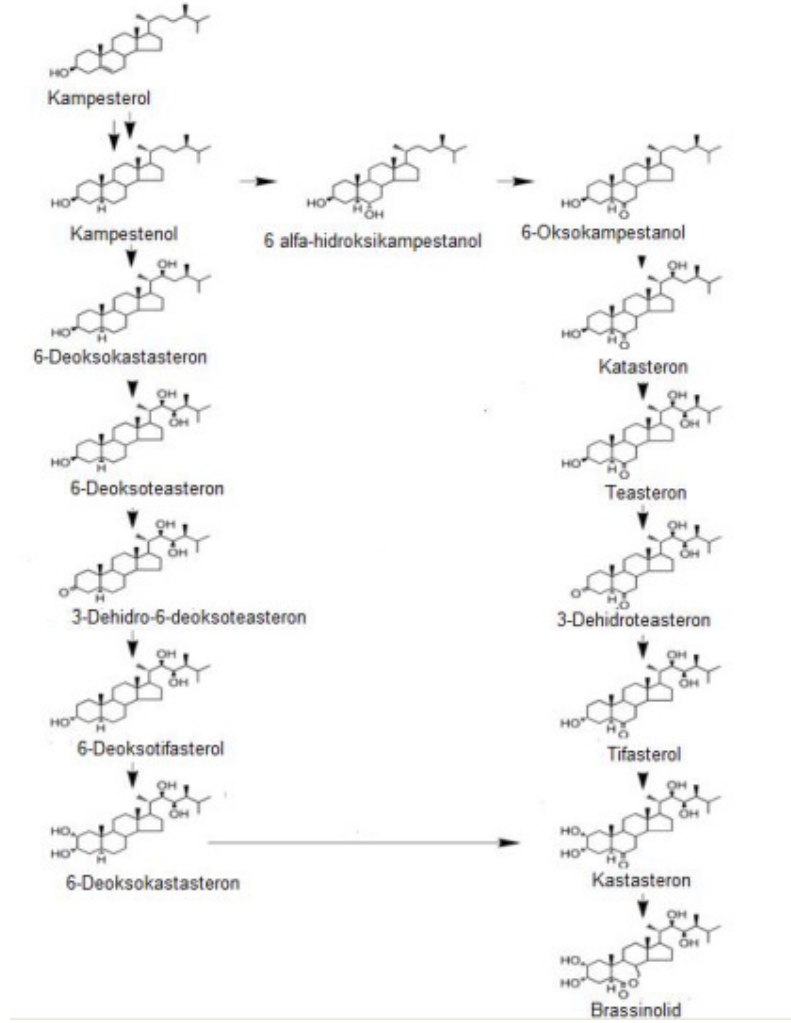
BR'lerin aynı zamanda virus, bakteri ve mantar gibi biyotik stres faktörü olan çeşitli patojenlere karşı savunmada rol oynadıkları bilinmektedir [298-300]. Aynı zamanda patates ve pirinç bitkisinde bakterilere karşı immun cevabın gelişmesinde BR'lerin önemi belirlenmiştir [298]. BR'lerin etkisi sadece bitkilerde değil farklı canlılarda da incelenmiştir. Böceklerde yapılan çalışmalar BR'lerin, hücre bölünmesi ile ilgili olayları etkilediklerini ortaya konmuştur [301, 302].

BR'lerin çeşitli organizmlarda biyolojik aktivitelerinin anlaşılması için çeşitli çalışmalar yapılmış ve antiviral etkileri belirlenmiştir [303]. BR analoglarının RNA ve DNA virüslerine karşı antiviral etkisi Wachsmann ve diğ. [304] tarafından gösterilmiştir. *Herpes simplex'in* (HSV-1) gözdeki normal konjunktif hücrelerin (NHC) çoğalmasının, BR analoglarınca doza bağlı olarak engellendiği gösterilmiştir [305]. Fakat, antiviral tedavi olarak BR'ye direnç mekanizması virüslerde çabuk geliştiğinden başka aktif moleküller önem kazanmıştır.

2.5.2. Brassinosteroidlerin Biyosentezi

BR'ler polihidroksi steroidal lakton ve ketonlardır. Genel yapıları bir karbon iskeleti ve buna bağlı 4 halkadan oluşmaktadır. Doğal olarak bulunan, tanımlanmış kırktan fazla brassinosteroid, kimyasal yapı olarak birbirlerinden A ve B halkaları ve yan zincirlerdeki farklı bileşenlerle ayrılırlar. Bu modifikasyonlar biyosentezleri sırasındaki oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sonucu meydana gelmektedir. Bitki sterolleri (lipoidal steroid alkoller) BR'lerin öncü maddelerini oluşturmaktadırlar. Bu öncü maddelerden biyosentez için en çok kullanılan kampestroldür (24 α -metil kolesterol) (Şekil 2.17) [306]. Bu molekül izopentenil difosfattan sentezlenmektedir. İzopentil

difosfat ise mevalonik asit aracılığı ile asetil koenzim A'dan türevlenmektedir. İzopentil difosfat mevalonik asit bağımsız olarak da piruvat ve gliseraldehit-3-fosfattan köken almaktadır. Kampesterol oluşumu sırasıyla, teasteron, tifasterol, kastasteron ve brassinolid şeklinde gerçekleşmektedir (Şekil 16). BR'leri oluşturan kimyasal yapının yan zincirlerindeki karbon sayısı brassinosteroidleri sınıflandırmayı kolaylaştırır. Bu göre C27, C28, C29 şeklinde isimlendirilbilirler. Doğada en çok bulunan, ilk izole edilen brassinosteroid brassinolidir ve C28 steroid olarak bilinmektedir [286].



Şekil 2. 16. Brassinosteroidlerin sentezi. Bishop ve Koncz [16].

2.5.3. Brassinosteroidlerin Hücresel İşlevleri

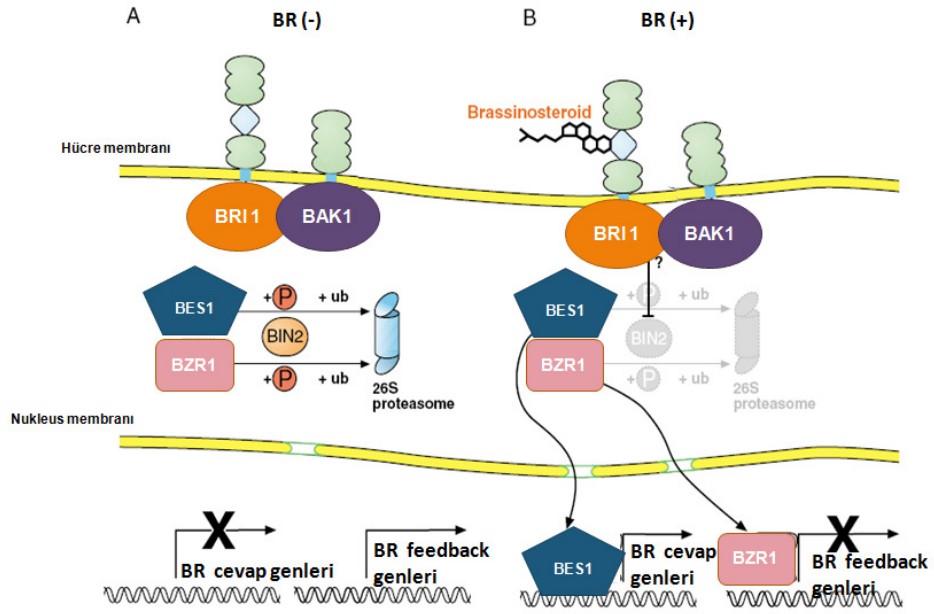
BR'lerin hücre düzeyinde uzama, hücre duvarının mekaniğini ve hücre zarının geçirgenliğini değiştirme (proton pompalarının aktivasyonu), bölünme, nükleik asit ve protein sentezini aktive etme, gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi pek çok olayı etkilediği rapor edilmiştir [307-309].

BR'lerin hücre büyümesine etki ettiği, bu etkinin ise proton pompası inhibitörü eritsorin B ile geri döndürüldüğü bildirilmiştir [310]. BR'lerin aynı zamanda ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz (Rubisco) ve diğer fotosentetik gen anlatımına, mRNA ve protein seviyelerine etki ettiği gösterilmiştir [311]. Bitkilerde ayrıca ksilem farklılaşmasında BR'lerin rolü vardır. Ksilemi oluşturan hücrelerin bazılarının programlanmış hücre ölümüne gitmesi trake elemanlarının oluşmasını sağlamaktadır [312].

BR'ler yapısal olarak böceklerdeki ektisteroidlere benzemekte ve programlanmış hücre ölümünü gerçekleştirmektedirler [313]. BR'ler, böceklerin farklı hayat döngüleri sırasında uygulanırlarsa, ortadan kaldırılmalarını sağlamaktadırlar, bu nedenle tarımcılığı iyileştirme amaçlı olarak da kullanılabilirler.

BR'lerin tüm bu süreçleri nasıl düzenlediği ise hücre içine taşıdığı sinyal yollarının aydınlatılmasıyla anlaşılmıştır. Hayvanlardaki steroid hormonlar sitoplazmada bulunan reseptörlerine bağlanarak sinyalin nükleusa taşınmasını ve böylece hormona bağımlı gen anlatımının başlatılmasında veya baskılanmasında görevlidirler. Buna benzer olarak, *Arabidopsis thaliana* bitkisinde yapılan çalışmalar BR sinyalinin transkripsiyonel değişime neden olduğunu ve bu şekilde bitkide fizyolojik cevapların oluştuğunu göstermiştir. BR sinyal mekanizmasının anlaşılmasındaki en önemli etken brassinosteroid duyarısız [brassinosteroid insensitive 1 (BRI1) geni] mutantların 1996 yılında Clouse ve diğ. [284] tarafından elde edilmesidir. Bu sayede *BRI1* geni ve mutant alleller tanımlanmıştır. BRI1, reseptör-benzer bir kinaz ve BR sinyal mekanizması için son derece önemli bir molekül olarak tanımlanmıştır. BRI1, transmembran domeni, N-terminal sinyal peptidi ve 25 adet lösince zengin tekrar içeren ekstraselüler domen

içeren bir moleküldür. Bu proteinin hayvanlarda bulunan serin/treonin kinaz aktivitesine benzer şekilde aktivite gösterdiği belirtilmiştir [16]. İkinci bir protein BRI1 uyumlu reseptör kinaz (BAK1)'in BR sinyali için gerekli olduğu gösterilmiştir [314, 315]. BAK1, BRI1 ile heterodimer oluşturarak BR sinyalini hücre içine taşımada görev almaktadırlar (Şekil 2.18) [316]. Heterodimerizasyon sonrası her iki reseptörün fosforilasyonu meydana gelmekte ve kinaz aktivitesi gerçekleşmektedir. Böylece hücre içindeki diğer moleküller için reseptörlerin hücre içi kısımlarında interaksyon bölgeleri meydana gelmektedir. BR bağlanmasına hücre içinde cevap veren proteinler ise brassinazol-direnci 1 (BZR1) ve BRI baskılayıcı 1 (BES1) proteinleri olarak belirlenmiştir [317, 318]. Bu iki protein, heterodimer olarak aktivasyon gösteren BRI1 ve BAK1 ile etkileşime giren ve BR sinyalinin negatif düzenleyicisi olan BIN2 (brassinosteroid insensitive 2) tarafından defosforile edilmektedirler. BR yokluğunda ise BIN2, BZR1 ve BES1'i fosforlayarak yıkmaktadır [319]. BZR1 ve BES1 defosforile olduktan sonra nukleusa göç ederek BR'ye cevap veren genlerin veya BR sinyal mekanizmasında görevli genlerin anlatımlarının aktivasyonlarını veya baskılanmalarını sağlamaktadırlar (Şekil 2.18) [320]. Bazı durumlarda BIN2'nin rolü BSU1 proteinin de katılmasıyla artırılabilir [321]. Clouse ve diğ. [284], 1996 yılında *Arabidopsis thaliana* bri1 mutantlarının cüce kaldıklarını ve fertilite problemlerini göstermişlerdir. BR sinyal mekanizmasının hedefi genlere örnek olarak *Arabidopsis thaliana* veya domateste hücre duvarının, hücre uzaması sırasında gevşemesini indükleyen ksiloglukan endotransferaz (XET) örnek verilebilir [322]. Diğer BR-cevap genlerine örnek olarak hücre döngüsünün kontrolünde görevli sikline-bağımlı kinaz 2b ve siklin D3 sayılmaktadır [323]. Ökaryotik translasyon başlatma faktörü (eIF₃) de aynı şekilde hedef genlerden biri olarak gösterilmiştir [324].



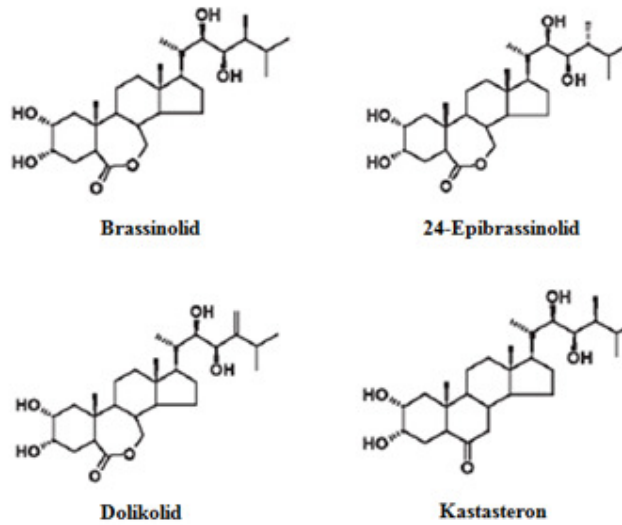
Şekil 2. 17. Bitki hücresinde brassinosteroid sinyal mekanizması. Bishop ve Koncz [16].

2.5.4. Brassinosteroidlerin Türevleri

Şimdiye kadar literatürde 65 adet BR ve 5 adet BR konjugatı tanımlanmıştır. Halen keşfedilmemiş olanlarının da bulunduğu düşünülmektedir. BR'lerin angiospermilerden (monokotil ve dikotil bitkiler), gimnospermilerden, 1 pteridofitten ve 1 algden olmak üzere toplamda 58 bitki türünden izole edildiği belirlenmiştir [325]. Böylelikle bitkiler aleminde yaygın olarak gözlemlenebilmektedirler. BR'lerin tümü biyolojik olarak aktif değildir. Biyolojik olarak aktif BR'lerden, brassinolid, EBR, homobrassinolid fizyolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bunların dışında dolikolid, homodolikolid, kastasteron, dolikosteron, tifasterol BR türevlerine örnektir. Çeşitli bitkilerin farklı organlarından spektroskopik yöntemlerle karakterize edilen BR'ler doğal ve sentetik olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Doğal brassinosteroidlerin karakteristik özellikleri:

1. A halkası (3. karbondan mono-, di-, trioksijen bulunan)
2. B halkası (6-okso-7-oksalakton veya 6-okso rolünü temsil eder)
3. A ve D halkaları bitişik
4. 24. karbondan 22α , 23α -dihidroksillenmiş ya da 25. karbon metillenmiş olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.19) [326].

Doğal BR'ler, yağ asitleri ve şeker konjuge edilmiş halde de bulunabilmektedirler. Diğer yandan BR analogları doğal brassinosteroidler ile yapısal olarak benzerlik göstermektedirler .



Şekil 2. 18. Bazı doğal brassinosteroidlerin kimyasal yapıları. Bishop ve Koncz [16].

2.5.4.1. Epibrassinolid

EBR doğal bir BR olup büyüme, hücre bölünmesi, biyotik strese cevap, antioksidan mekanizmaların aktivasyonu gibi hücre olaylarında görev aldığı gösterilmiştir. Özellikle arpa ve soğan bitkilerinin hücre bölünmelerine etkisi sırasıyla EBR'nin bu bitkilerde lektin ile etkileşime girerek ve mitotik indeksi artırarak gerçekleştirdiği belirlenmiştir [327, 328].

EBR'nin bitkilerdeki bir diğer etkisi olan strese karşı cevap oluşumu ise birçok farklı abiyotik stres koşulu altında çalışılmıştır. *Brassica juncea* bitkisinde tuzluluk ve nikel stresi, büyümeye ve fotosenteze ket vuran etkenler olarak gösterilmiş, fakat eş zamanlı EBR uygulamasının büyüme ve fotosentez parametrelerini iyileştirdiği gösterilmiştir [17]. Aynı zamanda bakır ve krom streslerine karşı antioksidan enzimlerin seviyelerini artırdığı belirlenmiştir [329, 330].

EBR'nin bitkilerde absisik asit, indol-3-asetik asit ve poliamin seviyelerine etki ettiği ve bakır metali stresi koşulunda, bu molekülleri artırarak gayakol peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimleri tetiklediği gösterilmiştir [329].

Son yıllarda EBR'nin bitki hücrelerinin dışında memeli hücreleri üzerine etkileri de araştırılmaya başlanmıştır. Fare adrenal medulla nöronal hücre hattı olan PC12 hücreleri üzerinde EBR'nin etkisi incelenmiş ve bu hücrelerde EBR'nin 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP+) tarafından indüklenen oksidatif stresten ve apoptozdan koruduğu gösterilmiştir. MPP+, Parkinson hastalığı modeli yaratmak için kullanılan, mitokondri fonksiyon bozukluğunu tetikleyen ve dopaminerjik nöronları tahrip eden bir kimyasaldır [331]. Carange ve diğ. [332] tarafından 2011 yılında yapılan çalışmada EBR'nin hücre içi reaktif oksijen seviyelerini azalttığı ve süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerinin aktivitelerini artırdığı gösterilmiştir. Aynı zamanda PC12 hücrelerinde MPP+ ile tetiklenen hasar EBR uygulaması sayesinde DNA kırıkları oluşumunda azalma, Bax/Bcl-2 oranının ve kaspaz 3 kesilmesinin azalması gibi apoptotik parametreleri etkilediği ileri sürülmüştür [332]. EBR'nin nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde önemli bir rol oynayabileceği gösterilmiştir.

EBR'nin etkileri aynı zamanda kanser hücrelerinde de çalışılmış ve olumlu sonuçlar verdiği görülmüştür [15-21].

2.5.4.2 Epibrassinolid'in Kanser Hücrelerindeki Etkileri

Doğal BR'ler, hücre çoğalması ile karakterize edilen kanser, Alzheimer, Huntington, steroidlerle tetiklenen osteoporoz, cinsiyet belirleyici organların farklılaşmasında meydana gelen aksaklıklar, androjen duyarsızlığı, astım, steroidlerle tetiklenen katarakt ve P450 oksidoredüktaz eksikliği gibi hastalıkların tedavisi için önerilmişlerdir. HMEC-1 (insan mikrovasküler endotel hücreleri) ve HUVEC (insan göbek bağı damarı endotel hücreleri) hücreleri anjiyogenez modeli olarak kullanılmış ve bu hücrelerde EBR ve homokastasteronun, hücre çoğalmasına etkileri Rarova ve diğ. tarafından [333] incelenmiş ve bu hücre hatlarında anjiyogeneze ket vurduğu gösterilmiştir.

BR'lerin farklı hücre hatlarında hücre döngüsüne etki ettikleri, büyümeyi, anjiogenezi engelledikleri ve apoptozu tetikledikleri belirlenmiştir [15]. EBR'nin hücre çoğalmasını azaltıcı etkisi fibroblast ve başta MCF-7 meme kanseri, A549 akciğer, K563 kronik miyeloid lösemi, RPMI 8226 çoklu miyeloma, CEM T-lenfoblastik lösemi, HeLa serviks kanseri gibi hücre hatlarında gösterilmiş ve doza bağlı olarak bu hücre hatlarında hücre canlılığında azalma tespit edilmiştir [15]. Bununla birlikte EBR'nin etkisinin hormona bağımlı olarak gelişen kanser hücre hatlarında daha etkili olduğu ileri sürülmüştür [15]. Östrojene bağımlı gelişen MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında EBR'nin hücre döngüsünü G₁ fazında inhibe ederek, döngüyü düzenleyen p21, p27, p53 ve siklinler gibi proteinlerin anlatımını etkileyip, apoptozu indüklediği gösterilmiştir [15].

BR'lerin apoptozu nasıl tetiklediği tam olarak bilinmemekle beraber, hormon reseptörleri anlatımı bulunan hücre hatlarında daha iyi sonuç vermesinden dolayı, EBR ile tetiklenen apoptozda steroid hormon reseptörlerinin rolleri olabileceği ileri sürülmüştür. BR'ler ile insan steroidleri arasındaki benzerlikten yola çıkarak, BR'lerin steroid hormon reseptörleri ile etkileşimi incelenmiştir [15]. Bulgulara göre EBR, ER'ye zayıf bağlanırken, yapay bir BR olan kolestanon, östrojen ve androjen reseptörü agonisti olarak belirlenmiştir. MCF-7 hücrelerinde ER'nin, EBR uygulaması ile

sitoplazmada kalarak nukleusa göç etmediği ve yıkıldığı gösterilmiş ve bu nedenle EBR meme kanseri için potansiyel anti-kanser ajan olarak önerilmiştir [15]. Bununla birlikte EBR'nin PKa hücre hatlarında apoptotik mekanizmayı nasıl tetiklediği ve potansiyel androjen reseptörü etkisi bilinmemektedir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN MALZEMELER

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Ekler bölümünde Tablo 1’de sunulmuştur.

3.1.2. Hücre Kültürü Donanımları

Hücre kültüründe kullanılan donanımlar Ekler bölümünde Tablo 2’ de sunulmuştur.

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasal maddeler Ekler bölümünde Tablo 3’de sunulmuştur.

3.1.4. Kullanılan Moleküler Biyoloji Kitleri

Kullanılan moleküler biyoloji kitleri Tablo 4’te sunulmuştur

3.1.5. Kullanılan Tamponlar, Çözeltiler ve İçerikleri

RPMI Besiyeri :

RPMI sıvı besiyeri

% 10 sığır fetüsü serumu

% 1 (10 U/ml) penisilin/streptomisin

Bradford çözeltisi

Coomassie blue belirteci 25 mg

Etanol (%95’lik) 12,5 ml

Asetik asit (%85’lik) 25 ml

Saf su 212,5 ml

Yükleme Jel Tamponu: 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Ayırma Jel Tamponu: 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

% 10 (w/v) APS (amonyum persülfat) 10 ml

1 gr APS 10 ml distile su içerisinde çözündürülerek hazırlanır. -20°C’de saklanır.

%4’lük yükleme jeli (20 ml için)

2.6 ml Akrilamid:bis-akrilamid çözeltisi

5 ml Yükleme jel tamponu

0.2 ml % 10 (w/v) SDS

100 µl % 10 (w/v) APS

20 µl TEMED

12.2 ml saf su

%12’lik ayırma jeli (50 ml)

20 ml Akrilamid:bis-akrilamid çözeltisi

12.5 ml Ayırma jel tamponu

0.5 ml % 10 (w/v) SDS (sodyum dodesil sülfat)

500 µl % 10 (w/v) APS (amonyum persülfat)

25 µl TEMED (Tetrametletilendiamin)

17 ml saf su

TBS (Tris tamponlu tuz çözeltisi) (10X) (1 litre):

24,2 gr Tris bazı

80 gr NaCl

pH 7,6

1X TBS-Tween (1 litre):

100 ml TBS 10X

500 µl Tween 20

10X SDS-PAGE (SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi) yürütme tamponu (500 ml)

15.2 gr Tris bazı

72 gr glisin

5 gr SDS

Transfer tamponu (1 litre):

3 gr Tris bazı

14,4 gr Glisin

200 ml Metanol

Kemiluminisans Tamponu:A çözeltisi

9 ml saf su

1ml 1M tris-HCl, pH 8,5

45 µl kumarik asit

100 µl luminol

B çözeltisi

9 ml saf su

1ml 1M tris-HCl, pH 8,5

6,2 ml H₂O₂

Hazırlandıktan sonra karanlıkta saklanmaktadır.

3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ, HÜCRE CANLILIĞI VE SAĞKALIM TAYİNİ**3.2.1. Hücrelerin Yetiştirilmesi**

Tez kapsamında kullanılan PKa hücre hatları LNCaP ve DU145, American Type Tissue Culture Collection' dan temin edilmiştir. Bu hücre hatlarından LNCaP, androjen reseptörü anlatımı yapması bakımından yabancı tip PKa hücre hattı olup *in vivo* da ilk evrelerdeki kanserli hücelere benzerlik gösterirken, DU145 hücre hattı ise androjen reseptörü anlatımı bakımından yoksun, beyin metastazından izole edilmiş ve daha yayılımcı kanser hücrelerini temsil etmektedir. Hücreler RPMI (Roswell Park Memorial Institute) besiyerinde % 10 sığır fetusu serumu ve 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotik katkısı ile % 5 CO₂ içeren 37°C'de inkübatörde üretilmiştir. Hazırlanan besiyeri 0,22 µM por çapındaki hücre kültürü ile uyumlu filtrelerden geçirilerek steril hale getirilip, 50 ml'lik falkon tüplerde +4°C'de saklanmıştır.

Hücreler 75 cm² lik petri kaplarında yetiştirilmiştir. Protein izolasyonu için 100 ve 60 mm'lik, poliamin izolasyonu için 60 mm'lik petri kaplarına, RNA izolasyonu ve FACS uygulamaları için 6 kuyulu petri kaplarına, floresan mikroskobu ve florometre çalışmaları için 12 kuyulu petrilere hücre ekimleri gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin gece boyunca petri kaplarına yapışmaları beklendikten sonra gerekli ilaç ve/veya inhibitör uygulamaları belirlenen sürelerde uygulanmış ve 37 °C 'de % 5 CO₂ içeren etüvde bekletilmiştir.

3.2.2. Hücrelerin Kaldırılması, Sayımı ve Pasajlanması

Hücre ekimi ya da petri kabındaki hücrelerin sayılarının artması sonucu hücre pasajlanması işlemi için ortamdan besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 75 cm² lik petri kaplarında 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkayıp 2 ml tripsin-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) (% 0,25) ile CO₂ içeren etüvde 2 dakika bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda hücrelerin zarar görmesinin engellenmesi için petri kabına 2 ml RPMI besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi durdurulmuş hücreler santrifüj tübüne alınmıştır. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmış, hücrelerin üzerine 1ml taze besiyeri eklenmiştir. İyice pipetaj yapıp homojen bir hale gelen hücre süspansiyonu hücre sayımına hazırlanmış bulunmaktadır.

Hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Neubauer hemositometresinin kanalına aktarılmış ve üzeri lamel ile kapatılmıştır. Hemositometrede 25 karede sayılan hücre sayısı, 1ml'deki hücre sayısının bulunabilmesi için 10⁴ ile çarpılmıştır. 1,5x10⁶ hücre, 75 cm²'lik petri kaplarına ekilerek hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Hücre Canlılığı Tayini

EBR'nin sitotoksik etkisinin zaman ve doza bağlı olarak tespit edilmesi, kaspaza bağımlı apoptozun belirlenmesinde kullanılan z-VAD-FMK (genel kaspaz inhibitörü, 10 µM), Z-LEHD-FMK (kaspaz-9 inhibitörü, 10 µM)'nın EBR'nin etkilediği hücre canlılığına etkisi, MDL72527 (PAO, SMO inhibitörü, 50 µM)'in EBR'nin etkilediği hücre canlılığına etkisi ve son olarak SSAT geçici gen susturmasının (SSAT siRNA, 1,25 µg) EBR'nin etkilediği hücre canlılığına etkisi metiltiazol difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi ile belirlenmiştir. Kısaca 1x10⁴ hücre/kuyu 96 kuyucuklu petri

kaplarında ekilip gece boyunca yapışmaları beklendikten sonra, hücrelere 0-100 μM EBR 0-48 saat boyunca farklı zaman aralıklarında uygulanmıştır. Seçilen EBR dozunu takiben, diğer deneyler 24 saatlik periyotlarda gerçekleştirilmiştir. MTT tetrazolium tuzu ile 4 saat bekletilen örneklerde oluşan kesilmiş formazan bileşikler canlı hücrelerin yüzeyinde birikir. Bu bileşiklerin verdiği renk 570 nm dalga boyundaki spektrofotometrik okumaya tabi tutulmuş ve ilaç uygulanmamış kontrol örneklerle oranlama yapılarak bağıl EBR sitotoksik düzeyi belirlenmiştir.

3.2.4. Hücre Sağkalım Tayini

Hücre sağkalım tayini için hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılıp, Neubauer hemositometrede sayıldıktan sonra 5×10^4 hücre 6 kuyulu petrilere ekilmiş ve gece boyu hücrelerin petri kaplarına yapışmaları beklenmiştir. 24-48-72 ve 96 saatlik zaman dilimlerinde 25 mM EBR uygulanmış ve bu süreler sonunda hücreler yeniden tripsin-EDTA ile kaldırılarak santrifüj ile çöktürülmüşlerdir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 1:1 oranında % 0,4'lük tripan mavisini eklendikten sonra, 10 μl hücre süspansiyonundan alınarak hemositometrede sayılmışlardır. Ölü olan hücreler tripan mavisini absorbe ederken, canlı olanlar şeffaf şekilde görülmüşlerdir. Bu şekilde EBR uygulaması sonucu sağ kalan hücrelerin sayısı belirlenmiştir.

3.2.5. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Erken pasaj sayıları olan hücreler yedeklemek amacıyla aşamalı olarak önce bir gece -80 °C buzdolabında, daha sonra uzun süre saklamak için -196 °C sıvı azot tankına alınmışlardır. Bu işlem için hücreler tripsin-EDTA ile muamele edilerek kaldırıldıktan sonra, 2000 rpm'de santrifüj edildikten sonra sayılmış ve yaklaşık 1×10^6 hücre kriyovial tüplerde dondurulmuştur. Dondurma işlemi için % 10'luk DMSO (Dimetilsulfoksit) kullanılmıştır.

Gerekli görüldüğünde hücreler sıvı azottan çıkartıldıktan sonra, hızlı bir şekilde çözdürülmüş ve önceden ısıtılarak 37 °C'ye getirilmiş besiyerinde 75 cm^2 lik petri kaplarına alınmışlardır. Hücreler petri kabına yapıştıktan sonra tripsin-EDTA ile kaldırılarak santrifüjleme işlemine tabi tutulmuş ve DMSO uzaklaştırılmıştır.

3.3. MİKROSKOBİK YÖNTEMLER

3.3.1. Işık Mikroskobu

1×10^4 hücre 12 kuyulu petri kaplarına ekildikten sonra yapışmaları için bir gece bekletilmiştir. Daha sonra 24 ve 48 saat süreyle 25 μ M EBR uygulanmıştır. EBR uygulanan ve uygulanmayan kontrol grubu hücrelerin morfolojik görüntüleri floresan ataçmanlı mikroskop ile beyaz ışıpta öncelikle 10x10 daha sonra 40x10 büyütmede belirlenmiştir.

3.3.2. Floresan Mikroskobu

3.3.2.1. Propidyum İyodür (PI) Boyama

1×10^4 LNCaP ve DU145 hücresi 12 kuyulu petri kaplarına ekilip bir gece yapışmaları beklendikten sonra, 24 saat boyunca 25 μ M EBR uygulanmıştır. İnkübasyon süresini takiben ilaçlı besi yeri mikropipet yardımıyla çekilip atıldıktan sonra, hücreler 5mg/ml propidyum iyodür (PI) içeren RPMI besiyeri ile 30 dakika boyunca bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda kuyulardan PI içeren medyum uzaklaştırılıp hücreler PBS ile yıkandıktan sonra, 500 μ l PBS eklenerek floresan ataçmanlı mikroskop ile incelenmiştir (Eksitasyon:536 nm, Emisyon: 617 nm). Ölü hücreler kırmızı renkte gözlemlenmiştir.

3.3.2.2. 3,3'-Diheksiloksakarbosiyanin İyodür (DiOC6) Boyama

1×10^4 sayıda LNCaP ve DU145 hücresine 12 kuyulu petri kabına ekildikten sonra, 24 saat süre ile 25 μ M EBR uygulaması sonunda, EBR'li RPMI besiyeri uzaklaştırılıp 4nm DiOC6 içeren besiyeri eklenmiştir. 15 dakika boyunca DiOC6 ile muamele sonucu hücreler boyayı içeren besiyerinden mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldıktan sonra bir kez PBS ile yıkanmış ve kuyulara 500 μ l PBS ilave edilmiştir. 488 nm eksitasyon ve 525 nm emisyon dalga boylarında floresan ataçmanlı mikroskop ile incelenmiş ve sağlıklı mitokondri membranına sahip hücreler yeşil olarak gözlemlenmiştir.

3.3.2.3. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama

LNCaP ve DU145 hücrelerinde EBR'nin neden olduğu DNA kondensasyonunu gözlemlmek için DAPI boyama gerçekleştirilmiştir. 1×10^4 sayıda LNCaP ve DU145 hücresi 12 kuyulu petri kabına ekilip bir gece petri kabına yapışmaları beklendikten sonra, 25 μ M EBR 24 saat süre ile uygulanmıştır. 24 saat sonunda EBR içeren besiyeri

uzaklaştırılıp yerine 5 mg/ml DAPI içeren besiyeri eklenmiş ve 10 dakika boyunca 37 °C'de % 5 CO₂ içeren etüvde bekletilmiştir. Bu süre sonunda DAPI içeren medyum çekilip hücreler PBS ile yıkanmış ve her kuyuya 500 µl PBS eklenmesinin ardından DNA kondensasyonu floresan ataçmanlı mikroskop ile 350 nm eksitasyon ve 470 nm emisyon dalga boylarında incelenmiştir.

3.3.2.4. 2',7'-diklorfloresein-diasetat (DCFH-DA) Boyama

DCFH-DA, EBR uygulanan hücrelerde oluşan ROS üretimini görüntülemek için kullanılmıştır. DCFH-DA, normalde floresan özellikte olmayan fakat hücre içine difüze olduktan sonra, hücrede bulunan reaktif oksijenlerle okside olarak DCF molekülüne dönüşerek floresan ışımaya veren bir moleküldür. 1x10⁴ sayıda LNCaP ve DU145 hücresine 12 kuyulu petri kabına ekildikten sonra, 25 µM EBR 24 saat süresince uygulanmıştır. Son konsantrasyon 1 µM olacak şekilde 37 °C'de % 5 CO₂ içeren etüvde 5 dakika bekletilen hücreler inkübasyon süresi sonrası PBS ile iki kez yıkanmışlardır. Daha sonra üzerlerine 500 µl fosfat tamponu eklendikten sonra, DCFH-DA'nın okside formu diklorfloreseinin floresan mikroskopunda emisyon 480 nm ve eksitasyon 500 nm dalga boylarında incelenmiştir.

3.4. FLOROMETRİK YÖNTEM

LNCaP ve DU145 hücreleri 1x10⁴ sayıda olacak şekilde 12 kuyulu petri kablarna ekildikten sonra, 24 saat boyunca 37 °C'de % 5 CO₂ içeren etüvde 25 µM EBR ile inkübe edilmişlerdir. Δψm potansiyelinin belirlenebilmesi için 24 saat sonunda EBR uzaklaştırılmış ve hücreler bir kez PBS ile yıkanmıştır. 4nm RPMI içinde hazırlanmış DiOC6 hücrelere uygulandıktan sonra, hücreler 15 dakika boyunca CO₂'li etüvde bekletilmiştir. 15 dakika sonunda DiOC6 içeren besiyeri mikropipet yardımı ile uzaklaştırılmış ve hücreler bir kez PBS ile yıkanmıştır. Bu işlemi takiben, her bir kuyucuğa 500 µl tripsin-EDTA eklenerek CO₂ içeren etüvde 2 dakika bekletilmiş ve hücrelerin petri kabının dibinden kalkmaları sağlanmıştır. Herbir kuyudaki hücre popülasyonu 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine geçirilerek, 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmeleri sağlanmıştır. Santrifüj işlemi takiben hücrelerin üzerine 200 µl PBS eklenmiştir. 96 kuyulu optikal petri kaplarına 50'şer µl olacak şekilde 4 ayrı

tekrar şeklinde bölünen kontrol ve EBR uygulanmış örnekler daha sonra 488 nm eksitasyon ve 525 nm emisyon dalga boylarında DiOC6 floresansı florometrede ölçülmüştür.

Florometrik yöntem hücrelerde açığa çıkan ROS miktarını belirlemek için de kullanılmıştır. 24 saat EBR uygulamasının ardından, besiyeri 12 kuyulu petrilere ekilmiş hücrelerin üzerinden çekilerek hücreler, 1X PBS ile yıkanmış, daha sonra 1 μ M DCFH-DA uygulanarak, 37 °C'de % 5 CO₂ içeren etüvde 5 dakika bekletilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonrası 1X PBS ile bir kez yıkanan hücrelere, 500 μ l tripsin-EDTA eklenerek CO₂ içeren etüvde 2 dakika bekletilmişlerdir. Hücreler daha sonra 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine alınmış, 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüşlerdir. Bu işlemten sonra, hücrelerin üzerine 200 μ l PBS eklenmiş ve hücreler pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. 96 kuyulu optikal petri kaplarına 50'şer μ l olacak şekilde 4 ayrı tekrar şeklinde bölünen örnekler emisyon 480 nm ve eksitasyon 500 nm dalga boylarında incelenmiştir.

3.5. ELİZA YÖNTEMİ

3.5.1. Hücrelerin Hazırlanması

LNCaP ve DU145 hücreleri 25 mm²'lik hücre petrilerinde 1X PBS ile yıkandıktan sonra, tripsin-EDTA uygulaması ile kaldırılmış, Neubauer lamında sayılmış ve 96 kuyucuklu petri kaplarına 1x10⁴ sayıda ekilmiştir. Hücrelerin petri kabının dibine yapışmaları bir gece beklendikten sonra gerekli ilaç veya inhibitör uygulamaları 3'er tekrarlı olmak üzere gerçekleştirilmiştir. EBR'nin apoptotik etkisinin belirlenmesi için 25 μ M EBR, p53 proteininin fonksiyonelliğinin EBR ile tetiklenen apoptozda belirlenmesi için 20 μ M pifithrin α , (p53 inhibitörü), 2,5 μ M nutlin-3 (Mdm2 inhibitörü), çeşitli poliamin katabolik enzimlerine özgü siRNA kompleksleri hücrelere belirlenen sürelerde uygulanmıştır.

3.5.2. ELİZA yöntemi

ELİZA kitinin içinde kısaca,

- Anti-histon, (klon H11-4)
- Anti-DNA-Peroksidaz (POD), (klon MCA-33)
- Yıkama tamponu
- İnkübasyon tamponu, (kullanıma hazır çözelti)
- Substrat tamponu, (kullanıma hazır çözelti)
- ABTS Substrat Tableti
- Mikroplaka modülü bulunmaktadır.

Uygulama sonrası ELİZA yöntemi Roche firmasının ürün kataloğuna göre gerçekleştirilmiştir. Kısaca; üretici firma tarafından sağlanan özütleme tamponundan 200 µl her bir petri kuyusuna eklenerek, petri kuyularında bulunan hücrelerin özütlenmesi 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 96 kuyulu petri kabı 10 dakika boyunca karıştırılmıştır. Her bir örneğin bulunduğu kuyulardan 20 µl çekilerek firma tarafından sağlanan ve tabanında anti-histon (biotin ile işaretli) ve anti-DNA (peroksidaz ile işaretli) antikorları bulunan özel kuyulara geçirilmiştir. Örneklerin üzerine daha sonra 80 µl immün karışım eklenmiştir. İmmün karışım üretici firmanın sağladığı 100'er µl anti-histon biotin ve anti-DNA antikorları ve 1800 µl saf su ile hazırlanmıştır. Örnekler daha sonra 2 saat süre ile karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında bekletilmiş ve üretici firmanın sağladığı peroksidaz çözeltisi ile 15 dakika bekletildikten sonra absorbans değerleri 405 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucuda elde edilmiştir.

3.6. İMMUNOBLOTLAMA

3.6.1. Total Protein İzolasyonu

LNCaP ve DU145 PKa hücreleri 1×10^6 hücre/kuyu olacak şekilde 100 mm çaplı petrilere ekilmiş ve uygun miktarda besi ortamı (RPMI besiyerinde % 10 sıgır fetüsü serumu ve 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotik katkısı ile) eklenmiştir. Bir gece petri kabına yapışmaları beklendikten sonra hücrelere 24 saat süre ile 25 µM EBR uygulanmıştır. EBR uygulamasından sonra besiyeri atılmış, hücreler soğuk 1X PBS ile

bir kez yıkanmış ve tekrar 1X PBS eklenmiştir. Bu aşamada kazıyıcı yardımı ile hücreler kaldırılmış ve 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine alınmışlardır. Tüpler 1 dakika 13200 rpm' de santrifüj edildikten sonra, süpernatant atılmıştır. Çökeltinin üzerine hücre protein özütleme tamponu, %10 proteaz inhibitörü ilavesi ile eklenmiştir. Oda sıcaklığında 15 dakika kalan örnekler daha sonra +4°C'de 20 dakika boyunca 13200 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar total protein tayini için -80 °C'de saklanmıştır.

3.6.2. Sitoplazmik ve Mitokondriyal Protein İzolasyonu

Sitoplazmik ve mitokondriyal protein izolasyonu için sitokrom c apoptoz kiti kullanılmış ve üretici firmanın protokolü takip edilmiştir. Kısaca; 4×10^6 sayıda LNCaP ve DU145 hücresi 100 mm hücre petrilere ekildikten sonra, 24 saat süre ile 25 μ M EBR uygulanmıştır. Hücreler 1X PBS ile yıkandıktan sonra, kazıyıcı yardımı ile petri kaplarından kaldırılıp mikrofüj tüplerine alınmıştır. Tüpler 2500 rpm'de +4 °C'de 5 dakika santrifüj edilip, elde edilen hücre lizatının üzerine firma tarafından sağlanan DTT içeren sitozol özütleme tamponu 20 μ l eklenip 10 dakika boyunca buzun üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra ezici yardımı ile iyice ezilen lizat 3000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildikten sonra, süpernatant sitozolik protein eldesi olarak saklanmıştır. Kalan peletin üzerine mitokondriyal ekstraksiyon tamponundan (firma tarafından sağlanan) 20 μ l eklenerek, 13200 rpm'de 30 dakika santrifüj yapılmıştır. Elde edilen süpernatant mitokondriyal protein tayini için -80 °C'de saklanmıştır.

3.6.3. Sitoplazmik ve Nuklear Protein İzolasyonu

Sitoplazmik ve nuklear protein izolasyonu için ProteoJET sitoplazmik ve nuklear protein izolasyon kiti kullanılmıştır. Kısaca, LNCaP ve DU145 PKa hücreleri 5×10^6 hücre/kuyu olacak şekilde 100 mm çaplı petrilere ekilmiş ve uygun miktarda besi ortamı eklenmiştir. Hücreler yapıştıktan sonra 24 saat boyunca 25 μ M EBR uygulanmıştır. İlaç uygulanmasından sonra, hücreler 1X PBS ile yıkanmış ve 1X PBS içinde kazınarak kaldırılmış ve mikrofüj tüplerinde toplanmıştır. 5000 rpm'de santrifüj edildikten sonra hücre pelletine 200 μ l hücre lizis tamponu (proteaz inhibitörü ve 0,1M DTT içermektedir) eklenmiştir. Örnekler daha sonra karıştırılıp, 10 dakika buzda tutulmuştur. + 4°C' de 500 rpm'de 7 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant ayrı

bir mikrofüj tüpüne alınmıştır (süpernatant sitoplazmik protein içermektedir).   okeltinin üzerine 500  l nukleus yıkama tamponu [proteaz inhibitörü ve 0,1M DTT (dikloro difenol trikloroethan) içermektedir] eklendikten sonra, örnekler karıştırılıp 2 dakika buzda bekletilmiştir. +4  C'de 500 rpm'de 7 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atılmıştır. Elde edilen   okeltinin üzerine 150  l nukleus saklama tamponu (proteaz inhibitörü ve 0,1M DTT içermektedir) ve 1/10 hacim kadar nukleus lizis tamponu eklenmiştir. Örnekler tekrar karıştırılarak 15 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra +4  C' de 13200 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant başka bir mikrofüj tüpüne alınmıştır (nuklear protein içermektedir).  zole edilen proteinler -80  C' de saklanmıştır.

3.6.4. Bradford Protein Miktar Tayini

Protein içeriğinin belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır [334]. Konsantrasyonu 1,5  g/  l olan BSA (sığır serum albumin) kullanılarak önce standart eğri oluşturulmuştur. Bu eğri şu şekilde hazırlanmıştır: 1,5  g/  l, 3  g/  l, 4,5  g/  l, 6  g/  l, 7,5  g/  l BSA'nın  zerine Bradford   zeltisi eklenerek 595 nm dalga boyunda absorbansları     lm ş, elde edilen proteinlerden 1  g/ l alınarak aynı dalga boylarında absorbansları belirlenmiştir. Standartların absorbans/konsantrasyon grafiği elde edildikten sonra, bu grafiğin eğim eşitliliği kullanılarak absorbans değerleri bilinen örneklerin konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.6.5. Proteinlerin SDS-PAGE'de Yürütülmesi

 mmunoblotlama yöntemi için Laemmli tamponu (4X) ve 30  g protein örnekleri 1:3 oranında karıştırılarak 95  C'de 5 dakika tutulmuştur. %4 yükleme ve %12'lik ayırma SDS-PAGE hazırlanarak, proteinler bu jel sistemine yüklenmişlerdir. Jel sisteminde ilk kuyuda daima protein belirteç ile birlikte 100 V'de 2 saat yürütme tamponunda yürütülmüştür.

3.6.6. Membrana Transfer ve bloklama

SDS-PAGE sonrası, yükleme jeli kesilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Ayırma jeli boyutunda kesilen poliviniliden fluorid (PVDF) membranlar jellerin altına konduktan sonra, membran ve jellerin her iki tarafına transfer tamponunda ıslatılmış filtre kağıtları

yerleştirilmiştir. Jel, membran ve filtre kağıtları kasetlere yerleştirilerek 1,5 saat boyunca 350 miliamperde transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfer işlemi sonrası membranlar, 2 saat oda sıcaklığında, %5'lik yağsız süt tozu (%0.1 Tween20 içeren 1X TBS) içerisinde bekletilerek bloklama işlemi yapılmıştır.

3.6.7. Primer ve Sekonder Antikor İşaretlemeleri

Süt tozu içerisinden alınan membranlar, 1X TBS-Tween ile 5 dakika olmak üzere 3 kez yıkandıktan sonra, primer antikorlarla gece boyu +4°C sıcaklıkta bekletilmişlerdir. Birincil antikorlar %5'lik yağsız süt tozu (% 0,1 Tween20 içeren 1X TBS) içinde aşağıda belirlenen dilusyonlarda uygulanmışlardır:

Beta-aktin (1:1000), sitokrom c (1:1000), siklin D1 (1:1000), siklin A (1:1000), p16 (1:1000), p21 (1:1000), CDK2 (1:1000), CDK4 (1:1000), CDK6 (1:1000), PARP (1:500), kaspaz 9 (1:500), kaspaz 3 (1:500), Puma (1:1000), Bak (1:500), Bax (1:1000), Bik (1:1000), Mcl-1 (1:1000), Bcl-2 (1:1000), Bcl-x_L (1:1000), ODC (1:1000), AZI (1:1000, Prof. Chaim Kahana'nın (Weizmann Enstitüsü) hediyesi), AZI (1:1000, Prof. Chaim Kahana'nın (Weizmann Enstitüsü) hediyesi), SSAT (1:1000), SMO (1:1000, Prof. Robert Casero'nun (Johns Hopkins Üniversitesi) hediyesi), PAO (1:1000), GAPDH (1:1000), p53 (1:500), Mdm2 (1:100), AR (1:500), Histon H3 (1:1000)

Primer antikorların uygulanmasını takiben membranlar 5'şer dakika boyunca 3 kez TBS-Tween ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından, membranlar anti-tavşan ve anti-fare ikincil antikorlar (1:3000) ile gece boyu +4 °C sıcaklıkta bekletilmiştir. İkincil antikor uygulamasının ardından, 10'ar dakikalık 3 TBS-Tween ve 10 dakikalık TBS yıkaması sonrasında, örnekler kemiluminisans tampon (A ve B çözeltilerinin 1:1 karışımı) ile 1 dakika muamele edilmiştir.

3.6.8. Bantların Görüntülenmesi

Membranlar kemiluminisans tamponu ile bekletildikten sonra, röntgen kasetleri içerisine, streç filmle sarılarak yerleştirilmiştir. Membranların üzerine röntgen filmleri yerleştirilerek, elde edilen kemiluminisansın filmi yakması sağlanmıştır. Geliştirici ve

sabitleyici film çözeltileri ile istenilen görüntü elde edilinceye kadar yıkanarak, en son aşamada filmler soğuk suda yıkanarak kurumaya bırakılmışlardır.

3.7. AKIM SİTOMETRİSİ

3.7.1. Hücrelerin Hazırlanması

3×10^5 sayıda LNCaP ve DU145 hücresi 6 kuyucuklu hücre petrilere ekilerek, bir gece boyunca 37°C 'de %5'lik CO_2 'li etüvde tutulmuşlardır. Petri kabının dibine yapışan hücrelere $25\ \mu\text{M}$ EBR uygulaması hücre döngüsünün tayini için 24, 48 ve 72 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Hücre membranının dışına çıkarak lokalizasyon değişikliği yapan fosfatilserinlerin tayini için kullanılan annexin V ve ölü hücrelerin belirlenmesi için kullanılan propidyum iyodür boyaması için ise 24 saatlik $25\ \mu\text{M}$ EBR uygulaması gerçekleştirilmiştir. Belirtilen zaman dilimlerinde EBR uygulamasını takiben hem yüzen hücreler hem de tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler santrifüj edilip, akım sitometrisi için hücreler hazırlanmaya başlanmıştır.

3.7.2. Apoptotik Hücre Ölümünün Anneksin V ve Propidyum İyodür Boyaması ile Akım Sitometrisinde Tayini

Apoptotik hücre ölümü akım sitometrisinde anneksin V-PI boyama ile tespit edilmiştir. Protokol üretici firmanın talimatlarına göre uygulanmıştır. Kısaca; santrifüj edilen hücreler $500\ \mu\text{l}$ anneksin V bağlama tamponu içinde karıştırıldıktan sonra, $5\ \mu\text{l}$ annexin V-FITC ve $5\ \mu\text{l}$ PI ($50\ \mu\text{g}/\text{ml}$) ile 10 dakika boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. Örnekler daha sonra akım sitometrisinde değerlendirilmişlerdir. Örnek başına 10000 hücre akım sitometrisi tarafından analiz edilmiştir. Annexin V floresansı absiste, PI floresansı ordinatta olmak üzere hücreler noktalar halinde dörtgen bölümlü grafikte sunulmuştur. Bu dörtgen grafiğin her bir bölmesindeki rakamlar hücre populasyonunun % değerini temsil etmektedir. Dörtgenin her bir bölmesi sırasıyla: alt sol: canlı; alt sağ: erken apoptotik; üst sağ: geç apoptotik; üst sol: nekrotik hücre populasyonlarını işaret eder. Veri analizi CellQuest programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.7.3. Hücre Döngüsünün Akım Sitometrisi Kullanılarak İncelenmesi

Tripsin-EDTA uygulaması sonrası santrifüj edilen hücreler %70 etanol ile fikse edilerek, 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. 5 dakika boyunca 1200 rpm’de santrifüj edilen hücreler daha sonra RNaz (100 ug/ml) ve PI (40 ug/ml) içeren 1X PBS içinde karıştırılmış ve örnekler 30 dakika boyunca 37 °C’de karanlıkta inkübe edilmişlerdir. Örnek başına 10000 hücre akım sitometrisinde incelenmiştir (Becton Dickinson). PI floresansı sunulan grafikte absiste verilmiştir. Bu grafiğe göre DNA miktarı, hücre siklusunun G1, S, G2 ve M evrelerinde değiştiği için, ilk pik 2n sayıda DNA içeren ve hücre siklusunun G1 fazındaki hücreleri, plato bölümü DNA sayısı artmaya başlayan S fazındaki hücreleri, 2. pik DNA sayısı 4n’e çıkmış G2 evresindeki hücreleri göstermektedir. G1 fazından önceki evre ise DNA kırıkları bulunduran apoptotik hücrelerin yer aldığı subG1 fazı olarak bilinmektedir. Veri analizi CellQuest programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.8. POLİAMİN MİKTARLARININ YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMOTOGRAFİSİ (HPLC) İLE TAYİNİ

3.8.1. Hücrelerin Hazırlanması

1×10^6 sayıda LNCaP ve DU145 hücresi 60 mm’lik petri kaplarına ekilerek, bir gece boyunca 37 °C’de %5’lik CO₂’li etüvde tutulmuşlardır. Hücrelere daha sonra 24 saat boyunca 25 µM EBR uygulanmıştır. Poliamin içeriklerinin belirlenebilmesi için öncelikle hücreler 1X PBS ile yıkanmış, daha sonra kazıyıcı yardımı ile kazınarak kaldırılmış ve santrifüj tüplerinde toplanmışlardır. Tüpler daha sonra 13200 rpm’de bir dakika boyunca çöktürülmüş ve benzoilasyon işlemine geçilmiştir.

3.8.2. Benzoilasyon İşlemi

500 µl trikloroasetik asit (TCA) hücre lizatının üzerine eklenerek cam tüplere alınmış ve daha sonra üzerine 1ml sodyum hidroksit eklenmiştir. 10 ml %50 benzoil klorid eklenmesinin ardından tüpler 1 dakika boyunca karıştırılmıştır. 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrası tüpler tekrar 1 dakika boyunca karıştırılmıştır. Örneklerin üzerine 1 ml 5M sodyum klorür eklendikten sonra, her tüpe 2 ml dietileter

eklenip vortekslenmiştir. Aşağıda kalan tabaka yeni mikrofüj tüplerine alınmış ve daha sonra bu tabakanın üzerine saf su eklenerek tüpler karıştırılmıştır. Tüpler daha sonra 13200 rpm'de 2 dakika santrifüj edilip, kloroform içeren kısım yeni bir tüpe alınıp evaporatör yardımı ile cam tüplerde uçurma gerçekleştirilmiştir. Örneklerin üzerine 500 µl metil alkol eklenmiş ve elde edilen poliamin ekstraktı -20 °C'de saklanmıştır.

3.8.3. Poliamin Standartlarının Hazırlanması

Poliamin analizleri yüksek basınçlı sıvı kromatografi cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak % 60'lık metanol kullanılmıştır. İnternal standart olarak diaminooktan kullanılmıştır. Kromatografiden çıkacak sonuçların analiz edilmesinden önce poliamin standartları hazırlanarak cihazda okutulmuştur. Hazırlanan poliamin standartları aşağıdaki şekildedir:

1 mM Put: 8 mg Put hidroklorid (50 ml saf su ile)

1mM Spd: 12,7 mg Spd hidroklorid (50 ml saf su ile)

1 mM Spm: 17,4 mg Spm tetrahidroklorid (50 ml saf su ile)

3.8.4. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizi

Her analiz öncelikle hazırlanan standart örnekler enjekte edilerek başlanmıştır. Buna göre sırasıyla Put 6. dakikada, Spd 13. dakikada, Spm ise 23. dakikada HPLC kolonundan çıkarak ultraviyole ışık altında tespit edilmiştir. Örneklerin enjeksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen PA değerleri protein bazında ifade edilmiştir. Her analiz en az üç kere tekrarlanmıştır.

3.9. siRNA YÖNTEMİ İLE GEN SUSTURULMASI

3.9.1. Hücrelerin Hazırlanması

2×10^4 LNCaP ve DU145 hücresi 6 kuyucuklu petri kaplarına ekilerek bir gece petri kabına yapışmaları beklendikten sonra hücrelere SSAT siRNA, PAO siRNA ve AR siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. SSAT ve PAO siRNA uygulaması 48 saat, AR siRNA uygulaması ise 24 saat gerçekleştirildikten sonra gen susturulması kantitatif

eş zamanlı PCR ve immunoblotlama yöntemleri ile kontrol edilmiştir. Bu işlemler için siRNA uygulanan hücrelerden sırasıyla total RNA ve total protein elde edilmiştir.

3.9.2. siRNA Transfeksiyonu

SSAT siRNA 1,25 µg/µl, transfeksiyon ajanı ise 1:6 oranında, PAO siRNA yine 1,25 µg/µl, transfeksiyon ajanı ise 1:9 oranında uygulanmıştır. Bunun yanı sıra AR siRNA 0,5 µg/µl, transfeksiyon ajanı ise 1:1 oranındadır. Ayrıca hücrelere negatif kontrol olarak negatif siRNA transfeksiyonu da 1,25 µg/µl konsantrasyonda yapılmış, transfeksiyon ajanı 1:6 olarak uygulanmıştır. siRNA uygulamaları üretici firmaların önerdiği protokollere bağlı kalınarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca SSAT ve PAO fetal sığır serumu içermeyen besiyerinde hazırlanıp, 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, hücrelerin üzerinde bulunan RPMI besiyerine damla damla eklenip petri kabı dikkatli bir şekilde çalkalanmıştır. SSAT ve PAO siRNA uygulamaları 48 saat boyunca gerçekleştirilmiş ve bu süre sonunda siRNA içeren besiyeri, 25µM EBR içeren besiyeri ile değiştirilmiştir. AR siRNA ise yukarıda belirtildiği şekilde hazırlandıktan sonra, 6 kuyucuklu petri kaplarına ekilmiş ve üzerinde RPMI bulunan hücrelere damla damla eklendikten sonra petri kabı dikkatlice çalkalanmıştır. 24 saat AR siRNA uygulamasının ardından siRNA içeren besiyeri mikropipet yardımı ile çekilip atıldıktan sonra hücrelerin üzerine 25 µM EBR içeren besiyeri eklenmiştir.

3.10. KANTİTATİF EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

3.10.1. Hücrelerin Hazırlanması

Kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) için, 2×10^4 LNCAP veya DU145 hücresi 6 kuyucuklu petri kaplarına ekildikten sonra gerekli ilaç uygulamaları yapılmıştır. Çeşitli sürelerdeki ilaç, inhibitör veya siRNA uygulamaları sonrası besiyeri mikropipet yardımı ile çekilip atılarak hücreler 1X PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından, hücreler petri kabının dibinden kazıyıcı yardımı ile kazınarak santrifüj tüplerine geçirilmiş ve 13200 rpm'de 1 dakika santrifüj edilip çöktürülmüşlerdir. 1X PBS içeren üst sıvı atıldıktan sonra RNA izolasyonu protokolüne başlanmıştır.

3.10.2. RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini

RNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler ve tamponlar:

- TriPure izolasyon ajanı
- Kloroform
- % 70 etanol (v/v)
- Etanol
- Saf su (RNaz içermeyen)

Örnekler santrifüj işlemine tabi tutulduktan sonra üst sıvı çekilip atılan çökeltilere 250 µl TriPure özütlemeye ajanı eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Örnekler daha sonra 50 µl kloroform eklenmiş ve 15 saniye süre ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletilen örnekler daha sonra maksimum hızda +4°C'de 15 dakika santrifüj edilmişlerdir. Üst faz yeni bir mikrofüj tüpüne aktarılmış ve üzerlerine 125 µl etanol eklenmiştir. Mikrofüj tüpleri alt üst edilerek karıştırılmış ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Maksimum hızda +4 °C'de 10 dakika santrifüj edilen örneklerdeki üst faz RNA çökeltilisini oynatmadan dikkatli bir şekilde dökülmüştür. Daha sonra örnekler 250 µl % 70'lik etanol eklenmiş ve 8000 rpm'de +4 °C'de 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası etanol RNA peletini oynatmadan dikkatli bir şekilde dökülmüştür. Elde edilen pellet oda sıcaklığında 10 dakika, etanol kokusu gidene kadar kurutulmuştur. Bu süre sonunda pelletin üzerine 30 µl RNaz içermeyen saf su eklendikten sonra çözünmesini sağlamak için 55 °C'de 1 saat bekletilmiştir. İzole edilen RNA örnekleri -20 °C dondurucuda muhafaza edilmiştir.

İzole edilen RNA'ların miktarı spektrofotometre yardımı ile ölçülmüştür. Kısaca, öncelikle spektrofotometrede 100 µl saf su örnek olarak 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçülmüştür. Ardından 1:50 dilue edilen örnekler sırasıyla aynı dalga boylarında ölçülmüş ve ng/µl olarak konsantrasyonları kaydedilmiştir.

3.10.3. cDNA Sentezi

cDNA sentezi iScript sentez kiti kullanılarak, üretici firmanın protokolü izlenerek gerçekleştirilmiştir. Kısaca, reaksiyon karışımı aşağıdaki içeriğe göre toplamda 20 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

4 µl 5X iScript reaksiyon karışımı

1 µl iScript revers transkriptaz

1 µl RNA örneği

14 µl RNaz içermeyen su

Hazırlanan reaksiyon karışımı sırasıyla; 25 °C’de 5 dakika, 42 °C’de 30 dakika ve 85 °C’de 5 dakika ısıtıcıda tutularak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA spektrofotometrede 1:50 dilue edilerek ölçülmüştür. Elde edilen cDNA’lar -20 °C dondurucuda saklanmıştır.

3.10.4. PCR Amplifikasyonu

qRT-PCR ile gen anlatımı miktar tayini yapılabilmesi için öncelikle standart örnekler ve körden ikiye tekrar olacak şekilde reaksiyon tüpleri hazırlanmıştır. Standart örnekler için GAPDH referans gen olarak kullanılmıştır.

Hazırlanan standartlar:

100 ng kontrol cDNA, GAPDH primerleri

300 ng kontrol cDNA, GAPDH primerleri

500 ng kontrol cDNA, GAPDH primerleri

Hazırlanan örnekler:

500 ng kontrol cDNA, Hedef gen primerleri

500 ng kontrol cDNA, GAPDH primerleri

500 ng EBR veya siRNA uygulanmış cDNA, Hedef gen primerleri

500 ng EBR veya siRNA uygulanmış cDNA, GAPDH primerleri

Kullanılan primerler:

SSAT forward ve reverse primerler ile PAO forward ve reverse primerleri, gen dizileri sağlayıcı firmaların içeriği saklı ürünleridir.

GAPDH Forward: CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT

GAPDH Reverse: AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC

Yukarıda adı geçen örnekler kullanılarak 0.2 ml'lik PCR tüpleri içerisinde 25 µl PCR karışımı hazırlanmıştır. PCR için gerekli maddeler olan PCR tamponu, polimeraz, MgCl₂, dört deoksiribonükleozid trifosfatlar gibi maddeler 5X SYBR Green PCR Master Mix içerisinde karışım halinde bulunmaktadır.

PCR karışımı şu şekilde hazırlanmıştır:

X µl steril saf su (25 µl'ye tamamlayacak hacimde)

12,5 µl 5X SYBR Green PCR Master Mix

0.25 µM Primerler

Y µl cDNA (Yukarıda belirtilen ng'ı elde etmek için gerekli olan hacimde)

Hazırlanan örnekler polimeraz zincir reaksiyonu ile PCR cihazında aşağıdaki koşullarda çoğaltılmıştır:

Baslangıç denatürasyon 95°C 5 dakika

Denatürasyon 94°C 1 dakika

Bağlanma 55°C 1 dakika

Uzama 72°C 1 dakika

40 siklus tekrarlanmıştır

Son uzama 72°C 10 dakika

Hedef genlerin transkript miktarları standart örneklerin eşik döngüsü [threshold cycle (Ct)] değerlerinden yola çıkılarak çizilen standart grafiğin eğim grafiği üzerinden Pfaffl metodu ile hesaplanmıştır [335].

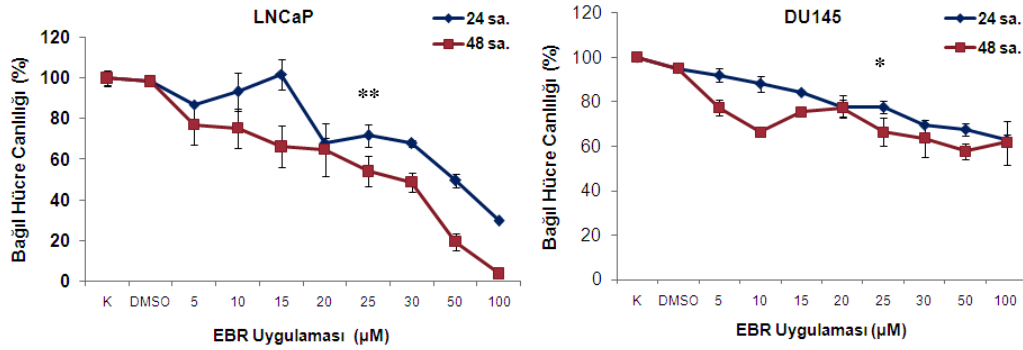
3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Elde edilen veriler en az üç deney tekrarının ortalamasıdır. Veriler Graph Pad 4.04 istatistik programı ile analiz edilmiştir. Grupların karşılaştırılmasında bağımsız t testi kullanılmış ve anlamlı değişimler için p değeri < 0.05 olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

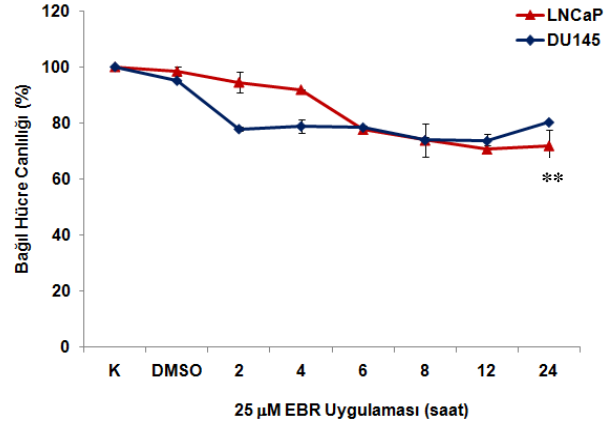
4.1. EPİBRASSİNOLİD'İN LNCaP VE DU145 HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ

EBR farklı PKa hücre hatlarına (DU145 (androjen reseptör negatif, p53 mutant) ve LNCaP (androjen reseptör pozitif, p53 pozitif) etkisi incelenmiştir. İlk olarak EBR'nin hücre canlılığına etkisi MTT testi ile tespit edilmiştir. RPMI besiyerinde % 5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik etüvde büyütülen DU145 ve LNCaP hücreleri, 1x10⁴ hücre/kuyu 96 kuyucuklu petri kaplarında ekilip gece boyunca yapışmaları beklendikten sonra hücrelere farklı dozlarda (0-100 µM) EBR 24 ve 48 saat süre ile uygulanmıştır. Uygulamayı takiben tetrazolium tuzu ile 4 saat bekletilen örneklerde oluşan kesilmiş formazan bileşikler canlı hücrelerin hücre yüzeyinde birikmiş ve bu bileşiklerin verdiği renk 570 nm dalga boyundaki spektrofotometrik okumaya tabi tutulmuştur. Şekil 4.1'de görüldüğü üzere EBR uygulaması yapılmamış kontrol hücrelerine oranla, 24 ve 48 saat EBR uygulanmış hücrelerin bağıl canlılık yüzdeleri zamana ve uygulanan EBR konsantrasyonuna bağlı olarak azalmıştır. 25 µM EBR hücrelerin %25'inde ölüme neden olduğu için daha sonraki deneylerde kullanılacak doz olarak belirlenmiştir.



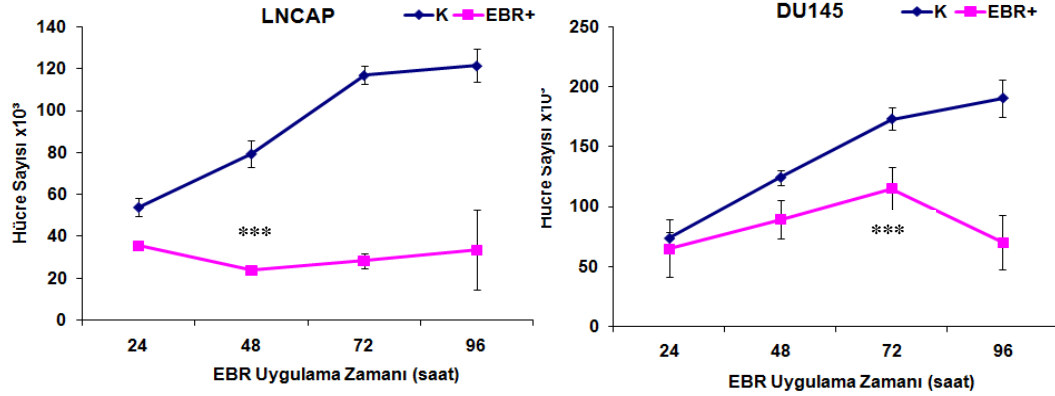
Şekil 4. 1. LNCaP ve DU145 hücre hatlarında EBR'nin dozuna bağlı olarak hücre canlılığının azalması. * p< 0,05, ** p< 0,01. K:Kontrol.

25 μ M EBR'nin erken zaman dilimlerinde de (0-4-6-8-12-24-48 saat) bağıl hücre canlılığına etki ettiği gözlemlenmiştir. LNCaP hücreleri EBR'ye DU145 hücrelerinden daha fazla hassasiyet göstermiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. LNCaP ve DU145 hücrelerinde, 25 μ M EBR uygulaması ile birlikte zamana bağlı olarak hücre canlılığı kaybı. ** $p < 0,01$. K:Kontrol.

EBR'nin DU145 ve LNCaP hücrelerinde sağkalım mekanizmasına etkisi, EBR uygulaması sonrası tripan mavisi boyaması sonrası ışık mikroskopunda incelenerek saptanmıştır. EBR uygulanan hücrelerde kontrol hücrelere kıyasla çoğalması engellenmiştir. EBR hücrelerde sitostatik etki yaratmıştır (Şekil 4.3).

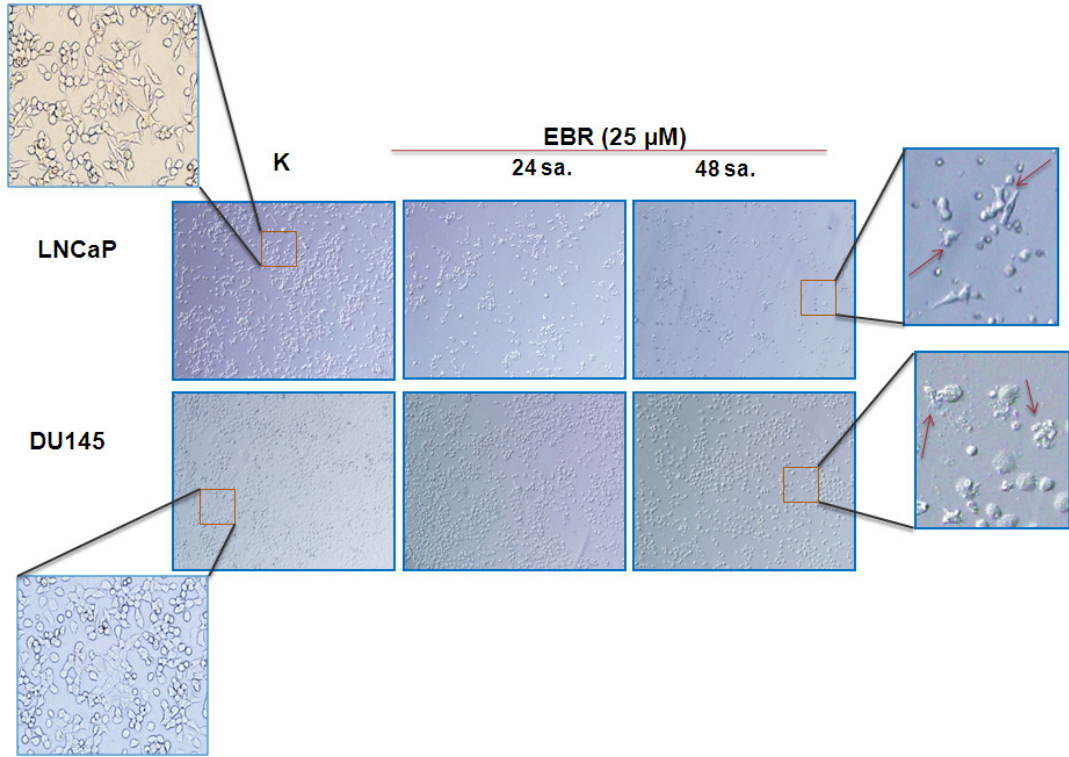


Şekil 4. 3. 25 μ M EBR'nin LNCaP ve DU145 hücre sağkalımını azaltması. *** $p < 0,001$.

K: Kontrol.

4.2. EPİBRASSİNOLİD'İN LNCaP VE DU145 HÜCRE HATLARINDA APOPTOTİK ETKİSİ

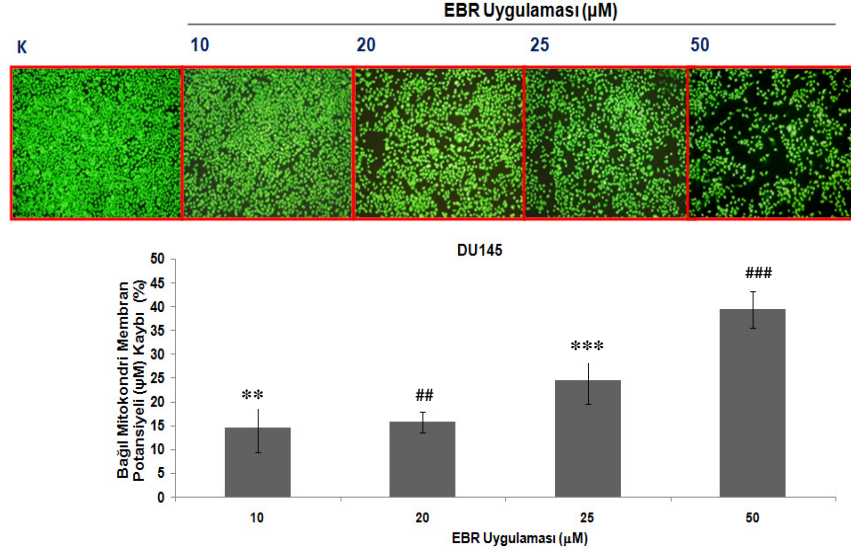
EBR uygulamasını takiben meydana gelen hücre canlılığı kaybının nedeninin apoptoz olup olmadığı araştırılmıştır. İlk olarak EBR uygulanan hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler mikroskopik yöntemlerle saptanmıştır. DU145 ve LNCaP hücre morfolojilerindeki değişiklikler ışık mikroskopunda farklı zaman dilimlerinde (24 ve 48 saatte) incelenmiştir. Hücreler 48 saatte yapışıkları petri kabından kalkarak küçülmüşler ve apoptotik oluşumlar sergilemişlerdir (Şekil 4.4).



Şekil 4. 4. EBR uygulamasının LNCaP ve DU145 prostat kanseri hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişim (100X, 400X büyütme). K:Kontrol.

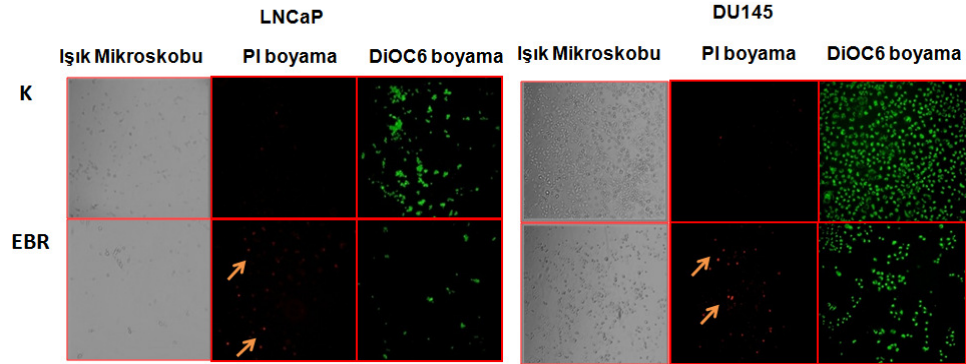
Apoptotik süreçte hücre membranında meydana gelen polarite değişiklikleri sonucu hücre membranında yapısal değişimler gözlenebilmektedir. Farklı dozlarda EBR uygulamasını takiben DU145 hücrelerinde $\Delta\psi_m$, DiOC6 boyama yapılarak floresan mikroskobu ile incelenmiştir. Şekil 4.5'te gösterildiği gibi artan EBR dozlarıyla beraber mitokondri membran potansiyeli bozulmamış sağlıklı hücre sayısı (yeşil olarak görülen

hücreler) azalmıştır. Aynı zamanda fluorometrede yapılan DiOC6 ölçümleri de EBR'nin doza bağlı olarak DU145 hücrelerinin $\Delta\psi_m$ 'ni bozduğunu doğrulamıştır (Şekil 4.5).



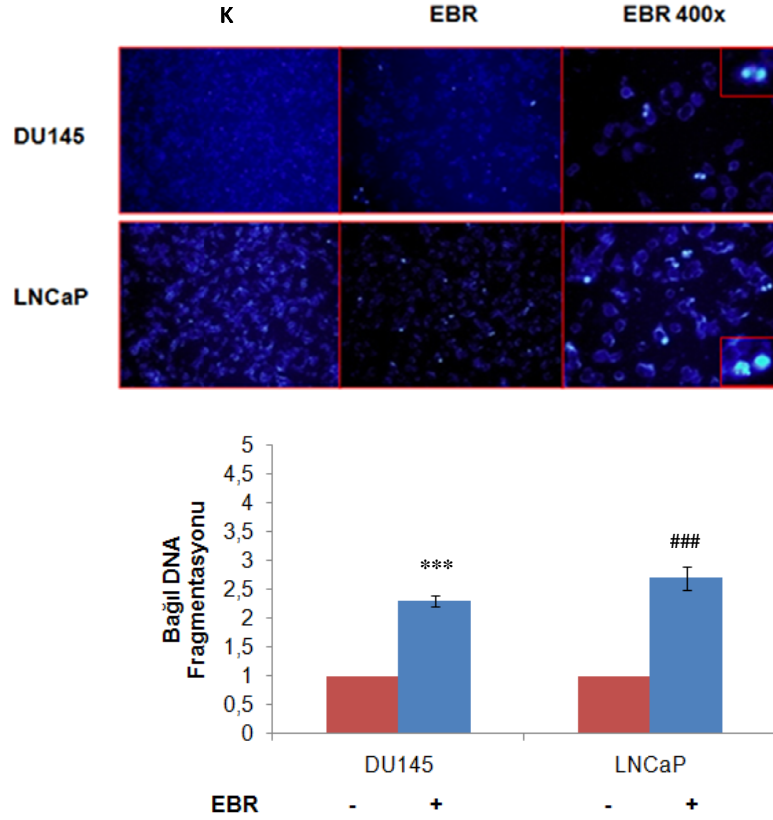
Şekil 4. 5. DU145 hücrelerinde artan dozlarda EBR uygulaması sonrası mitokondri membran potansiyeli kaybı. ** p<0.01, ## p<0,01, *** p<0,001, ### p<0,001. K:Kontrol.

Her iki hücre hattında EBR'nin neden olduğu hücre ölümü ve $\Delta\psi_m$ 'nin karşılaştırılması için sırasıyla PI ve DiOC6 boyaması yapılmıştır. Şekil 4.6'da görüldüğü üzere, EBR (25 µM) her iki hücre hattında propidyum iyodür pozitif hücrelerin sayısını artırmış yani hücre ölümüne neden olmuştur. Bu hücre ölümü tipi her iki hücre hattında da $\Delta\psi_m$ 'da artışa neden olan apoptotik ölüm olmakla birlikte, EBR'nin apoptotik etkisi LNCaP hücre hattında daha belirgin şekilde görülmektedir.



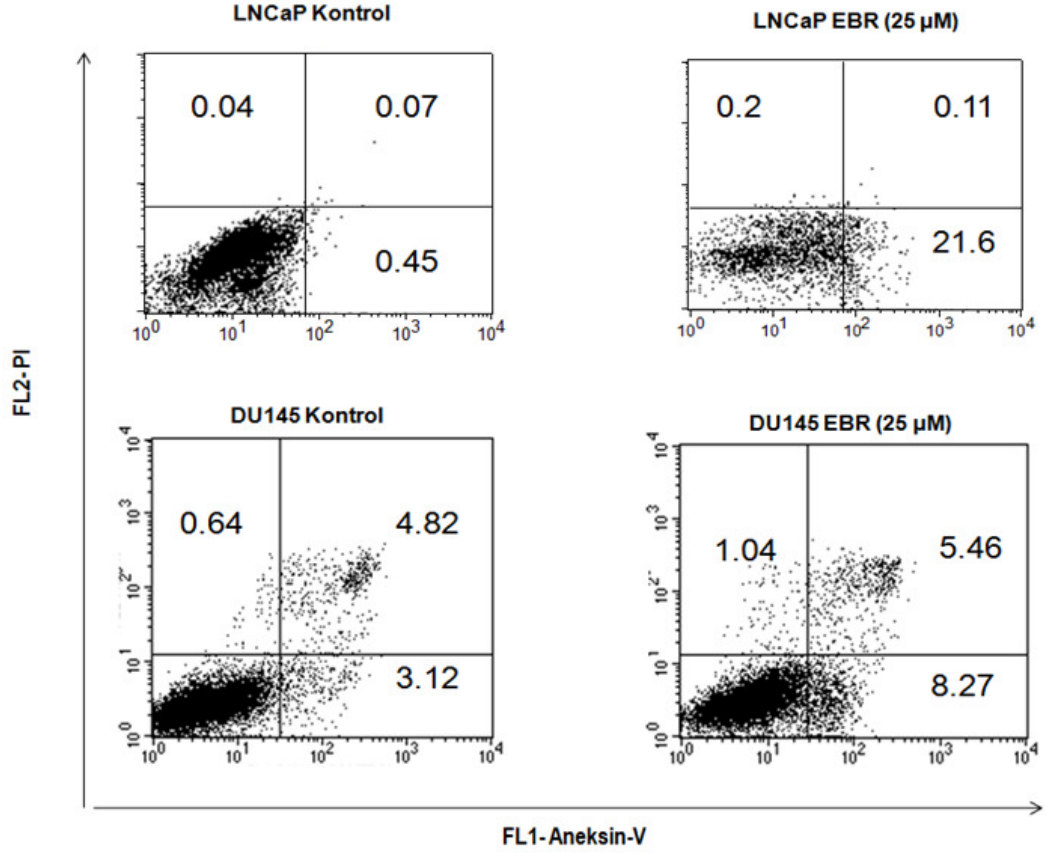
Şekil 4. 6. LNCaP ve DU145 hücrelerine EBR uygulaması sonrası hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli kaybı. K:Kontrol.

EBR'nin neden olduğu apoptoz aynı zamanda apoptotik bir diğer belirteç olan DNA kırıklarınının DAPI boyama sonrası floresan mikroskopu ile incelenmiş, aynı zamanda ELİZA yöntemi ile de gösterilmiştir (Şekil 4.7).



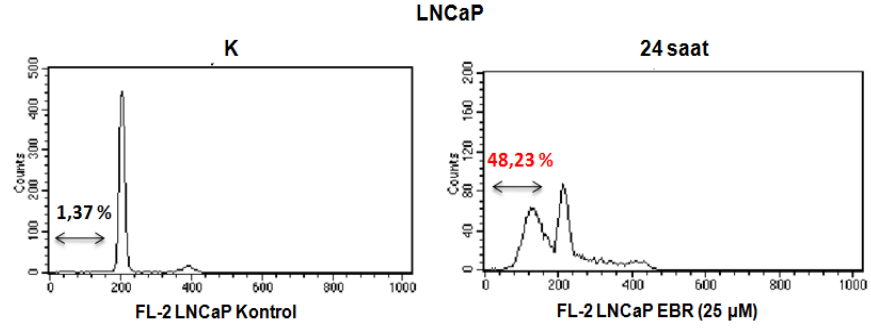
Şekil 4. 7. LNCaP ve DU145 hücrelerine EBR uygulamasının DNA kırıkları oluşumuna etkileri. *** $p < 0,001$, ### $p < 0,001$. K:Kontrol.

EBR uygulaması sonucu DU145 ve LNCaP hücrelerinde meydana gelen apoptotik erken ve geç evre değişiklikleri, anneksin-V ve PI boyaması sonrası akım sitometrisi yöntemi ile de analiz edilmiştir. Şekil 4.8'te gösterildiği üzere, 24 saat EBR uygulaması sonucunda anneksin V ile yüksek pozitif boyanan erken evre apoptotik hücreler grafiğin sağ alt, anneksin V-PI ikili boyanan geç evre apoptotik hücreler grafiğin sağ üst bölümlerinde görülmektedir. 24 saat EBR uygulaması, LNCaP hücrelerinde erken evre apoptotik popülasyonun, kontrol hücrelerine oranla, % 22 oranında artmasına neden olmuştur. DU145 hücrelerinin, erken ve geç evre apoptotik popülasyonların toplamı hücre popülasyonun sadece % 14'ünü oluşturmaktadır.

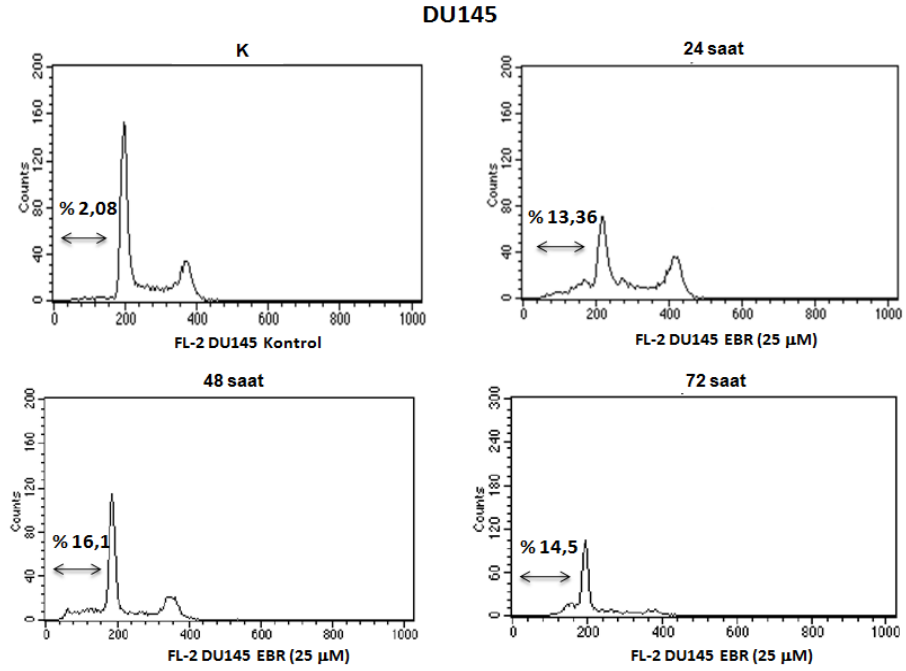


Şekil 4. 8. EBR uygulaması ile, LNCaP ve DU145 hücrelerinde gözlemlenen erken ve geç evre apoptotik hücreler.

Apoptotik hücre ölümünün saptanmasındaki bir diğer yöntem ise hücre döngüsünde subG₁ fazındaki hücrelerin propidyum iyodür boyama sonrası akım sitometrisi ile belirlenmesidir. SubG₁ fazı, G₁ fazından önceki fazda DNA kırıkları bulunan apoptotik hücrelerin gözlemlendiği faz olarak nitelendirilmektedir. Bu doğrultuda, 24 saat EBR uygulamasını takiben LNCaP hücrelerinde subG₁ fazında yaklaşık % 48 artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.9). Bununla birlikte 72 saate kadar olan zamanda DU145 hücrelerinde subG₁ fazı zamana bağlı olarak artmaktadır (Şekil 4.10).



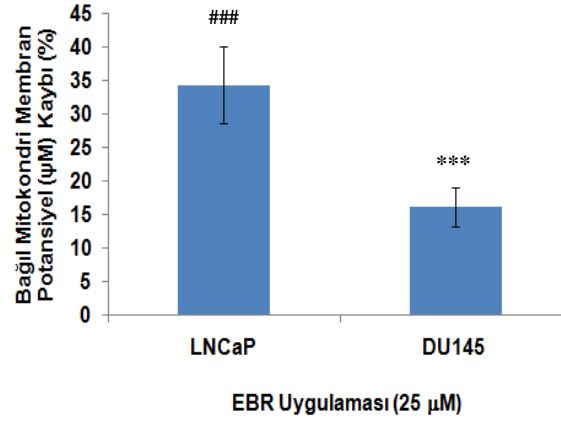
Şekil 4. 9. EBR uygulaması sonrası, LNCaP hücrelerinde hücre döngüsü fazları ve subG1 fazındaki hücre popülasyonlarındaki değişim. K: Kontrol.



Şekil 4. 10. Zamana bağlı EBR uygulaması sonrası, DU145 hücrelerinde hücre döngüsü fazları ve subG1 fazı popülasyonları. K: Kontrol.

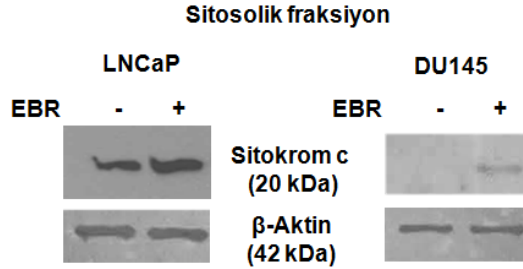
4.3. EPİBRASSİNOLİD'İN LNCaP VE DU145 HÜCRE HATLARINDA KASPAZA BAĞIMLI APOPTOZU İNDÜKLEMESİ

24 saat 25 μ M EBR uygulaması LNCaP ve DU145 hücre hatlarında $\Delta\psi_m$ 'ye yol açmıştır. $\Delta\psi_m$, DiOC6 boyaması sonrası fluorometrede 488 nm eksitasyon ve 525 nm emisyon dalga boylarında ölçülmüştür. Şekil 4.11'de görüldüğü gibi ψ_m EBR uygulaması sonucu hem LNCaP hemde DU145 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre artmaktadır. Bu etki LNCaP hücrelerinde daha belirgin şekilde gözlemlenmektedir.



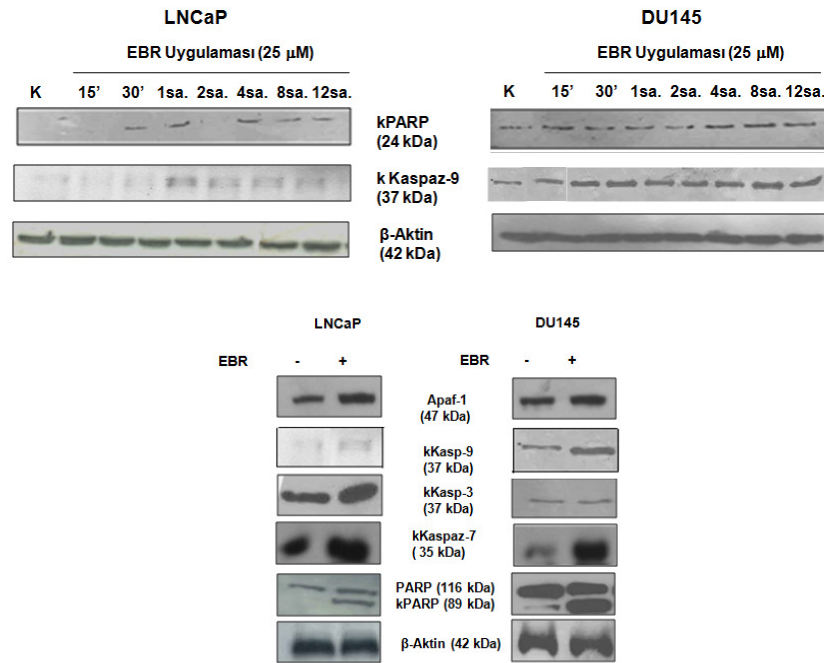
Şekil 4. 11. EBR uygulanmış LNCaP ve DU145 hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli kaybının gözlemlenmesi. ### p < 0,001, *** p < 0,001.

EBR aynı zamanda LNCaP hücrelerinde daha belirgin olmakla beraber her iki hücre hattında da mitokondride lokalize olan sitokrom c'nin sitoplazmaya çıkışını tetiklemiştir (Şekil 4.12).



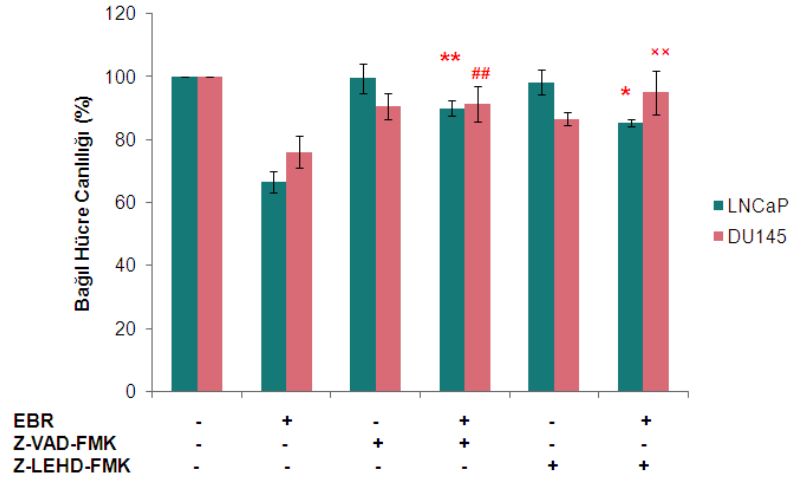
Şekil 4. 12. EBR uygulaması sonrası LNCaP ve DU145 hücrelerinde sitokrom c'nin sitoplazmaya göçü. β -aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.

Mitokondriden sitoplazmaya göç eden sitokrom c, sitoplazmada kaspaz-9 proteinini aktif hale getirerek, kaspaz kaskadını başlatmaktadır. Bu şekilde meydana gelen kaspaz-bağımlı apoptoz, 24 saat EBR uygulamasının ardından Apaf-1, kaspaz-9 ve PARP immunoblotlaması ile araştırılmıştır. Şekil 4.13'de görüldüğü üzere EBR uygulaması ile beraber prokaspaz-9'u aktif hale getiren Apaf-1 proteini anlatımı her iki hücre hattında da artmıştır. Bunun yanı sıra, aktif kaspaz-9 ve PARP kesimi her iki hücre hattında da gözlemlenmektedir. LNCaP hücrelerinde, EBR ile tetiklenen kaspaz-bağımlı apoptoz, etkili kaspaz-3'ün immunoblotlaması ile de belirlenmiştir. 24 saat 25 μ M EBR uygulamasının ardından LNCaP hücrelerinde kaspaz-3 kesimi gerçekleşmiştir (Şekil 4.13). DU145 hücrelerinde ise bu etki gözlemlenmemiştir. Daha sonraki aşamada, bir diğer etkili kaspaz olan kaspaz-7'nin EBR uygulaması ile protein ifadesi değişimi immunoblotlama yöntemi ile incelenmiştir. Kaspaz-7 ifadesi, kaspaz-3'ten farklı olarak sadece DU145 hücre hattında artmış, LNCaP hücrelerinde değişmemiştir (Şekil 2B). Bu sonuç EBR'nin iki farklı hücre hattında farklı kaspazları hedef alarak apoptozu tetiklediğini göstermektedir.



Şekil 4. 13. LNCaP ve DU145 hücrelerine zamana bağlı EBR uygulaması sonrası aktif kaspaz-9, kaspaz-3 ve PARP protein ifadelerinde değişimler. β -aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.

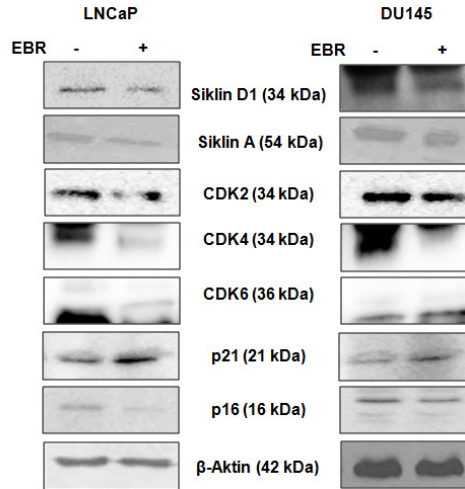
EBR'nin kaspaza bağımlı apoptotik mekanizma ile ilişkisini göstermek için çeşitli kaspaz inhibitörleri kullanılarak hücre canlılığı tespit edilmiştir. Şekil 4.14'te gösterildiği gibi EBR uygulamasından 24 saat önce Z-VAD-FMK (10 μ M, pan-kaspaz inhibitörü) olarak adlandırılan ve hücre içindeki tüm kaspazları inaktive eden bileşen ile, Z-LEHD-FMK, kaspaz 9 inhibitörü (10 μ M) 1×10^4 hücre/ kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu petri kaplarına ekilmiş hücelere uygulanmıştır. 24 saat sonra inhibitörleri içeren hücre besiyeri çekilerek yerine 25 μ M EBR 24 saat süre ile uygulanmıştır. Kaspaz-9 inhibitörü her iki hücre hattında da EBR uygulaması sonucu hücre canlılığının EBR uygulaması sonucu kaybedilmesini engellemiştir. Sonuç olarak EBR'nin LNCaP ve DU145 hücrelerinde DNA kırıkları meydana getirerek, sitokrom c proteininin mitokondriden sitoplazmaya göçünü başlatarak ve PARP proteininin kesilmesini sağlayarak apoptotik mekanizmayı harekete geçirdiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 14. EBR'nin kaspazlara bağımlı apoptozu indüklemesinin kaspaz inhibitörleri varlığında gösterimi. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ## $p < 0,01$, ^{xx} $p < 0,01$.

4.4. LNCAP VE DU145 HÜCRE HATLARINDA EPİBRASSİNOLİD UYGULAMASI SONRASI HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN İNCELENMESİ

EBR tarafından tetiklenen apoptotik mekanizma incelenirken, akım sitometrisinde subG1 adı verilen G1 fazından önceki fazda DNA kırıkları bulunan apoptotik hücrelerin gözlemlendiği hücre döngüsü fazı incelenmiştir. 24 saat boyunca uygulanan 25 μ M EBR'nin LNCaP hücrelerinde subG1 fazındaki hücre sayısını yaklaşık %50 oranında artırdığı fakat bu oranın DU145 hücrelerinde %14 olduğu belirlenmişti. Hücre döngüsünün devamlılığını koordine eden protein ailesi olan CDK ve siklinlerin EBR uygulaması sonucu değişimleri immunblotlama yöntemi ile belirlenmiştir. Şekil 9'da gösterildiği üzere, 24 saat 25 μ M EBR uygulaması sonucu, LNCaP ve DU145 hücrelerinde siklin D1 ve siklin A protein ifadeleri azalmıştır (Şekil 4.15). CDK2 ve 4'ün anlatımları EBR uygulaması sonucu LNCaP hücrelerinde azalırken, DU145 hücrelerinde sadece CDK4'ün anlatımı azalmaktadır. CDK6 ifadeleri ise her iki hücre hattında değişmemektedir (Şekil 4.15). Ayrıca, LNCaP hücrelerinde EBR uygulaması CDKların doğal inhibitörü olan p21 anlatımında artışa neden olurken, DU145'te aynı sonuç gözlemlenmemiştir. Bunun yanında her iki hücre hattında bir diğer CDK inhibitörü olan p16 düzeyleri ise EBR uygulaması sonucu her iki hücre hattında da azalmıştır (Şekil 4.15).

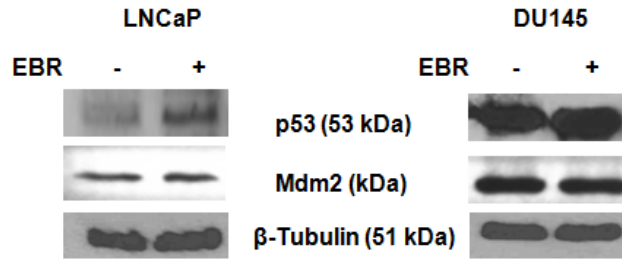


Şekil 4. 15. EBR'nin hücre döngüsünü düzenleyen siklinler ve sikline bağlı kinazların anlatımlarına etkisi. β -aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.

4.5. LNCaP VE DU145 HÜCRE HATLARINDA EPIBRASSİNOLİDLE TETİKLENEN APOPTOZDA P53'ÜN ROLÜ

LNCaP ve DU145 PKa hücreleri p53 proteinin anlatımını yapmaları bakımından birbirlerinden ayrılmaktadırlar. LNCaP hücre hattı doğal tip p53 anlatımı yaparken, DU145 hücre hattında p53 proteini mutant olup görevini yerine getirememektedir. p53 hücre içinde Mdm2 adı verilen bir protein ile kontrol altında tutulmaktadır. Normal şartlarda Mdm2 sitosolde p53 ile bağlı halde bulunurken, hücre herhangi bir stres faktörüne maruz kalırsa p53 Mdm2 ile birbirinden ayrılarak nukleusa göç etmekte ve burada hücre devrini kontrol eden proteinleri inaktif hale getirerek apoptotik mekanizmayı tetiklemektedir.

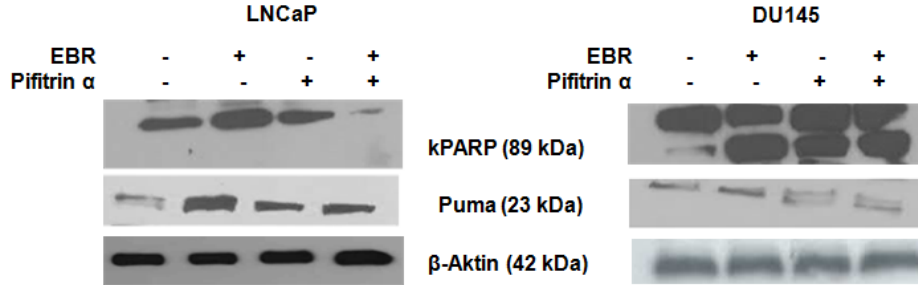
Şekil 4.16'da görüldüğü üzere, LNCaP hücrelerinde p53 anlatımı 24 saat süre ile 25 μ M EBR uygulamasını takiben artarken, Mdm2 anlatımı ise azalmaktadır. DU145 hücrelerinde ise EBR ne p53 ne de Mdm2 anlatımında bir değişikliğe yol açmamıştır.



Şekil 4. 16. EBR uygulamasının sonrası p53 ve Mdm2 protein ifadelerine etkisi. β -tubulin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.

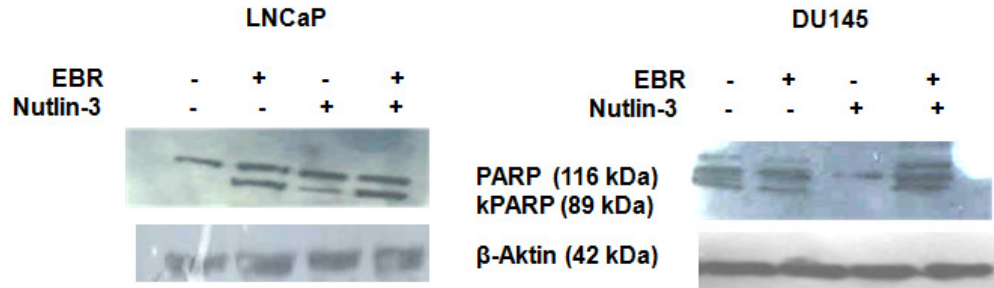
p53'ün EBR ile tetiklenen apoptozda önemini anlayabilmek için hücreler 25 μ M EBR ve pifithrin α (20 μ M) ile eş zamanlı olarak 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve örneklerden protein izolasyonu yapılarak, apoptotik biyobelirteç olan PARP proteininin kesilmiş hali immunoblotlama yöntemi ile incelenmiştir. Sonuç olarak şekil 5.2' de görüldüğü gibi pifithrin α eş zamanlı uygulaması LNCaP hücrelerinde EBR'nin neden olduğu apoptozu engellemiştir. Bu sonuçtan yola çıkılarak LNCaP hücrelerinde p53'ün fonksiyonel olduğu sonucuna varılabilir. Buna karşılık DU145 hücrelerinde ise EBR ile eşzamanlı pifithrin α uygulaması apoptotik mekanizmanın çalışmasını engellememiştir. p53 apoptotik mekanizmayı, Bcl-2 ailesi üyelerinden Puma'nın transkripsiyonunu

tetikleyerek indüklediği bilinmektedir. LNCaP hücrelerinde, EBR ile eşzamanlı pifithrin α uygulaması sayesinde aktivitesi bloke olan p53, Puma proteininin de anlatımını düşürmüştür (Şekil 4.17).



Şekil 4. 17. LNCaP ve DU145 hücrelerinde, p53 inhibitörü pifithrin α ve EBR eş zamanlı uygulamasının PARP ve Puma protein ifadelerine etkisi. β -aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.

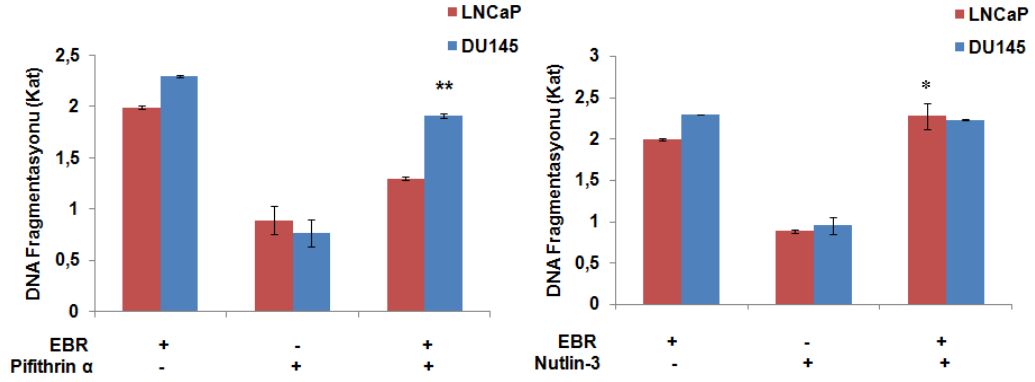
p53'ün, LNCaP hücrelerinde EBR ile tetiklenen apoptotik mekanizmada fonksiyonel olduğunu göstermek için son olarak Mdm2 inhibitörü Nutlin-3 (2,5 μ M) kullanılmıştır. Hipotez, Mdm2 aktivitesi indirgendiğinden p53'ü nukleusa göç etmesi üzerine kurulmuştur. Bu durumda, EBR uygulaması ile LNCaP hücrelerinde p53 serbestlenmesinin artışı aynı zamanda apoptozu tetiklemesi beklenmektedir. Şekil 4.18' de görüldüğü üzere 25 μ M EBR ile eş zamanlı olarak 24 saat boyunca uygulanan 2,5 μ M Nutlin-3, LNCaP hücrelerinde kesilmiş PARP proteinin düzeyini artırmıştır.



Şekil 4. 18. LNCaP ve DU145 hücrelerinde Mdm2 inhibitörü Nutlin-3 ve EBR eş zamanlı uygulamasının PARP proteini kesilimine etkisi. β -aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.

Son olarak, LNCaP hücrelerinde EBR ile eş zamanlı olarak pifithrin α veya Nutlin-3 uygulamasının DNA kırıkları oluşumuna etkisi ELİZA testi ile belirlenmiştir. Şekil 4.19'da gösterildiği gibi, eş zamanlı pifithrin α ve EBR uygulaması DNA kırıkları oluşumunu LNCaP hücrelerinde sadece EBR uygulamasına oranla artırmıştır. Buna

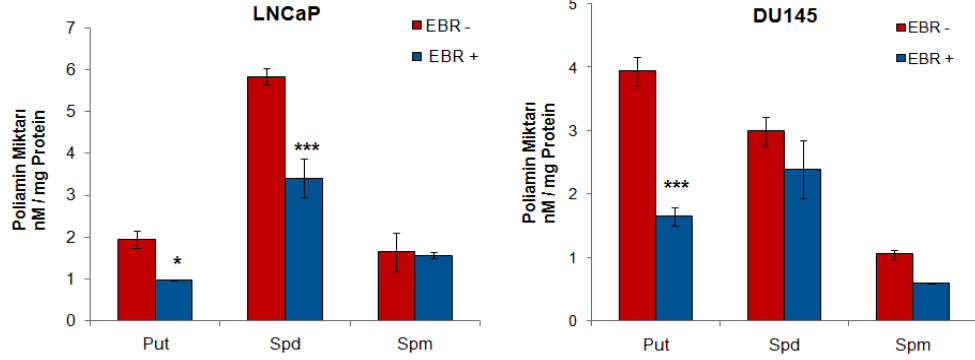
karşın, DU145 hücrelerinde aynı DNA kırıkları profili görülmemiştir (Şekil 4.19). Nutlin-3 uygulanmış LNCaP hücrelerinde DNA kırıklarının oluşumu incelendiğinde ise Mdm2'nin inaktif olması kırıkların oluşumunu anlamlı bir şekilde artırmaktadır (Şekil 4.19). Sonuç olarak, LNCaP hücrelerinde p53'ün EBR ile tetiklenen apoptozda fonksiyonel olduğu ortaya konulmuştur.



Şekil 4. 19. Pifithrin α veya Nutlin-3 ile eş zamanlı EBR uygulamasının LNCaP ve DU145 DNA kırıklarının oluşumuna etkisi. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.6. EPİBRASSİNOLİD UYGULAMASI SONRASI HÜCRE İÇİ POLİAMİN MİKTARLARININ SAPTANMASI

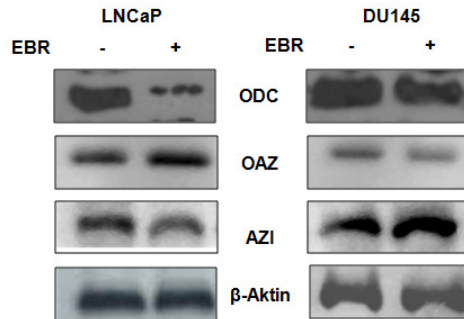
PKa gelişimi ile artan biyosentezleri dolayısıyla, EBR uygulaması sonucu DU145 ve LNCaP hücrelerinde hücre poliamin içeriği HPLC yöntemi ile belirlenmiştir. Benzoilasyon yöntemi ile poliamin standartları kullanılarak EBR uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde Put, Spd ve Spm tayini gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.20'de belirtildiği gibi 24 saat EBR uygulaması sonucu EBR uygulanmamış hücrelere oranla hücre poliamin içeriklerinde azalma her iki hücre hattında da saptanmıştır.



Şekil 4. 20. EBR'nin LNCaP ve DU145 hücreiçi poliamin havuzuna etkisi.
** p< 0,01, *** p< 0,001.

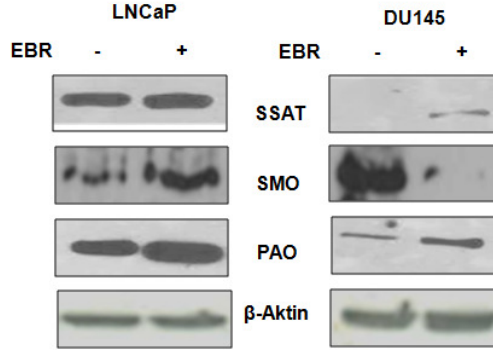
4.7. EPİBRASSİNOLİD'İN POLİAMİN METABOLİK ENZİMLERİNE VE ROS ÜRETİMİNE ETKİSİ

Hücre içi poliamin seviyelerindeki artışın nedenini anlayabilmek için ilk olarak poliamin biyosentez enzimlerinden ODC'nin ve onun regülatörleri olan OAZ ve AZI'nın anlatımları immunoblotlama metodu ile incelenmiştir. 24 saat 25 μ M EBR uygulaması ODC anlatım düzeyini her iki hücre hattında da azaltmıştır (Şekil 4.21). OAZ ifade düzeyi ise LNCaP hücrelerinde artarken, DU145 hücrelerinde azalmıştır. Bununla birlikte AZI yine her iki hücre hattında farklı şekilde değişmiştir. LNCaP hücrelerinde AZI ifade düzeyi azalırken, DU145 hücrelerinde ilaç uygulanmamış hücrelerde azalmıştır (Şekil 4.21).



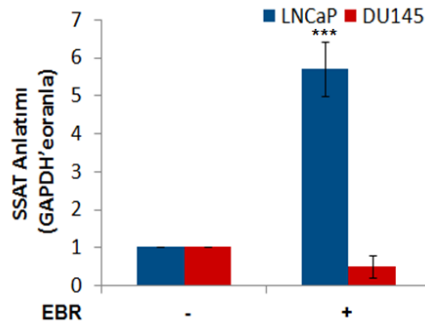
Şekil 4. 21. EBR uygulamasının LNCaP ve DU145 hücrelerinde ODC, OAZ ve AZI protein ifadelerine etkisi. β-aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.

Daha sonraki aşamada EBR'nin PA katabolik enzimlerinin protein ifade düzeylerine etkisine immunoblotlama yöntemi ile incelenmiştir. Şekil 4.22'de görüldüğü üzere SSAT ve PAO anlatımları 24 saat EBR uygulaması sonucu her iki hücre hattında da artmıştır. Bununla birlikte, LNCaP hücrelerinde SMO anlatımının belirgin bir şekilde arttığı (yaklaşık 1,5 kat, ImageJ programı ile ölçülmüştür) tespit edilirken, DU145 hücre hattında ise SMO'nun anlatımının azaldığı belirlenmiştir.

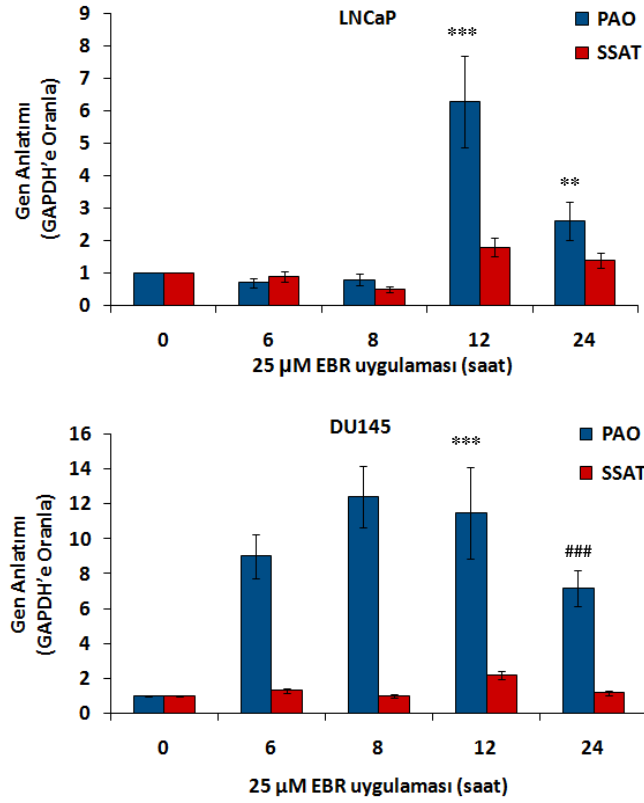


Şekil 4. 22. EBR uygulamasının LNCaP ve DU145 hücrelerinde SSAT, SMO ve PAO protein ifadelerine etkisi. β-aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.

Katabolik enzimlerden SSAT ve PAO'nun anlatım düzeyleri aynı zamanda eşzamanlı kantitatif PCR metodu ile de incelenmiştir. 24 saat EBR uygulaması sonrasında özellikle LNCaP hücrelerinde SSAT'nin yaklaşık 6 kat arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.23). Aynı zamanda SSAT ve PAO'nun anlatım düzeylerindeki artış aynı zamanda zamana bağlı olarak da artmaktadır (Şekil 4.24).

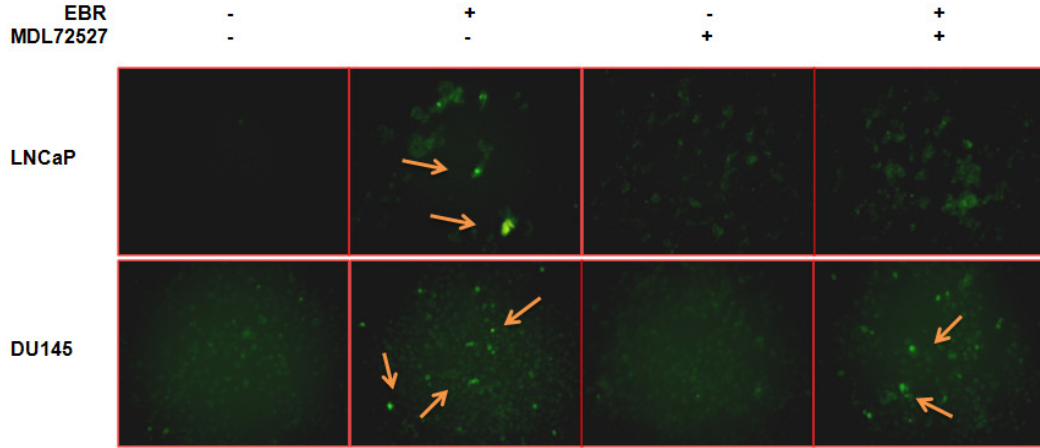


Şekil 4. 23. LNCaP ve DU145 hücre hatlarında EBR uygulaması sonrası SSAT anlatımı. GAPDH internal standart olarak kullanılmıştır. *** p < 0,001.



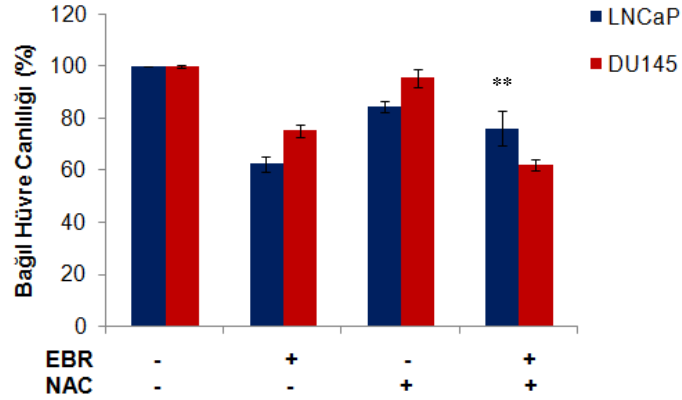
Şekil 4. 24. LNCaP ve DU145 hücre hatlarında, EBR uygulamasının SSAT ve PAO anlatımlarına etkisi. GAPDH internal standart olarak kullanılmıştır. *** p< 0,001, ### p< 0,001.

EBR tarafından tetiklenen apoptotik süreçte artan H_2O_2 miktarının ROS oluşumuna etkisi DCFH-DA boyama ile floresan mikroskobu ve fluorometre ile tespit edilmiştir. Şekil 4.25'te gösterildiği üzere, 25 µM EBR 24 saat sonrasında DU145 ve LNCaP hücre hatlarında kontrol hücrelere oranla ROT artışına sebep olmuştur. Özgül PAO ve SMO inhibitörü MDL 72,527 varlığında EBR uygulanmış LNCaP hücrelerinde ROT üretiminde azalma tespit edilmiştir. Aynı etki DU145 hücrelerinde saptanmamıştır. MDL 72,527 EBR ile tetiklenen ROS üretimini azaltmakta LNCaP hücrelerinde etkindir (Şekil 4.25).

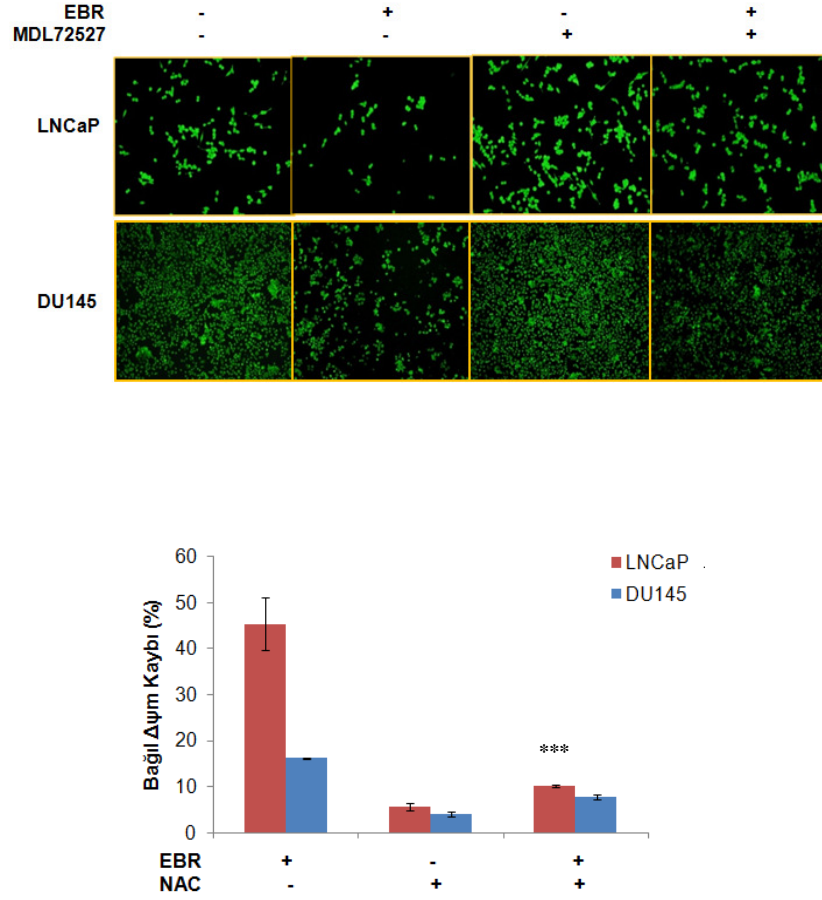


Şekil 4. 25. PAO inhibitörü MDL 72,527'nin EBR ile tetiklenen reaktif oksijen türlerinin üretimini baskılaması

EBR ile tetiklenen poliamin katabolik enzimlerinin yan ürünü H_2O_2 'nin yıkıcı etkisini önleyen bir ajan olan N-asetil sistein (NAC), DU145 ve LNCaP hücrelerine 25 μ M EBR ile eş zamanlı olarak 24 saat boyunca uygulanmış ve hücre canlılığındaki değişimler gözlemlenmiştir. Şekil 4.26' da görüldüğü gibi NAC hem LNCaP hücre hattında EBR'nin hücre canlılığına negatif etkisini engellemekte, aynı şekilde EBR tarafından tetiklenen apoptozda ROS'ların köken aldığı $\Delta\psi_m$ geri döndürmektedir (Şekil 4.27).



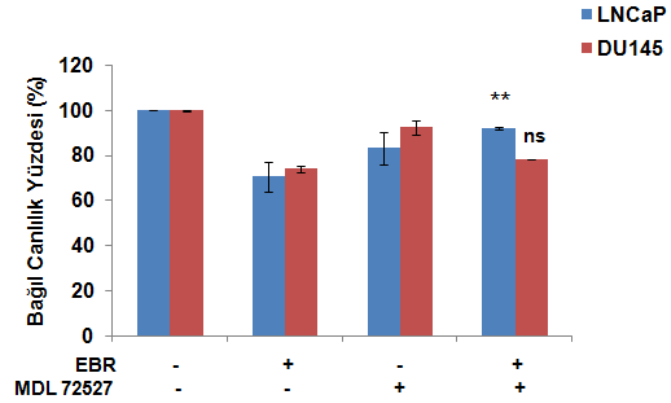
Şekil 4. 26. NAC'ın EBR ile tetiklenen hücre canlılığı kaybına etkisi. ** $p < 0,01$.



Şekil 4. 27. NAC'ın EBR ile tetiklenen mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisi.
*** p< 0,001.

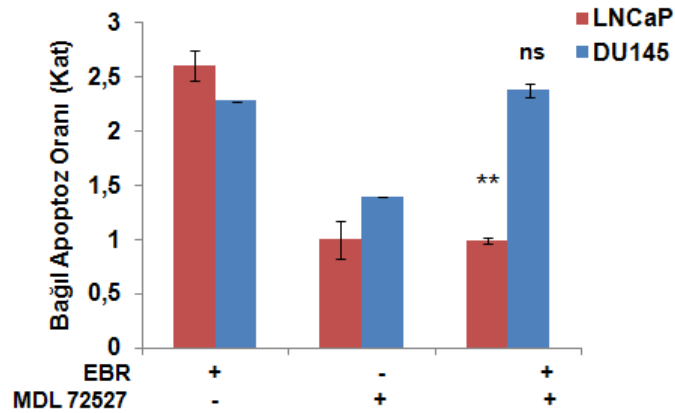
4.8. POLİAMİN KATABOLİZMASININ EPİBRASSİNOLİD İLE TETİKLENEN APOPTOZDAKİ ROLÜ

EBR ile tetiklenen apoptotik yolda PAO ve SMO enzimlerinin etkinliğinin anlaşılabilmesi için hücreler özgül PAO ve SMO inhibitörü MDL72527 ile muamele edilmiştir. Şekil 4.28' de gösterildiği şekilde 24 saat eş zamanlı MDL72527 ve EBR uygulaması sonucu, MDL 72,527 tek başına hücre canlılığına etki etmemiştir. Bununla birlikte LNCaP hücre hattında MDL 72,527 + EBR uygulaması, sadece EBR uygulaması ile kıyaslandığında, hücre canlılığı kaybına etki etmiş ve EBR'nin etkisini geri çekmiştir, aynı etki DU145 hücre hattında görülmemiştir (Şekil 4.28).

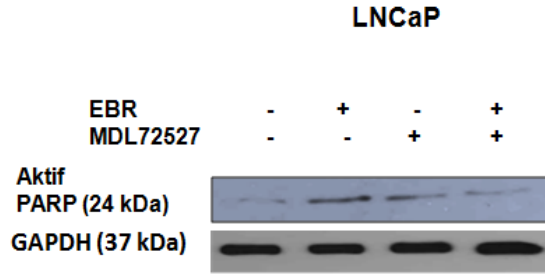


Şekil 4. 28. EBR ile eş zamanlı MDL 72,527 uygulamasının EBR ile tetiklenen hücre canlılığı kaybı üzerine etkisi. ** p<0,01, ns: anlamlı değil.

MDL72527 uygulamasının EBR uygulanan hücelere etkisi apoptotik mekanizma açısından da incelenmiştir. MDL 72,527 uygulaması, LNCaP hücrelerinde EBR'nin meydana getirdiği DNA kırıkları oluşumunu engellemiştir. Fakat DU145 hücrelerinde aynı etki görülmemektedir (Şekil 4.29). LNCaP hücrelerinde MDL 72,527 eş zamanlı uygulaması PARP kesimini de azaltmaktadır (Şekil 4.30)



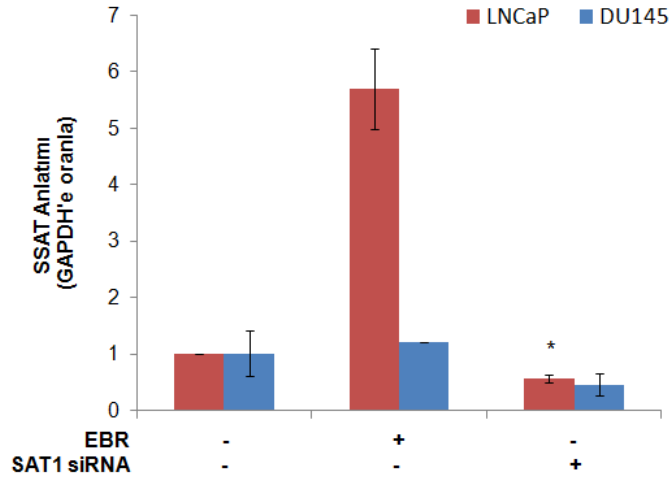
Şekil 4. 29. MDL 72,527 ve EBR eş zamanlı uygulamasının DNA kırıkları oluşumu üzerine etkisi. ** p< 0,01, ns: anlamlı değil.



Şekil 4. 30. MDL 72,527 ve EBR eş zamanlı uygulamasının EBR ile tetiklenen apoptoza etkisi. GAPDH yükleme standardı olarak kullanılmıştır.

4.9. SSAT ANLATIMININ SUSTURULMASININ EPİBRASSİNOLİD İLE TETİKLENEN APOPTOZDAKİ ROLÜ

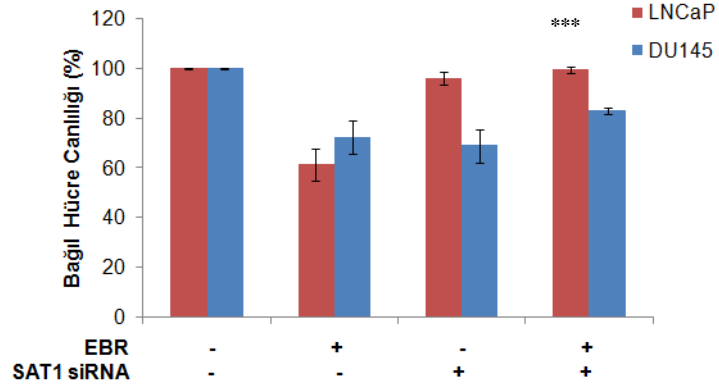
İmmunoblotlama ve eş zamanlı PCR ile SSAT fazla anlatımı tespit edildikten sonra, LNCaP ve DU145 hücrelerinde SSAT, 1,25 µg/µl spesifik siRNA ile susturulmuş ve EBR'nin etkileri araştırılmıştır. Şekil 4.31'de gösterildiği üzere SSAT'nin LNCaP hücre hattında %70 oranında susturulması gerçekleşmiştir.



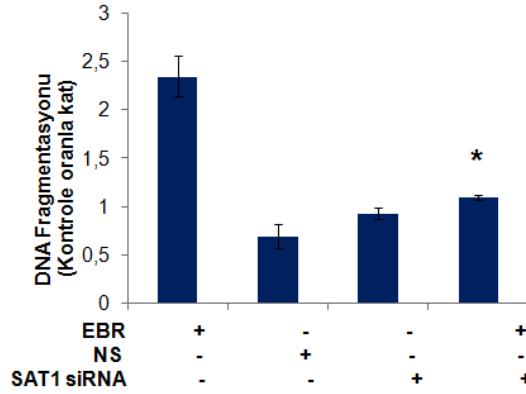
Şekil 4. 31. SSAT siRNA ile muamele edilen DU145 ve LNCaP hücrelerinde, 24 saat süre ile EBR uygulaması sonrası SSAT anlatımındaki azalma.* p< 0,05.

SSAT'i kodlayan SAT1 mRNA'sını hedef alan susturma gerçekleştirildiğinde EBR'nin LNCaP hücre canlılığına olan etkisi azalmıştır (Şekil 4.32). LNCaP hücre hattında SSAT mRNA'sının susturulması sonucu 25 µM EBR uygulanmış örneklerde, DNA

kırıklarının profili incelenmiş ve sadece EBR uygulaması yapılmış örneklerle oranla DNA kırıklarının oluşumunun azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.33). Sonuç olarak SSAT'nin özellikle LNCaP hücrelerinde EBR ile tetiklenen apoptotik hücre ölümünde rolü olabileceği ortaya konulmuştur.



Şekil 4. 32. SSAT siRNA uygulamasının EBR ile tetiklenen hücre canlılığının kaybına etkisi. ***p<0,001.

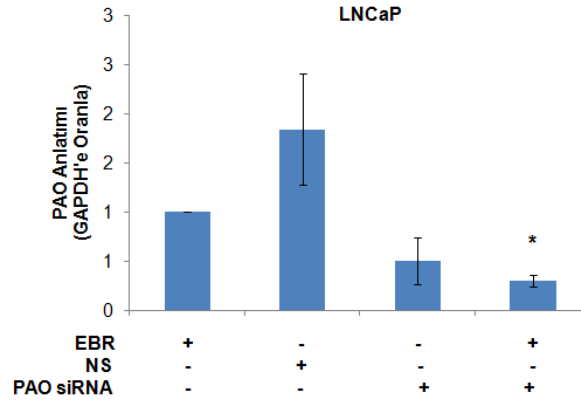


Şekil 4. 33. SSAT siRNA uygulamasının, EBR ile tetiklenen DNA kırıkları oluşumuna etkisi. NS: Negatif siRNA. *p<0,05.

4.10. PAO ANLATIMININ SUSTURULMASININ EPİBRASSİNOLİD İLE TETİKLENEN APOPTOZDAKİ ROLÜ

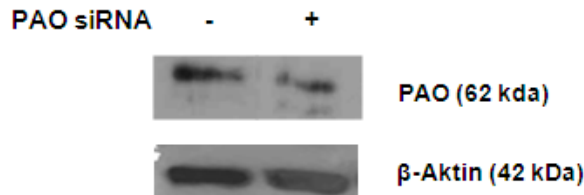
EBR uygulaması ile LNCaP ve DU145 hücrelerinde mRNA ve protein ifade düzeyinde artış saptanan PAO poliamin katabolik enzimi üzerinde durulmuştur. PAO enzimi

spesifik siRNA kompleksi (1,25 µg/µl, 1:9 siRNA/transfeksiyon ajanı) uygulanıp, PAO anlatımına kantitatif gerçek zamanlı PCR ile bakılmıştır. Şekil 4.34’ te görüldüğü üzere, 1.25 µg/ µl PAO siRNA uygulaması sonucu PAO anlatımı yaklaşık %75 oranında engellenmiştir. 25 µM EBR 24 saat süre ile PAO susturulması sonrasında uygulandığı zaman PAO anlatımı sadece EBR uygulanmış örneklerdeki gibi artmamıştır. Ortama eklenen ve EBR ile eş zamanlı olarak uygulanan PAO inhibitörü MDL 72527 varlığında da, aynı şekilde PAO anlatımı kontrole oranla düşük kalmıştır (Şekil 4.34).

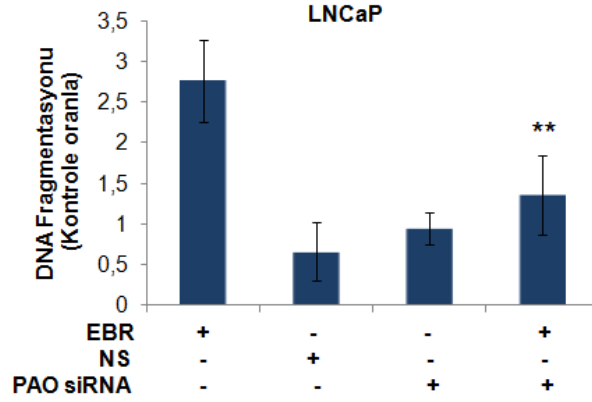


Şekil 4. 34. PAO siRNA ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde PAO anlatımındaki azalma. *p< 0,05.

PAO proteinin 1,25 µg/µl PAO siRNA ile susturulması işlemi aynı zamanda immunoblotlama ile de kontrol edilmiştir (Şekil 4.35). Son olarak, PAO siRNA ve 24 saat 25 µM EBR uygulanmış LNCaP hücrelerinin apoptotik ölüm düzeyi ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. PAO siRNA uygulaması ile LNCaP hücrelerinde EBR tarafından tetiklenen DNA kırıkları oluşumu, sadece EBR uygulanan örneklerle kıyasla azalmıştır (Şekil 4.36).

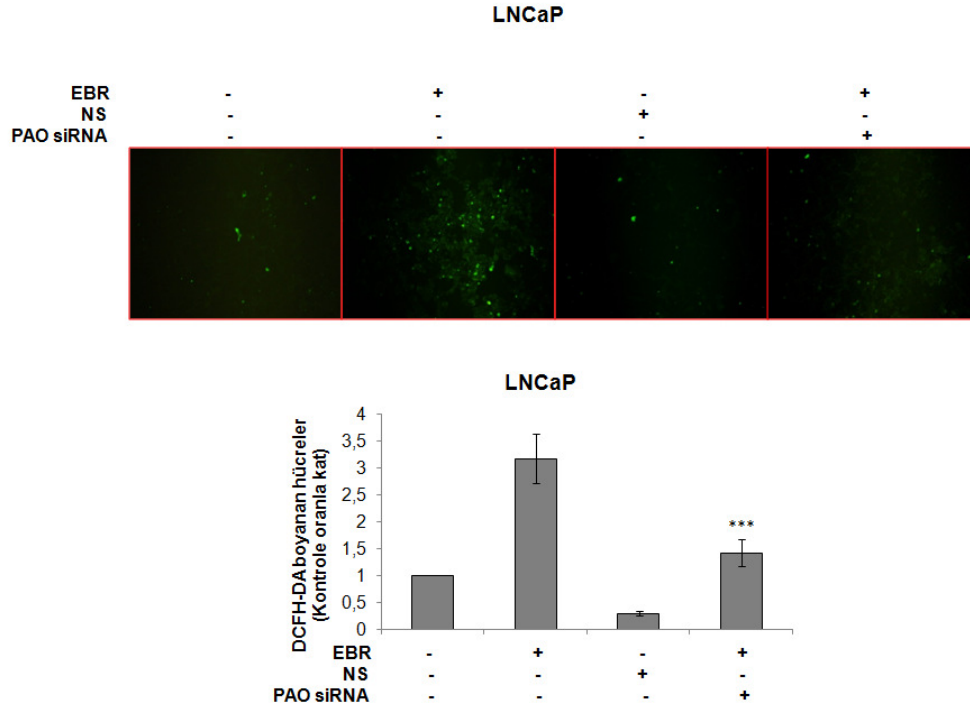


Şekil 4. 35. LNCaP hücrelerinde, PAO siRNA uygulaması ile PAO anlatımının susturulması. β-aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.



Şekil 4. 36. PAO siRNA uygulamasının EBR ile tetiklenen DNA kırıkları oluşumuna etkisi. NS: negatif siRNA. ** p< 0,01.

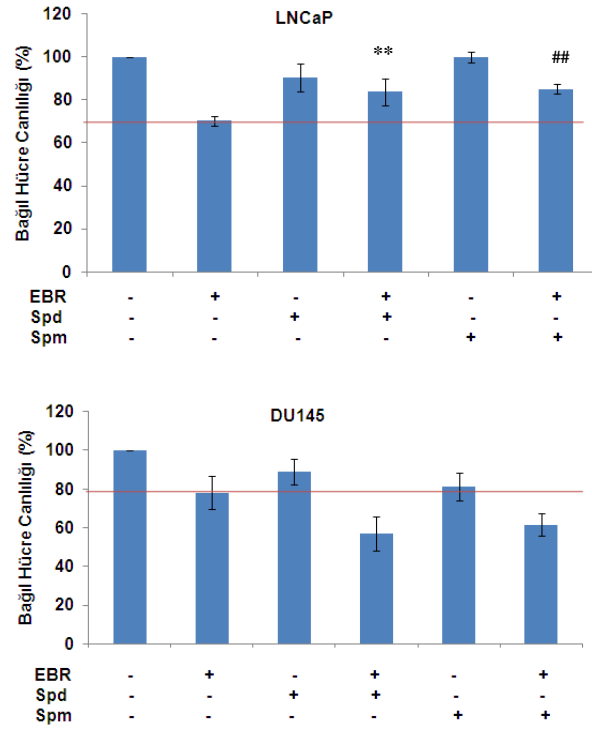
PAO siRNA uygulamasının EBR ile tetiklenen ROS üretimine etkisi de aynı zamanda incelenmiş ve EBR ile artan ROS miktarının siRNA uygulamasının ardından anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.37).



Şekil 4. 37. PAO siRNA uygulamasının EBR ile tetiklenen ROS üretimine etkisi. *** p< 0,001.

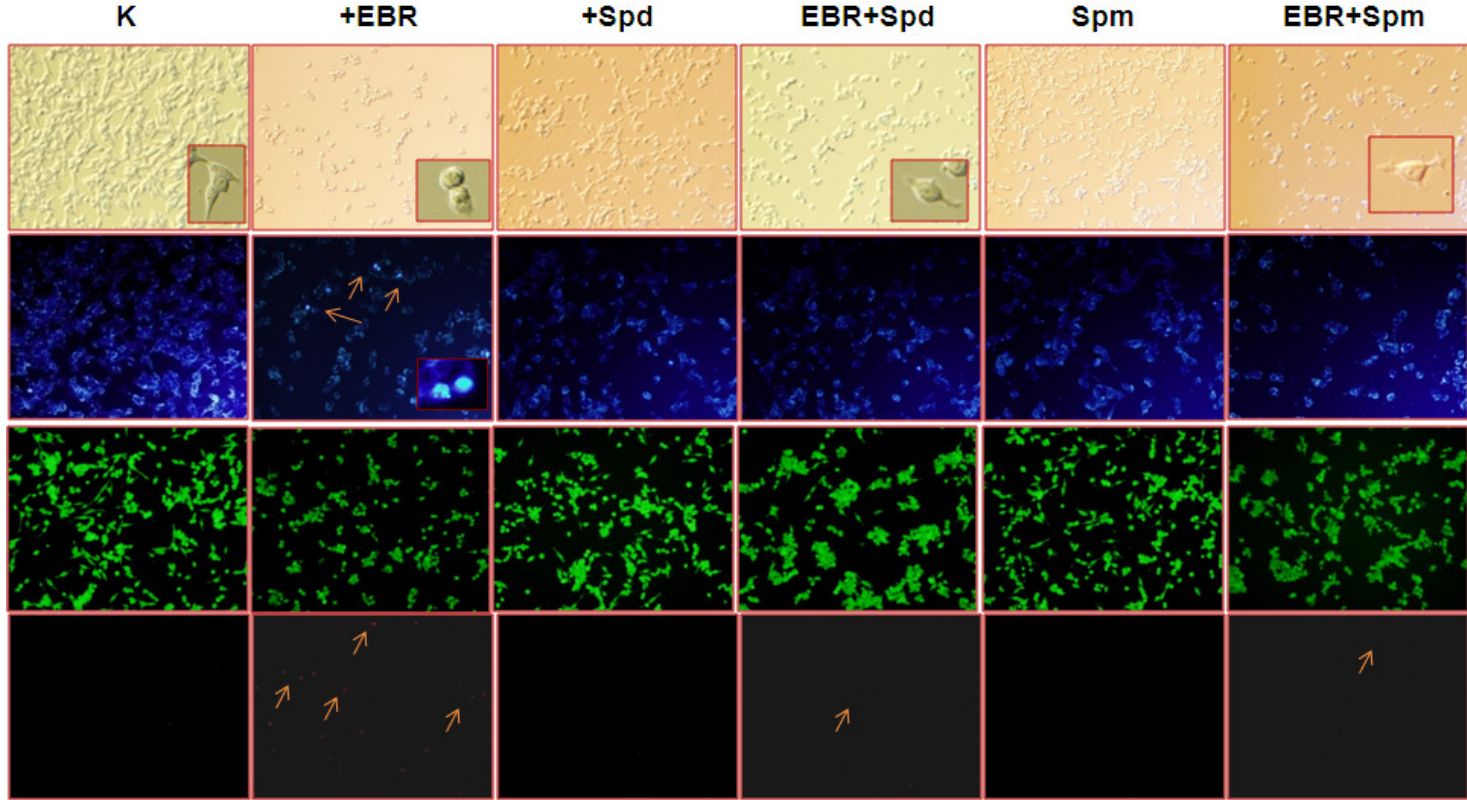
4.11. SPERMİDİN VE SPERMINİN, EBR İLE TETİKLENEN APOPTOTİK ÖLÜMDEKİ ROLLERİ

PA'ların EBR ile tetiklenen hücre ölümünde rollerinin ortaya konulabilmesi için, araştırmanın bu aşamasında hücrelere dışarıdan 10 μ M Spd ve 10 μ M Spm uygulaması EBR ile eş zamanlı olarak yapılmıştır. Bu uygulama sırasında aynı zamanda hücre içindeki serum oksidazların ortamdaki Spd ve Spm'yi oksitleyerek hücre dışına atılımlarının engellenmesi için 1mM aminoguanidin de eş zamanlı olarak hücrelere uygulanmıştır. Öncelikle Spd ve Spm uygulamasının EBR ile eş zamanlı uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi MTT testi ile incelenmiştir. Şekil 4.37' de gösterildiği gibi, 10 μ M Spd veya 10 μ M Spm ile birlikte 25 μ M EBR eş zamanlı uygulaması LNCaP hücrelerinde, sadece 25 μ M EBR uygulamasına oranla hücre canlılığının azalmasını engellemiştir. Buna karşılık DU145 hücrelerinde bu etki görülememiş, hatta EBR ile birlikte 24 saat Spd ve Spm uygulamaları hücrelerde toksik etki meydana getirmiştir (Şekil 4.38).

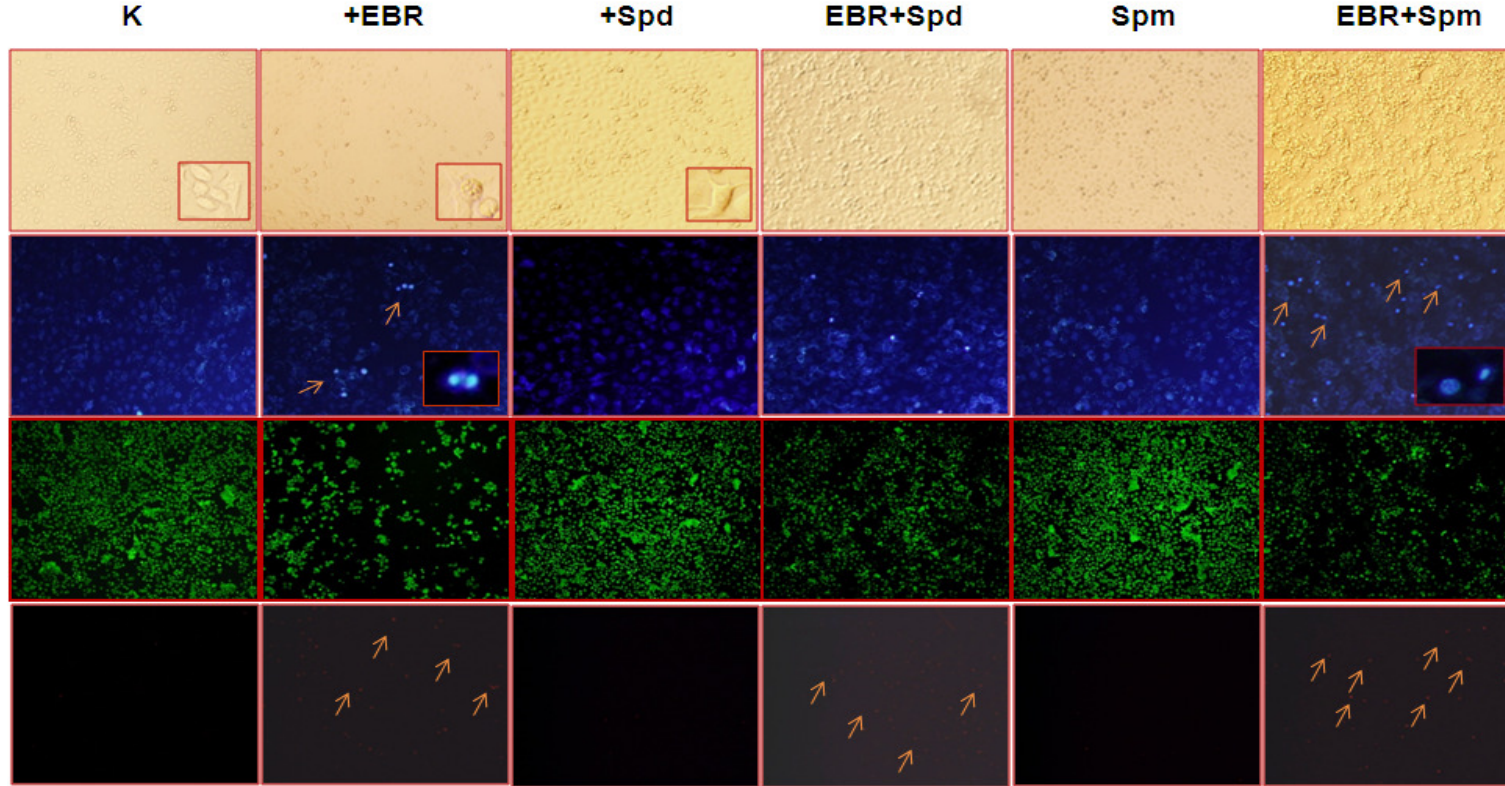


Şekil 4. 38. Spd veya Spm ile EBR'nin eş zamanlı uygulamasının LNCaP ve DU145 hücre canlılığının kaybına etkisi. ** p< 0,01, ## p< 0,01.

Spd veya Spm ile eş zamanlı EBR uygulaması sonucunda meydana gelen hücre canlılığındaki değişimlerin apoptotik hücre ölümü sonucu olup olmadığı DNA kırıklarını gösteren DAPI boyama, mitokondri membran potansiyelini gösteren DiOC6 boyama ve hücre ölümünü gösteren propidyum iyodür (PI) boyama ile belirlenmiştir. Her üç apoptotik belirteç de, LNCaP hücrelerinde, Spd veya Spm ile EBR eşzamanlı uygulamasının, EBR'nin neden olduğu apoptotik hücre ölümünü engellediğini göstermektedir (Şekil 4.39), buna karşılık DU145 hücrelerinde bu etkiye rastlanılmamıştır (Şekil 4.40).

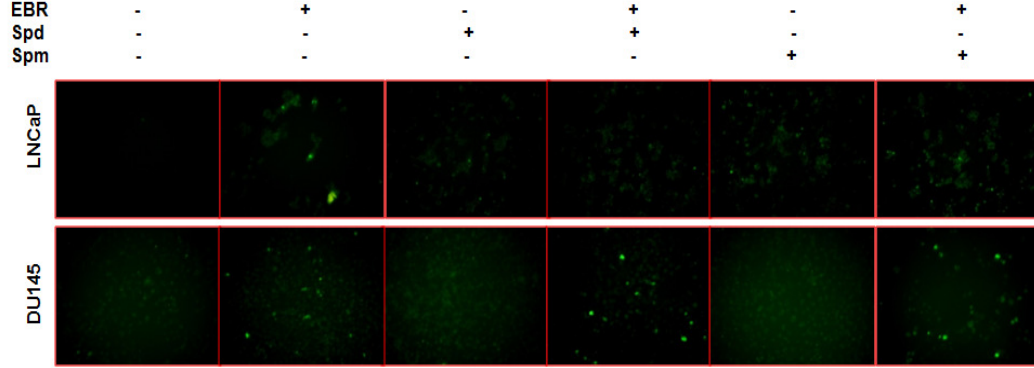


Şekil 4. 39. LNCaP hücrelerinde Spd veya Spm ile EBR eş zamanlı uygulamasının DNA kırıkları oluşumuna, mitokondri membran potansiyeli kabına ve hücre ölümüne etkileri. K: Kontrol.



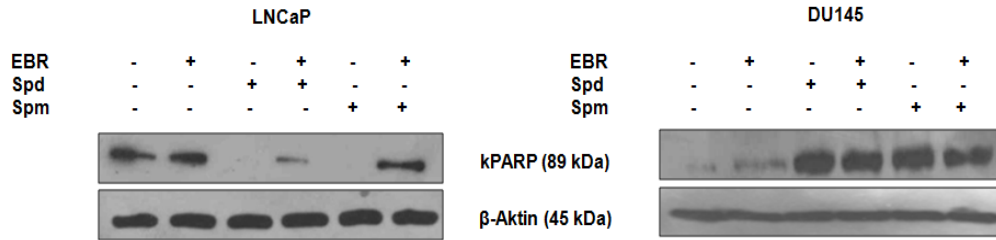
Şekil 4. 40. LNCaP ve DU145 hücrelerinde Spd veya Spm ile EBR eş zamanlı uygulamasının DNA kırıkları oluşumuna, mitokondri membran potansiyeli kaybına ve hücre ölümüne etkileri. K: Kontrol..

Aynı zamanda, LNCaP hücrelerinde, Spd veya Spm ile eş zamanlı EBR uygulaması, sadece EBR uygulaması sonucu floresan mikroskobunda DCFH-DA boyama ile tespit edilen artmış reaktif oksijen türlerinin oluşmasını da engellemiştir (Şekil 4.41).



Şekil 4. 41. Spd veya Spm ile EBR eş zamanlı uygulamasının EBR ile tetiklenen ROS üretimine etkisi.

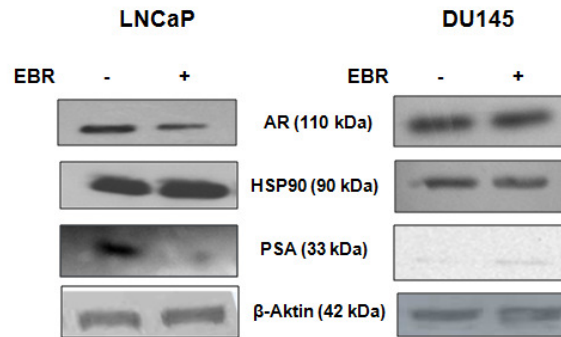
Bu bulgular aynı zamanda PARP proteini kesimi ile gösterilmiştir. Şekil 4.42’ de gösterildiği gibi LNCaP hücrelerinde EBR’nin apoptotik etkisi Spd veya Spm ile ortadan kalkarken, DU145 hücrelerinde EBR’nin neden olduğu etkiyi artırmıştır. LNCaP hücrelerinde Spd veya Spm ile EBR eş zamanlı uygulaması, apoptotik hücre ölümünü sadece EBR uygulamasına oranla azaltmıştır.



Şekil 4. 42. LNCaP ve DU145 hücrelerinde Spd veya Spm ile EBR eşzamanlı uygulamasının PARP kesilimine etkileri. β-aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.

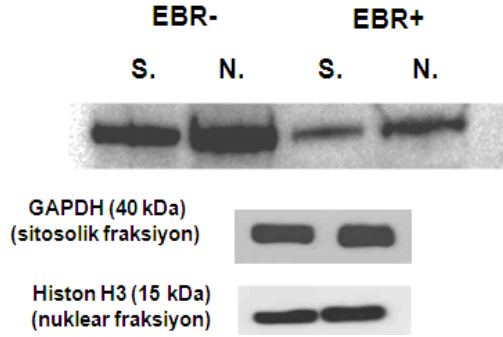
4.12. ANDROJEN RESEPTÖRÜNÜN EBR İLE TETİKLENEN APOPTOTİK ÖLÜMDEKİ ROLLERİ

Bu çalışmada elde edilen verilere göre, EBR androjen reseptörü anlatımı gerçekleştiren LNCaP hücre hattında AR negatif hücre hattı olan DU145'e göre apoptotik hücre ölümünü tetiklemeye daha etkilidir. LNCaP hücre hattında 24 saat 25 μ M EBR uygulamasının ardından öncelikle total AR protein ifadesi immunoblotlama yöntemi ile incelenmiştir. LNCaP hücrelerinde EBR uygulaması AR ifade düzeyini azaltırken, DU145 hücrelerinde inaktif halde bulunan AR düzeyi değişmemiştir (Şekil 4.43). AR, normal şartlar altında prostat hücrelerinde büyüme sinyali olmadığı, ısı şok proteini HSP90 ile bağlı halde bulunmaktadır. LNCaP ve DU145 hücrelerinde EBR uygulaması sonrası HSP90 protein ifadesi immunoblotlama yöntemi ile gösterilmiştir. Her iki hücre hattında da EBR uygulamasının HSP90 protein ifadesine etki etmediği saptanmıştır (Şekil 4.43). EBR uygulaması sonrası, LNCaP hücrelerinde, aynı zamanda AR'nin hedef genlerinden biri olan PSA anlatımının da değişimi araştırılmıştır. EBR uygulaması ile birlikte, AR anlatımının azalmasına paralel olarak, PSA ifadesi de LNCaP hücrelerinde azalmıştır (Şekil 4.43).



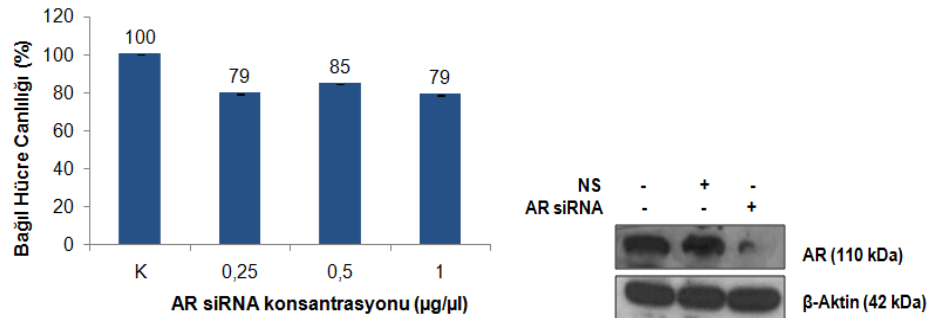
Şekil 4. 43. LNCaP ve DU145 hücrelerinde EBR uygulamasının androjen reseptörü (AR), Isı Şok Proteini 90 (HSP90), Prostata Özgü Antijen (PSA) anlatımlarına etkileri. β -aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır.

Şekil 4.44’ te görüldüğü gibi, EBR uygulaması LNCaP hücrelerinde azalan total AR ifadesi aynı zamanda sitoplazmadan nukleusa göçen AR miktarını da azaltmıştır (Şekil 4.44).



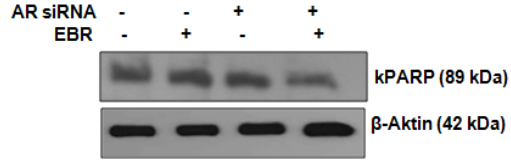
Şekil 4. 44. LNCaP hücre hattında AR protein ifadesi ve nukleustan sitoplazmaya göçünün EBR uygulaması sonrası azalması. GAPDH ve histon H3 yükleme standartları olarak kullanılmıştır. S: Sitoplazma, N:Nukleus.

AR’nin EBR ile tetiklenen apoptozdaki işlevinin anlaşılabilmesi için spesifik siRNA ile susturulması bir sonraki aşamayı oluşturmaktadır. Bu nedenle öncelikle farklı AR siRNA dozları (0,25 µg/µl -1 µg/µl) 1:1 oranında lipozom türevli transfeksiyon ajanı ile karıştırılarak hücrelere transfeksiyonu gerçekleştirilmiş ve hücre canlılığına etkisi MTT testi ile belirlenmiştir. Şekil 4.45’te gösterildiği üzere 0,5 µg/µl ARsiRNA en az toksisite oluşturan doz olarak seçilmiştir. Bu dozun AR’yi susturma potansiyeli immunoblotlama yöntemi ile gösterilmiştir. 24 saat süre ile uygulanan 0,5 µg/µl AR siRNA, LNCaP hücrelerinde AR’nin anlatımına ket vurmuştur (Şekil 4.45).



Şekil 4. 45. Androjen reseptörüne özgü siRNA dozunun hücre canlılığına etkisi ve immunoblotlama yöntemi ile belirlenmesi. β-aktin yükleme standardı olarak kullanılmıştır. NS: Negatif siRNA, AR siRNA: Androjen Reseptörüne özgü siRNA.

0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ARsiRNA uygulanan örneklerde EBR uygulaması, sadece EBR uygulanan örneklerle oranla gerilemiştir. Kesilmiş PARP ifadesi ise bu örneklerde azalmıştır (Şekil 4.46).



Şekil 4. 46. AR'nin, EBR ile tetiklenen apoptotik ölümdaki rolü. AR siRNA: Androjen Reseptörüne özgü siRNA.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tüm dünyada, PKa 50 yaş üstü erkeklerde en sık görülen kanser türlerinden birisi olup, metastatik vakalarda yüksek mortalite oranlarına sahiptir. Klinikte PKa tanısı için kullanılan PSA, prostat spesifik membran antijeni (PSMA) ve kalikrein gen ailesinin saptanması yetersiz kalmakta, BPH durumlarında da pozitif vermelerinden dolayı yeterli olmamaktadır [336]. Özellikle metastatik vakalarda androjenlerden bağımsız PKa gelişimi, anti-androjenlere duyarsızlığı ortaya koymakta ve hastalığın daha agresif bir forma dönüşerek tedaviye yanıt vermemesi ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle PKa tedavisine yönelik olarak, yeni terapötik hedeflerin ortaya konması ve etkileşimde oldukları moleküler yolların aydınlatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Son yıllarda kanser hücrelerinde, normal dokulara göre artan metabolizmaları ile dikkat çeken PA'ların terapötik bir hedef olabilecekleri üzerinde durulmaktadır [337]. Ökaryotik canlılarda yaygın olarak bulunan bu alifatik katyon ailesi üyeleri (Put, Spd ve Spm) hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşması gibi önemli hücresel olaylarda ol almaktadırlar [338]. Kanserli dokuların sağlıklı dokulara oranla daha fazla miktarda PA içerdikleri, aynı zamanda PA metabolizma enzimi olan ODC'nin de fazla anlatımını gerçekleştirdikleri birçok çalışma ile ortaya konulmuştur [121, 205]. Bu nedenle PA biyosentezi inhibitörü DFMO çeşitli kanser türlerinde *in vitro* ortamlarda denenmiş ve umut vaat eden sonuçlar alınmıştır [339]. Bununla birlikte *in vivo* denemelerde yüksek toksisite problemleri ile karşılaşmış ve sadece çocukluk çağı kanserlerinde etkisi çeşitli faz denemelerinden geçebilmiştir [340].

PA'lar, insan vücudunda en fazla prostat dokusunda sentez edilmektedirler [14]. Prostat bezi ve PA metabolizması arasındaki ilişki birçok çalışma ile desteklenmiştir. Kanserli hastaların idrar örneklerinde sağlıklı kişilere göre daha yüksek konsantrasyonlarda serbest ve asetile PA'lar saptanmış [341], bu hastaların eritrositler PA düzeyleri ile PKa

arasında da bir korelasyon olduğu gösterilmiştir [342]. Bu nedenle PKa tanısı konan hastalara PA bakımından zayıf diyetlerin uygulanmasının da yüksek PSA düzeylerinin indirgenmesinde etkili olduğu Cipolla ve diğ. [185] tarafından 2002 yılında gösterilmiştir. PKa durumunda PA biyosentezinin özellikle Put ve Spd seviyelerinde artışa neden olduğu Schipper ve diğ. [14] tarafından gösterilmiştir.

PA biyosentez inhibitörü DFMO'nun sınırlı bir kapasite ile sadece belirli kanser türlerine etki ettiğinin gösterilmesi [97, 343] ve aynı zamanda biyosentez yolağının kesilmesinin kanser hücrelerine dışardan PA alınımını etkilemediği, diyet ya da bakteriyel flora kökenli PA'ların kanser hücrelerine alınabildiği PA'lar ile ilgili yeni stratejilerin geliştirilmesini tetiklemiştir [344]. Son dönemde yapılan çalışmalar çeşitli ajanlarla PA katabolizmasının tetiklenmesi ve hücre içi PA seviyelerinin düşürülmesi yönündedir [345]. PA katabolizma enzimlerinin tetiklenmesiyle hücrede PA seviyelerinde düşüş meydana geldiği gibi, SSAT tarafından asetillenen PA'ların PAO ile oksidasyonları sırasında toksik maddelerin açığa çıkması da tetiklenmektedir [346]. Açığa çıkan H_2O_2 ve aldehitlerin kanser hücrelerinde apoptotik ölümü tetiklediğine dair birçok çalışma bulunmaktadır [347]. Son yıllarda aynı zamanda PA katabolik enzimlerinden SMO'nun H_2O_2 üretiminde önemli rol oynadığı da öne sürülmüştür [11].

PA katabolik enzimlerinin aktivasyonunu hedef alan ajanlar arasında DENSp_m gibi PA analogları gösterilmiştir. Hücrelere DENSp_m uygulanması sonucu PA homeostazının bozulmasıyla katabolik yolak enzimlerinden SSAT'nin arttığı gözlemlenmiştir [348]. SSAT'nin, DNA kırıkları meydana getiren platin türevli kemoterapötik ajanlardan oksaliplatin ve sisp_latin tarafından en fazla tetiklenen genlerden biri olduğu tespit edilmiştir [7]. Babbar ve Gerner [170] sulindak sülfonun kolon kanser hücresi olan Caco-2 hücre hattında SSAT aktivitesinin 4 kat artırdığını tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucu SSAT'nin kolon kanserinde kemoterapötik ajanlara karşı verilen cevap mekanizmasında önemli bir biyobelirteç olduğu gösterilmiştir [349]. Bununla birlikte PA katabolizmasını tetikleyen ajanlar yüksek yan etkilere sahip ve PKa'ya spesifik ajanları oluşturmamaktadırlar. Bu kapsamda özellikle androjen bağımlı ve bağımsız hücreleri içeren heterojen tümörler için PA'ları da hedef alarak hücreleri

apoptotik ölüme götürecektir aynı zamanda normal dokulara zarar vermeyen ajanların keşfine ve moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

EBR, bir bitki büyüme maddesi olan brassinosteroidlerin bir üyesi olup, bitkilerde büyümeyi teşvik etmektedir. EBR omurgalıların bulunan ve büyümeyi teşvik eden steroid hormonlara benzerlik gösteren doğal bir polihidroksi steroiddir. Bitkilerde büyüme üzerine olan etkisi birçok çalışmada gösterilmekle beraber memeli hücreleri üzerine etkisi son yıllarda ele alınmaya başlanmıştır. İlk olarak 2008 yılında Malikova ve diğ. [15] çeşitli kanser hücre hatlarında EBR'nin hücre canlılığına olan etkisini incelemiş, 2010 yılında Steigerova ve diğ. [21] ise EBR'nin meme kanseri hücrelerinde çoğalmayı önleyici etkisini ve hücre döngüsüne etki ederek apoptoz mekanizmasını başlattığını öne sürmüşlerdir. Bununla birlikte EBR'nin hedef aldığı moleküler mekanizmalar aydınlatılamamıştır.

Bu araştırma kapsamında amaç EBR'nin PKa hücrelerinde potansiyel apoptotik etkisinin PA katabolizması ile ilişkili olarak aydınlatılmasıdır. Bu kapsamda AR (+) LNCaP ve AR (-) DU145 PKa hücre hatları ile çalışılmıştır. EBR, her iki hücre hattında da doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını tetiklemektedir. Bununla birlikte bu etki LNCaP hücrelerinde daha belirgin olarak öne çıkmaktadır. DU145 hücre hattında % 25 hücre canlılığı kaybını sağlayan 25 μ M EBR dozu daha sonraki deneyler için de seçilmiştir. Seçilen bu doz 24 saat EBR uygulaması sonrasında LNCaP hücrelerinde yaklaşık % 30 hücre canlılığı kaybını işaret etmektedir.

EBR aynı zamanda LNCaP ve DU145 hücre hatlarında hücre sağ kalımına da etki etmiştir. LNCaP hücrelerine 48 saat EBR uygulaması hücrelerde sitotoksik etki yaratırken, 96 saatin sonuna kadar da sitostatik etki yaparak çoğalmalarına ket vurmuştur. Bununla birlikte DU145 hücreleri, 72 saate kadar olan EBR uygulaması ile normal hücrelere oranla daha da az olmakla birlikte çoğalmaya devam etmiş, 72-96 saat arasında ise EBR'nin neden olduğu sitotoksik etki ile ölmeye başlamışlardır. Bu sonuçtan yola çıkarak EBR'nin AR (+) LNCaP hücrelerinde, DU145 hücrelerine oranla canlılık ve sağkalıma daha çok ket vurduğu sonucu çıkarılabilir. EBR'nin hormon

reseptörü anlatımı yapan hücre hatlarında hücre canlılığına ket vurmada daha etkili olduğu Malikova ve diğ. [15] tarafından elde edilen bulgular ile de desteklenmektedir. Yapılan bu çalışmada EBR ve homokastasteronun ER anlatımı yapan MCF-7 hücre hattında daha etkili olduğu bulgularına yer verilmektedir. EBR dışında, brassinosteroid kökenli homokastasteronun da hormon reseptörü anlatımı yapan hücrelerde daha etkili olduğu yine Malikova ve diğ. [15] tarafından aynı çalışmada ele alınmıştır. Bunun yanı sıra, diketosteroid gibi steroid türevli ajanların AR anlatımı yapan PKa'da daha etkili olduğu bilinmektedir [350].

EBR ile tetiklenen hücre canlılığı kaybının apoptotik ölümden kaynaklanıp kaynaklanmadığını anlayabilmek için apoptotik belirteçler araştırılmıştır. Öncelikle hücreler 48 saat süre ile ışık mikroskopunda incelenmiş ve her iki hücre hattında da hücre membran yapısındaki bozulmalar tespit edilmiştir. Bu morfolojik verilerden yola çıkarak, öncelikle DU145 hücre hattında $\Delta\psi_m$ 'ndeki doza bağlı kayıp hem floresan hem de fluorometrik yöntemle tespit edilmiş ve EBR'nin mitokondriyal yolak üzerinden apoptozu tetikleyebileceği sonucuna ulaşılmıştır. 25 μ M EBR'nin hücre ölümü ve $\Delta\psi_m$ kaybına etkisi her iki hücre hattında karşılaştırılmış ve EBR'nin her iki hücre hattında da $\Delta\psi_m$ kaybına neden olarak hücre ölümünü tetiklediği, fakat LNCaP hücrelerinin EBR'ye daha duyarlı olduğu ortaya konulmuştur. Bir başka apoptoz biyobelirteci olan DNA kırıklarının oluşumu da her iki hücre hattında incelenmiştir. 24 saat EBR uygulaması DU145 hücrelerine oranla, LNCaP hücrelerinde daha fazla olmak üzere her iki hücre hattında da DNA kırıklarının oluşumuna yol açmıştır. EBR'nin yol açtığı apoptotik ölüm aynı zamanda akım sitometrisinde anneksin V-PI boyama ile de incelenmiştir. EBR'nin her iki hücre hattında da erken ve geç evre apoptotik populasyonların yüzdesinin artırdığı fakat bu etkinin LNCaP hücrelerinde daha belirgin olduğu sonucuna varılmıştır. EBR'nin meme kanseri hücrelerinde apoptozu tetikleyici etkisi gösterilmekle beraber, ER anlatımı bulunan MCF-7 hücrelerinde daha etkili olduğu Steigerova ve diğ. [21] tarafından da ileri sürülmüştür. EBR'nin yanı sıra brassinosteroid türevlerinden homokastasteronda aynı şekilde MCF-7 hücrelerinde apoptozu tetiklemede etkili olmuştur. Benzer şekilde, bu çalışmada da PKa hücre

hatlarından AR (+) LNCaP hücre hattında EBR, apoptozu tetiklemekte daha etkili bulunmuştur.

Çalışmanın daha sonraki aşamasında, EBR'nin LNCaP ve DU145 hücre hatlarında hücre döngüsünü nasıl etkilediği PI boyama sonrası akım sitometrisinde incelenmiş ve her iki hücre hattında da G₁ fazındaki hücre popülasyonunun azaldığı tespit edilmiştir. EBR'nin hücre döngüsüne olan etkisi meme kanseri hücrelerinde de incelenmiş ve bu bulgulardan farklı olarak hücrelerin G₁ evresinde biriktiklerini göstermişlerdir [21]. EBR uygulaması aynı zamanda LNCaP hücre hattında subG₁ fazındaki hücre popülasyonunun artışı da tetiklemektedir. SubG₁ fazındaki hücreler DNA kırıkları bulunan hücre topluluğunu işaret etmesi nedeniyle apoptotik bir belirteç olarak bilinmektedirler [351]. PKa'ya karşı klinikte kullanılan docetaksel [352], doksorubisin [353] gibi kemoterapötik ajanların subG₁ popülasyonunu, yani DNA kırıklarını meydana getirdiği gösterilmiştir. EBR'de LNCaP hücre hattında 24 saat sonunda % 50 oranında subG₁ popülasyonuna sahipken, DU145 hücre hattında bu oran % 13 civarındadır. SubG₁ fazındaki DU145 hücrelerindeki oran zamanla birlikte değişmemektedir. Buradan yola çıkarak, EBR'nin her iki hücre hattında da apoptozu tetiklediği fakat bu etkinin LNCaP hücrelerinde DU145 hücrelerine oranla daha belirgin olduğu belirlenmiştir.

24 saat EBR uygulamasının tetiklediği apoptozun mitokondriyal yolla ilişkisini anlamak için her iki hücre hattında da öncelikle $\Delta\psi_m$ kaybı fluorometrik olarak ölçülmüştür. $\Delta\psi_m$ kaybı LNCaP hücrelerinde daha fazla olmakla birlikte her iki hücre hattında da tespit edilmiştir. $\Delta\psi_m$ kaybı, genellikle mitokondri zarları arasında bulunan ve elektron transport zinciri üyesi olan sitokrom c'nin sitoplazmaya çıkışını tetiklemektedir [354]. Sitokrom c' nin sitoplazmaya çıkışı mitokondriyal yolağın aktive olduğunun işareti olarak gösterilmektedir. EBR, LNCaP hücrelerinin sitoplazmik fraksiyonlarında sitokrom c'yi, DU145 hücrelerine oranla belirgin bir şekilde artırmıştır. Sitokrom c'nin sitoplazmaya çıkışı kaspazların aktivasyonunu tetiklemektedir [355]. Bu nedenle EBR uygulaması sonrası proteolitik kesim ile aktive olan başlatıcı kaspaz 9 ve kaspazların hedefi olan PARP'ın kesilmiş hali ilk 12 saatte LNCaP ve DU145

hücrelerinde gözlemlenmektedir. 24 saat EBR uygulaması kaspaz-9'un aktivatörü olan Apaf-1 proteininin anlatımının her iki hücre hattında da artmasına neden olmuştur. Aynı zamanda kesilmiş kaspaz 9'un anlatımı da her iki hücre hattında 24 saat EBR uygulaması sonucu artmıştır. EBR uygulamasının tetiklemesi ile başlatıcı kaspaz-9 her iki hücre hattında farklı kaspazları aktive etmiştir. LNCaP hücrelerinde EBR, kesilmiş kaspaz-3'ün anlatımını artırırken, DU145 hücrelerinde kesilmiş kaspaz-7 ifadesinde artış saptanmıştır. EBR'nin PKa hücrelerinde kaspaz bağımlı apoptozu indüklemesi aynı zamanda kaspaz inhibitörleri kullanılarak da gösterilmiştir. Bu bulgulara benzer şekilde, bir bitkisel izoflavon olan genisteinin nuklear reseptör antagonisti gibi davranarak LNCaP hücrelerinde kaspaz-3 bağımlı apoptozu tetiklediği gösterilmiştir [356]. Aynı şekilde soyadan izole edilen izoflavonlar da PKa hücrelerinde kaspaz bağımlı apoptozu indüklemektedir [357].

EBR uygulamasının hücre siklusuna etki ettiği ve her iki hücre hattında da G₁ fazında bulunan hücrelerin yüzdesini azalttığını ve subG1 fazındaki hücrelerin yüzdesini artırdığını gösterdikten sonra, bu etkinin nedeni hücre döngüsünü düzenleyen proteinlerin anlatımlarının ifadelerindeki değişikliklerin araştırılmasını sağlamıştır. EBR uygulamasının ardından hücre döngüsünün devamlılığını sağlayan siklin D1 ve A protein ifadeleri her iki hücre hattında da azalmıştır. Siklin D1, G1 fazından hücrelerin geçişi için gerekli bir proteindir [358]. Aynı zamanda çeşitli kemoterapötik ajanların siklin D1 ifadesinde azalmaya neden olarak kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği bildirilmiştir [359, 360]. Siklin A ise hücre döngüsünde birden fazla basamağı kontrol eden bir proteindir [361]. CDK1 ile bağlanarak S fazından geçişi, CDK2 ile bağlanarak ise G₂/M geçişini sağlamaktadır [362, 363]. Siklin A'nın protein ifadesindeki azalma ise kanser hücrelerinde genellikle hücre döngüsü ve hücre çoğalmasının durması ile sonlanmaktadır [364]. EBR uygulaması sonrası siklin proteinlerinin ifadelerinin azalması, hücre çoğalmasının durması ile sonlanmaktadır. Hücre döngüsünün devamlılığı için gerekli diğer protein ailesi CDK'ların üyeleri CDK2 ve 4'ün, her iki hücre hattında da EBR uygulaması ile azalması EBR'nin hücre döngüsü bileşenleri üzerine etkisini göstermektedir. Aynı zamanda her iki hücre hattında da 24 saat EBR uygulaması sonucu, hücre içinde doğal CDK inhibitörü olan p21'in anlatımını da

indirgenmiş olması, EBR'nin hücre döngüsüne etki ettiğinin bir diğer göstergesidir. p21 siklin-CDK1 veya 2 kompleksinin aktivitesini inhibe ederek, hücre döngüsünün G₁ evresini düzenleyen bir proteindir [365]. p21 indirgenmesi meme, karaciğer kanseri gibi pekçok kanserde apoptozu tetikleyici bir faktör olarak ileri sürülmüştür [366].

Siklin ve CDK'ların EBR uygulaması sonucu değişimleri benzer bir şekilde Steigerova ve diğ. [21] tarafından MCF-7 meme kanseri hücrelerinde de gösterilmiştir. EBR uygulaması bu hücrelerde de siklin D1, CDK2 ve 4 anlatımlarında azalmaya neden olmuştur. Bu araştırma kapsamında EBR'nin LNCaP ve DU145 hücrelerinde p21 anlatımını artırması bulgusuna benzer şekilde, Steigerova ve diğ. [21] yine MCF-7 hücreleri üzerinde EBR'nin aynı etkisini tespit etmişlerdir. p21 proteininin anlatımını düzenleyen ve mutant olması durumu birçok kanser türünü tetikleyen p53 proteininin, EBR ile tetiklenen apoptozdaki rolünü ortaya koymak bu araştırmanın bir sonraki aşamasını oluşturmuştur. p53 proteini hücre döngüsünün negaitf düzenleyicisidir ve kanser türlerinin yaklaşık %30'unda inaktif haldedir. DNA hasarı, stres ve onkogenler tarafından tetiklenen p53 anlatımı, hücrelerin S fazına girişini inhibe etmekte ve apoptozu indüklemektedir [367]. LNCaP ve DU145 hücreleri p53 aktivitesi bakımından farklıdır. LNCaP hücre hattı yabani tipte ve fonksiyonel p53 içerirken, DU145 hücre hattındaki p53 proteini mutant olup, anlatımı bulunmasına rağmen işlevsel değildir [368]. Bu noktadan yola çıkarak, öncelikle her iki hücre hattında da EBR uygulaması ile beraber p53 ve sitoplazmadaki regülatörü Mdm2'nin anlatımları araştırılmış ve beklenildiği gibi her iki proteinin anlatımının LNCaP hücrelerinde ters yönlerde değişirken, yani p53 anlatımında artış, Mdm2 anlatımında azalma tespit edilirken, DU145 hücre hattında bu proteinlerde değişme gözlemlenmemiştir. Bunun yanı sıra p53'ün EBR ile tetiklenen apoptozda fonksiyonelliği ise p53 ve Mdm2 inhibitörleri ile eş zamanlı EBR uygulamasının ardından PARP kesilimindeki değişimler ile ortaya konulmuştur. Aynı zamanda p53 inhibitörü pifithrin α LNCaP hücrelerinde EBR ile tetiklenen DNA kırıkları oluşumunu azaltırken, Mdm2 inhibitörü Nutlin-3, aynı hücre hattında DNA kırıklarını artırmaktadır. Bu sonuçlar LNCaP hücre hattında EBR'nin p53-bağımlı olarak apoptozu tetiklediğini göstermektedir. Benzer şekilde Steigerova ve diğ. [21], MCF-7 ve MDA-MB-468 hücrelerinde EBR ve homokastasteronun p53

anlatımı üzerine olan etkisini araştırmışlardır. Bulgularına göre p53 anlatımı ER pozitif olan MCF-7 hücrelerinde 24 saat içerisinde artarken, ER negatif MDA-MB-468 hücrelerinde p53 anlatımında değişikliğe rastlanılmamıştır. Homokastasteron ise her iki hücre hattında da p53 anlatımına etki etmemiştir. Daha önceki çalışmalar steroid reseptörlerinden ER- α 'nın p53 yolu ile olan apoptozu baskıladığını göstermiştir [369]. Bu sonuçlardan yola çıkarak, EBR'nin AR anlatımı bulunan LNCaP hücrelerinde p53 anlatımını artırarak hücreleri apoptotik ölüme götürebileceği belirlenmiştir. Bununla birlikte AR ve p53 anlatımı bulunmayan DU145 hücreleri bu özelliklerinden dolayı EBR'ye karşı dirençlidir sonucuna varılabilir.

PA'lar prostat dokusunda fazla miktarda sentezlenen amin gruplarıdır. PA'ların DNA, RNA ve proteinlerin kararlılıklarında ve hücre çoğalmasında önemli rolleri bulunmaktadır [370], bunun yanı sıra, aşırı sentezleri hücre çoğalmasının artmasına ve kanser gelişimine neden olmaktadır [371]. Kanser tedavisi için geliştirilen ve hücre içi PA'ları hedef alan ilaçların geliştirilmeye çalışılması çok eski yıllardan bu yana hedef olmuştur [372, 373]. Bu verilerden yola çıkılarak, bu araştırma kapsamında LNCaP ve DU145 hücre hatlarında EBR uygulaması ile hücre içi PA havuzunun ve PA sentezinde görevli proteinlerin nasıl etkilendiği araştırılmıştır. EBR, LNCaP hücre hattında Put ve Spd seviyelerini indirirken, DU145 hücre hattında özellikle Put seviyesinde azalma tespit edilmiştir. PA seviyelerindeki değişimler hücrelerde farklı cevaplara yol açmaktadır. PA seviyelerindeki azalma kanser hücrelerinde hücre çoğalmasını inhibe ederek hücre ölümünü tetikleyebildiği gibi, PA seviyelerinin artması da aynı şekilde hücrelerde toksik etki yaratabilmektedir [374, 375]. Sisplatin, doksorubisin gibi iyi bilinen kemoterapötik ilaçların hücresel PA seviyelerini azalttığı bilinmektedir [7, 349]. Hücre içi PA seviyesindeki azalmanın nedenini anlayabilmek için, PKa hücre hatlarında PA biyosentez enzimi ODC ve onun düzenleyicileri olan OAZ ve AZI anlatımları incelenmiştir. EBR uygulaması LNCaP hücre hattında ODC anlatımını indirirken, DU145 hücre hattında bu indirgenme daha azdır; bu sonuç, EBR'nin hücrelerde ODC'yi hedef alarak PA seviyelerini azalttığını ortaya koymaktadır. LNCaP hücre hattında, EBR uygulaması sonrası OAZ ve AZI anlatımları da değişmiştir, OAZ anlatımı artarken AZI anlatımı azalmıştır. Aynı ifade değişim profilleri DU145 hücreleri için geçerli olmamıştır. OAZ ve AZI, ODC aktivitesini düzenleyebildikleri gibi aynı

zamanda hücre içine PA alımından da sorumlu enzimlerdir. OAZ'ın hücre içinde artışı PA seviyelerinin artışı ile paralellik göstermektedir [376]. Bu sonuçlardan yola çıkarak EBR'nin LNCaP hücrelerinde hem ODC'yi baskılayarak, hem de hücre içine PA alınmasına ket vurarak hücrel PA'ları azalttığı sonucu çıkmaktadır. DU145 hücrelerinde ise, ODC anlatımının düşmesi Put seviyelerinin azalmasını indüklemiştir. Fakat diğer PA seviyelerinin anlamlı bir şekilde etkilenmemesinin nedeni olarak OAZ ve AZI'nın EBR uygulaması sonrası, LNCaP hücreleriyle benzer şekilde anlatım değişikliklerinin gözlemlenmemesi olarak yorumlanabilir. OAZ ve AZ arasındaki dengenin neoplastik transformasyon sırasında bozulduğu, OAZ:AZI oranının düştüğü durumlarda hücre çoğalmasının negatif yönde etkilendiği gösterilmiştir [377]. Aynı zamanda PC3M-LN4 (insan) ve AT6.1 (rat) PKa hücre hatlarında OAZ ve AZI üzerine yapılan çalışmalar prostat tümörü üzerine fonksiyonel olduklarını da ortaya konmaktadır [378].

PA seviyelerinin azalmasının nedeni PA katabolik enzimlerinin artması olarak da bilinmektedir [379]. EBR uygulaması LNCaP hücrelerinde SSAT, PAO ve SMO anlatımlarında artışa neden olurken, DU145 hücrelerinde sadece SSAT ve PAO anlatımları artmıştır. Fakat EBR'nin bu etkisi LNCaP hücrelerinde daha belirgindir. SSAT mRNA'sı 24 saat EBR uygulaması sonrası LNCaP hücrelerinde, kontrol hücrelerine oranla yaklaşık 6 kat artmaktadır. SSAT ve PAO mRNA seviyelerinin zamana bağlı olarak arttığı gösterilmiş, bu artışın PAO mRNA'sı için her iki hücre hattında da daha fazla olduğu belirlenmiştir. Kemoterapötik ajanlarla SSAT'in indüklendiği kolon kanseri hücre hatlarında saptanmıştır [349]. PAO anlatımındaki artış ise daha önce Deveureux ve diğ. [179] tarafından akciğer tümör hücre hatlarında gözlemlenmiştir. PAO ve SMO gibi PA oksidazların katalizledikleri reaksiyonlar boyunca H_2O_2 ve aldehitler gibi toksik yan ürünlerin açığa çıktığı bilinmektedir [380]. Bu ajanlar hücre içinde ROS oluşumunu ve apoptozu tetiklemektedirler. CDK inhibitörleri gibi kemoterapötik ilaçların CaCo-2 ve HCT1116 kolon kanseri hücre hatlarında SSAT ve PAO'yu indükleyerek ROS oluşumunu uyardıkları bilinmektedir [381, 382]. EBR uygulaması ile eş zamanlı olarak PAO ve SMO inhibitörü MDL 72,527 hücrelere uygulandığında, EBR ile tetiklenen ROS oluşumu indirgenmiştir. Bu

sonuç PA katabolizmasının EBR ile tetiklendiğini ve EBR ile tetiklenen ROS oluşumunun PA katabolizması aracılı olduğunu göstermektedir. Özellikle LNCaP hücrelerinde, EBR ile birlikte H_2O_2 tutucu NAC uygulanması, EBR ile tetiklenen hücre canlılığı kaybını azaltmaktadır. Yine LNCaP hücrelerinde daha belirgin olmak üzere, EBR ile NAC birleşimi, sadece EBR uygulanmış LNCaP hücrelerine göre $\Delta_{\psi m}$ kaybını azaltmaktadır. Bu sonuçlardan yola çıkarak, EBR'nin PA katabolizmasını hedef alarak ROS üretimine etki ettiği ve bu şekilde apoptozu indüklediği sonucuna varılabilir.

PA katabolizmasının EBR ile tetiklenen apoptozda fonksiyonel olup olmadığı öncelikle PAO ve SMO enzimlerinin ortak inhibitörü olan MDL 72,527 varlığında incelenmiştir. MDL 72,527 varlığında, EBR'nin neden olduğu hücre canlılığı kaybı ve apoptoz engellenmiştir. Çeşitli kanser hücre hatlarında farklı apoptotik ajanların PA katabolizmasına etkisi incelenmiş ve MDL 72,527'nin bu etkiyi nasıl değiştirdiği incelenmiştir. MDL 72,527'nin lösemi ve kolon kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilirken [383, 384], Casero ve diğ. [374], meme, kolon ve prostat tümörlerinde tümör çapının küçülmesini sağladığını da göstermişlerdir . Bu son bulguyla paralel olarak, MDL 72, 527 ile EBR eş zamanlı uygulaması LNCaP hücrelerinde apoptozun engellenmesini sağlamıştır.

PA katabolizması ile EBR uygulaması arasındaki ilişki daha sonraki aşamada sırasıyla SSAT ve PAO'ya özgü siRNA'lar kullanılarak ortaya konulmuştur. Öncelikle, 48 saat süre ile 100 nM SSAT veya PAO siRNA uygulamasının LNCaP ve DU145 hücrelerinde SSAT ve PAO anlatımını anlamlı bir şekilde susturduğu kantitatif eş zamanlı PCR ile gösterilmiştir. SSAT siRNA uygulamasını takiben EBR uygulaması, yalnızca EBR uygulanan LNCaP hücrelerinde hücre canlılığı kaybını azaltmıştır. Aynı zamanda SSAT siRNA uygulamasını takiben EBR uygulanan LNCaP hücrelerinde DNA kırıkları sadece EBR uygulanan örneklerle oranla yaklaşık % 50 kadar gerilemiştir. Bununla birlikte DU145 hücrelerinde aynı etkiye rastlanılmamıştır. Bu sonuçlardan yola çıkarak, SSAT'nin LNCaP hücrelerinde, EBR ile tetiklenen hücre ölümünde fonksiyonel bir rol oynadığı söylenebilir. SSAT'nin, kolon kanseri, glioblastoma ve melanoma gibi kanser türlerinde sikline bağımlı kinaz inhibitörleri, PA

analogları gibi kemoterapötiklerin kullanılması ile tetiklenen apoptozda rol oynadığına dair pekçok çalışma literatürde yer almaktadır [12, 382, 385].

Araştırmanın bir sonraki aşamasında bir diğer PA katabolizma enzimi PAO'nun anlatımı LNCaP hücrelerinde geçici olarak spesifik siRNA ile susturulmuş ve EBR'nin etkilerine bakılmıştır. PA oksidazlar aktif olduklarında hücrelerde son derece toksik etkiler meydana getirebilen H_2O_2 ve aldehitlerin yan ürün olarak meydana gelişini tetiklemektedirler. Bu maddelerin hücrelerde DNA hasarına, mutasyonlara ve hücre ölümüne neden oldukları bilinmektedir [386]. PAO siRNA ve EBR uygulaması, LNCaP hücrelerinde yalnızca EBR uygulaması ile tetiklenen DNA kırıkları oluşumunu engellemektedir. Aynı zamanda EBR ile tetiklenen ROS üretimi de, PAO enzimi geçici olarak susturulduğunda azalmaktadır. Bu sonuçlar PAO'nun EBR ile tetiklenen apoptoz ve ROS üretiminden sorumlu olduğunu göstermektedir. Bu bulgulara benzer şekilde PAO'nun *Helicobacter pylori* bakterisi ile enfekte olan makrofajlarda H_2O_2 üretimini artırarak mitokondri ve kaspaz bağımlı apoptozu tetiklediği gösterilmiştir [387]. PKa hücrelerinde ise PAO aktivitesinin spesifik inhibitörü MDL 72,527 ile inhibe edilmesinin ROS üretimine ket vurduğu ve hücre sağkalımını sağladığı gösterilmiştir [388].

Kanser hücrelerinde, PA metabolizmasının artması nedeni ile hücreler sürekli olarak bölünmeyi sürdürürler. Aynı zamanda PA'lar spesifik DNA bölgelerine (PA cevap elementleri) bağlanarak hücrelerde onkogenlerin anlatımını artırarak hücre çoğalmasını tetiklemektedirler [389]. EBR'nin PA'lar ile ilişkili olarak apoptozu nasıl tetiklediğinin açıklığa kavuşturulması için son olarak LNCaP ve DU145 hücrelerine EBR ile eş zamanlı olarak Spd veya Spm uygulaması yapılmıştır. EBR ve Spd eş zamanlı uygulaması, yalnızca EBR uygulamasına oranla LNCaP hücre canlılığındaki azalışı engellemektedir. Aynı zamanda EBR ile tetiklenen mitokondri bağımlı apoptozu ve ROS oluşumunu da engellemektedir. Bununla beraber aynı etki PARP kesilimi ile de gösterilmiştir. DU145 hücrelerinde ise EBR ile birlikte PA'ların uygulanması hücre canlılığı kaybının artmasına yol açmıştır, aynı zamanda mitotondriyal apoptozu, DNA kırıkları oluşumunu ve ROS oluşumunu da tetiklemektedir. PARP kesilimi de DU145

hücrelerinde her iki PA ve EBR kombinasyonu ile artmaktadır. Spd'nin hücre hatlarında apoptozu teşvik edici ya da ket vurucu farklı etkileri gözlemlenmekle beraber [390], bir otofaji tetikleyicisi olduğu bilinmektedir [391]. Spd ile beraber EBR uygulamasının LNCaP hücrelerinde sadece EBR uygulamasına oranla hücre canlılığındaki düşüşe ket vurmasının iki nedeninin olabilmesi söz konusudur. Bunlardan birincisi Spd'nin hücrelerde aynı zamanda bölünmeyi teşvik edici bir molekül olması [392], ikincisi ise otofajiyi tetikleyerek hücrenin apoptoza gitmesini yavaşlatarak ömrünü uzatan bir ajan olma potansiyelidir [391]. Otofaji her ne kadar fonksiyonelliğini yitirmiş proteinlerin, organellerin parçalanmasından sorumlu ve hücrel geridönüşümü sağlayan ve böylece hücrenin çeşitli stres koşullarında hayatta kalmasına yardımcı fizyolojik bir olay olarak tanımlansa da aynı zamanda hücreyi ölüme götüren bir olaydır [393]. Apoptoz ile otofaji arasındaki yakın bağlantı ve moleküler yollar aydınlatılmıştır. Bununla beraber aralarındaki ilişki apoptozun mümkün olmadığı durumlarda uyarının çeşidine, süresine bağlı olarak otofajik ölümü tetiklediği yönündedir [394]. Bu bilgilerden yola çıkarak Spd'nin EBR ile eş zamanlı uygulamasının hücrelerde nasıl bir moleküler cevaba yol açtığı da ileriki zamanlarda ele alınacak bir soru olarak ortaya çıkmaktadır. Spm ise, LNCaP ve DU145 hücre hatlarında EBR'nin apoptotik etkisini artıran bir ajan olarak belirlenmiştir. Spm'nin apoptozu tetikleyici etkisi birçok çalışma tarafından ortaya konulmuştur [395-398]. Özellikle serum oksidazları ile birlikte docetaksel gibi kemoterapötiklerin etkisini artırdığı gösterilmiştir [399, 400]. Bu bulgulara benzer şekilde Spm, LNCaP ve DU145 hücrelerinde EBR'nin apoptotik etkisini artırmıştır.

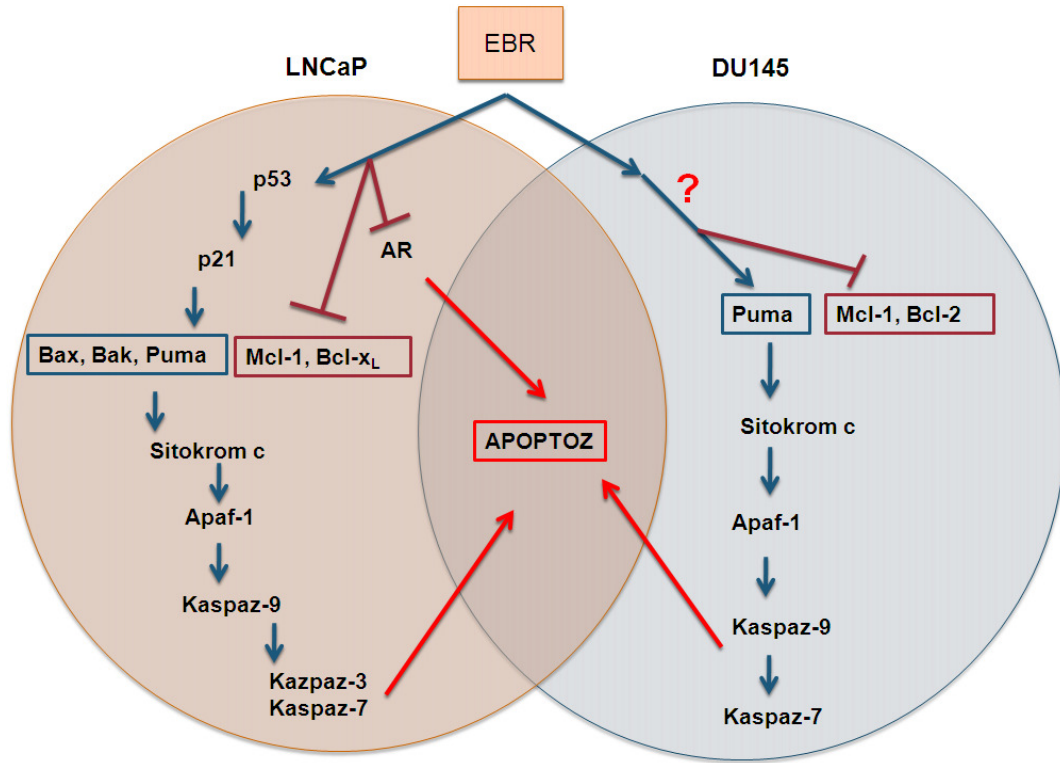
Araştırmanın son aşamasında ise, EBR'nin LNCaP hücrelerinde, DU145 hücrelerine oranla daha fazla etki göstermesinin PA metabolizması dışında olası nedenleri üzerinde durulmuştur. Her iki hücre hattı birbirinden AR yönünden farklı olduklarından dolayı öncelikle EBR'nin AR anlatımı üzerine etkisi incelenmiş ve EBR'nin özellikle LNCaP hücrelerinde AR anlatımını indirgediğini, bununla beraber fonksiyonel AR'ye sahip olmayan DU145 hücrelerinde ise AR anlatımında herhangi bir değişime rastlanmadığı gözlemlenmiştir. Steroid yapıda moleküllerin AR ile etkileşime girerek, AR'nin fonksiyonunu tetiklediği ya da inhibe ettiği bilinmektedir. Bunlara örnek olarak doğal androjenler, yani testosteron ya da DHT, AR fonksiyonunu tetikleyici moleküllere

örnek olarak verilebilir. AR fonksiyonunu inhibe edici steroid moleküllere örnek olarak da klinikte halen kullanılan anti-androjenler ya da progestinler örnek oluşturabilirler [401-403]. EBR, LNCaP hücrelerinde anlamlı bir şekilde AR anlatımını düşürdüğü gibi, buna bağlı olarak PSA anlatımına da ket vurmuştur. Bununla birlikte AR'nin hücre içindeki partneri HSP90 anlatımında herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır. AR sitoplazmada herhangi bir uyarıcı yokluğunda HSP40, HSP 70, BAG-1 gibi birçok şaperon ile bağlı olarak bulunmaktadır. Hücre AR'ye bağlı bir bölünme uyarısı aldığı anda bu proteinlerle etkileşimine son vererek nukleusa göçmektedir [404-406]. Gelecekte bu proteinlerin EBR uygulamasından nasıl etkilendiklerine de hem immunoblotlama hem de immunopresipitasyon yöntemleri ile bakılması planlanmaktadır. Böylelikle EBR'nin AR ile herhangi bir etkileşime girip girmediği daha iyi anlaşılmış olacaktır.

AR'nin EBR uygulaması sonucu LNCaP hücrelerindeki aktivitesi sitoplazmadan nukleusa göçü ile incelenmiştir. EBR ile azalan AR anlatımına bağlı olarak nukleusa göçen AR seviyesinde azalma tespit edilmiştir. Steroidal olan veya olmayan antiandrojenlerin AR'nin nukleusa göçünü engelleyerek hücre çoğalmasında görevli proteinlerin anlatımlarına dolaylı olarak ket vurdukları gösterilmiştir. Örnek olarak, son yıllarda PKa tedavisinde sıklıkla kullanılan antisteroidal bikalutamid veya steroidal siproteron asetat gibi ajanların, AR'nin göçünü engellediği gösterilmiştir [407, 408].

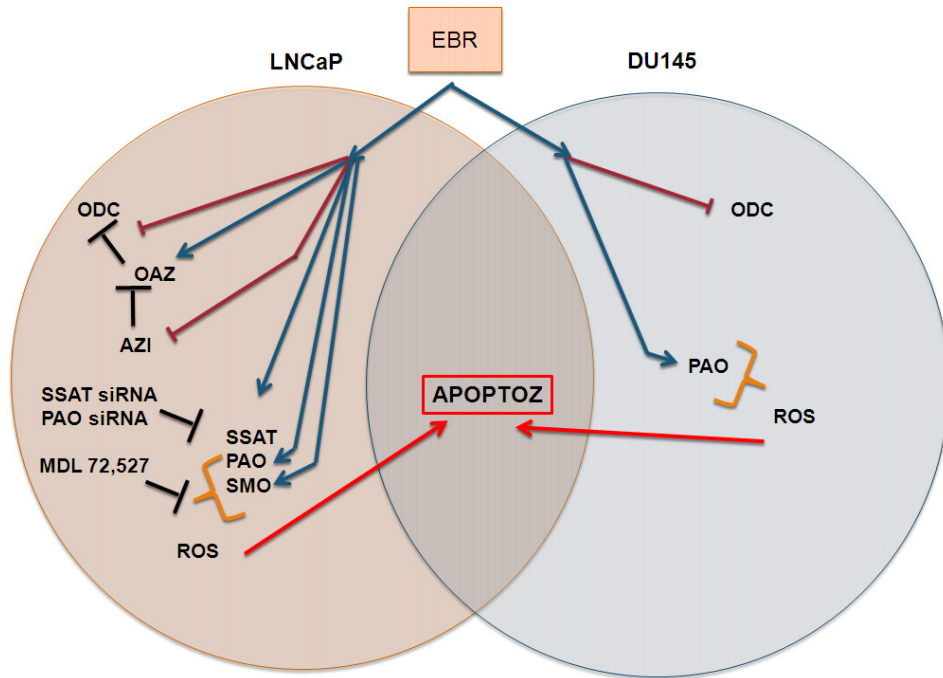
AR'nin LNCaP hücrelerinde EBR ile tetiklenen apoptozda rolünün anlaşılabilmesi için ise AR geçici olarak kendine özgü siRNA ile susturulmuştur. Bu aşamayı takiben EBR uygulaması, sadece EBR uygulanan LNCaP hücrelerine oranla PARP kesilimini engellemiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak, AR'nin EBR ile tetiklenen apoptozda fonksiyonel olduğu söylenebilir. Şu ana kadar EBR'nin AR ile etkileşimini gösteren ya da AR bağımlı olarak apoptozu tetiklediğini ortaya koyan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yönüyle bu araştırma EBR'nin apoptozu AR ile ilişkili olarak tetiklediğini göstermesi yönünden bir ilki taşımaktadır.

Sonuç olarak, bu araştırma kapsamında elde edilen bulgulara göre: EBR, AR (+) LNCaP ve AR (-) DU145 hücrelerinde apoptozu tetiklemekle beraber bu etkisinin LNCaP hücrelerinde daha belirgin olduğu görülmektedir. Literatürde ilk defa EBR ile tetiklenen mitokondri ve kaspaz bağımlı apoptoz PKa hücre hatlarında detaylı bir şekilde aydınlatılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre EBR uygulaması ile birlikte kaspaz-3 belirgin bir şekilde LNCaP hücrelerinde etkili olurken, kaspaz-7 ise DU145 hücrelerinde etkilidir. Buradan yola çıkarak EBR'nin farklı hücre hatlarında farklı kaspazları hedef aldığı sonucuna varılabilir. Aynı zamanda her iki hücre hattında da farklı Bcl-2 ailesi üyeleri EBR'ye karşı cevap oluşturmuştur. EBR aynı zamanda, LNCaP hücrelerinde daha etkili olmak üzere hücre döngüsünü kontrol eden siklinler, CDK'lar, p21 ve p53 gibi proteinlerin de anlatımına etki ederek hücre döngüsüne ket vurmaktadır. Özellikle p53, LNCaP hücrelerinde EBR ile tetiklenen apoptozda fonksiyoneldir (Şekil 5.1).



Şekil 5. 1. EBR'nin, LNCaP ve DU145 hücrelerindeki apoptotik etki mekanizması

Ayrıca, EBR'nin poliamin biyosentez ve katabolizması ile ilişkili olarak apoptozu tetiklediği literatürde ilk defa gösterilmiştir. LNCaP hücrelerinde yapılan SSAT ve PAO gen sessizleştirme metodları ve katabolik enzimlere özgü inhibitörler ile aktivite engellenmesi durumlarında, EBR ile tetiklenen hücre canlılığı kaybı, apoptoz ve ROS üretimindeki artışın gözlemlenmediği saptanmıştır. Bu sonuçlar EBR'nin LNCaP hücrelerinde poliamin metabolizması ile ilişkili olarak apoptotik cevabın oluştuğunu göstermektedir. Aynı zamanda dışarıdan PA uygulamalarının da EBR ile tetikleyen apoptozu farklı etkileyebileceği ortaya konulmuştur. AR anlatımı bakımından farklı olan hücre hatlarının, EBR ile tetiklenen apoptozun aydınlatılması için model olarak seçilmesinden faydalanarak, EBR ile tetiklenen apoptozda AR'nin önemi ortaya konmuştur (Şekil 5.2). Elde edilen tüm bu bilgiler, EBR ile ilgili mevcut literatürü doğruladığı gibi, aynı zamanda apoptotik mekanizmanın aydınlatılması ve poliaminlerle olan ilişkisi bakımından bir ilk niteliği taşımaktadır. Bununla birlikte bu araştırmaya gelecekte yapılacak çalışmalar için EBR'nin terapötik etkinliği hakkında daha fazla bilgi verme potansiyelindedir.



Şekil 5. 2. EBR'nin, LNCaP ve DU145 hücrelerinde poliamin metabolizması ile olan ilişkisi

Bu araştırmadan elde edilen bulgulardan yola çıkarak yeni hedefler belirlenmiştir. Kemoterapötik ajanların moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasında yeni global yaklaşım, tetikledikleri sinyal yolaklarında görevli potansiyel moleküllerin translasyonel analizlerinin gerçekleştirilmesi yönündedir. Bu yeni proteomik yaklaşım ile aynı zamanda posttranskripsiyonel modifikasyonlar da belirlenebilmekte ve ilacın fizyolojik etkilerinin anlaşılması için daha etkin bir adım atılmaktadır. Buradan yola çıkarak ileriki çalışmalarda proteomik yaklaşımları kullanarak EBR'nin neden olduğu proteomik farklılıklar ve moleküler düzeyde etki mekanizması farklı genomik özelliklere sahip PKa hücre hatlarında incelenecektir. Böylelikle EBR'nin hem poliamin katabolizması ile olan ilişkisinin, hem de AR varlığı etkisinin daha global bir yaklaşım ile de doğrulanması planlanmaktadır. Proteomik alışmalar ile EBR uygulaması sonucu meydana gelen tüm moleküler değişiklikler, özellikle hücre ölümünü tetikleyen diğer hücre ölüm mekanizmalarında (hücre membranı aracılı apoptoz, otofaji gibi) görevli proteinlerdeki değişikliklerin tam olarak aydınlatılması düşünölmektedir. Böylece yeni bir kemoterapötik ajan adayı olan bitkisel kökenli EBR'nin PKa hücrelerinde hangi moleküler mekanizmaları hedef aldığı ve terapide kullanılabilirliği ortağa çıkarılmış olacaktır. Bu verilerden yola çıkarak planlanan bir diğer yaklaşım ise, EBR'nin gelecekte olası ilaç tasarımında kullanılabilmesi için *in vivo* denemelerin yapılması yönündedir.

KAYNAKLAR

1. HEINLEIN, C.A. and CHANG, C., 2004, Androgen receptor in prostate cancer, *Endocrine Reviews*, 25 (2), 276-308.
2. BLUEMN, E.G. and NELSON, P.S., 2012, The androgen/androgen receptor axis in prostate cancer, *Current Opinion in Oncology*, 24(3), 251-257.
3. JEMAL, A., SIEGEL, R., WARD, E., HAO, Y., XU, J., THUN, M.J., 2009, Cancer statistics, 2009, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 59 (4), 225-249.
4. TABOR, C.W., TABOR, H., 1984, Polyamines, *Annual Review of Biochemistry*, 53, 749-790.
5. TABIB, A., BACHRACH, U., 1999, Role of polyamines in mediating malignant transformation and oncogene expression, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31 (11), 1289-1295.
6. PACKHAM, G. and CLEVELAND, J.L., 1994, Ornithine decarboxylase is a mediator of c-Myc-induced apoptosis, *Molecular and Cellular Biology*, 14 (9), 5741-5747.
7. HECTOR, S., TUMMALA, R., KISIEL, N.D., DIEGELMAN, P., VUJCIC, S., CLARK, K., FAKIH, M., KRAMER, D.L., PORTER, C.W., PENDYALA, L., 2008, Polyamine catabolism in colorectal cancer cells following treatment with oxaliplatin, 5-fluorouracil and N1, N11 diethylnorspermine, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 62 (3), 517-527.
8. KEE, K., VUJCIC, S., MERALI, S., DIEGELMAN, P., KISIEL, N., POWELL, C.T., KRAMER, D.L., PORTER, C.W., 2004, Metabolic and antiproliferative consequences of activated polyamine catabolism in LNCaP prostate carcinoma cells, *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (26), 27050-27058.
9. CASERO, R.A., JR. and PEGG, A.E., 1993, Spermidine/spermine N1-acetyltransferase--the turning point in polyamine metabolism, *Faseb Journal*, 7 (8), 653-661.
10. LINDSAY, G.S. and WALLACE, H.M., 1999, Changes in polyamine catabolism in HL-60 human promyelogenous leukaemic cells in response to etoposide-induced apoptosis, *The Biochemical Journal*, 337 (1)83-87.
11. PLEDGIE, A., HUANG, Y., HACKER, A., ZHANG, Z., WOSTER, P.M., DAVIDSON, N.E., CASERO, R.A., JR., 2005, Spermine oxidase SMO(PAOh1), Not N1-acetylpolyamine oxidase PAO, is the primary source of cytotoxic H₂O₂ in polyamine analogue-treated human breast cancer cell lines, *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (48), 39843-39851.
12. CHEN, Y., KRAMER, D.L., JELL, J., VUJCIC, S., PORTER, C.W., 2003, Small interfering RNA suppression of polyamine analog-induced spermidine/spermine n1-acetyltransferase, *Molecular Pharmacology*, 64 (5), 1153-1159.

13. SUNKARA, P.S. and ROSENBERGER, A.L., 1987, Antimetastatic activity of DL-alpha-difluoromethylornithine, an inhibitor of polyamine biosynthesis, in mice, *Cancer Research*, 47 (4), 933-935.
14. SCHIPPER, R.G., ROMIJN, J.C., CUIJPERS, V.M., VERHOFSTAD, A.A., 2003, Polyamines and prostatic cancer, *Biochemical Society Transactions*, 31 (2), 375-380.
15. MALIKOVA, J., SWACZYNOVA, J., KOLAR, Z., STRNAD, M., 2008, Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids, *Phytochemistry*, 69 (2), 418-426.
16. BISHOP, G.J. and KONCZ, C., 2002, Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling, *Plant Cell*, 14, 97-110.
17. ALI, B., HAYAT, S., FARIDUDDIN, Q., AHMAD, A., 2008, 24-Epibrassinolide protects against the stress generated by salinity and nickel in *Brassica juncea*, *Chemosphere*, 72(9), 1387-1392.
18. BAJGUZ, A. and HAYAT, S., 2009, Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses, *Plant Physiology and Biochemistry*, 47 (1), 1-8.
19. WANG, R.S., YEH, S., TZENG, C.R., CHANG, C., 2009, Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice, *Endocrine reviews*, 30 (2), 119-132.
20. KLEUSER, B., MALEK, D., GUST, R., PERTZ, H.H, POTTECK, H., 2008, 17-Beta-estradiol inhibits transforming growth factor-beta signaling and function in breast cancer cells via activation of extracellular signal-regulated kinase through the G protein-coupled receptor 30, *Molecular pharmacology*, 74 (6), 1533-1543.
21. STEIGEROVA, J., OKLESTKOVA, J., LEVKOVA, M., RAROVA, L., KOLAR, Z., STRNAD, M., 2010, Brassinosteroids cause cell cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells, *Chemico-biological interactions*, 188 (3), 487-496.
22. KUMAR, V.L. and MAJUMDER P.K, 1995, Prostate gland: structure, functions and regulation, *International urology and nephrology*, 27 (3), 231-243.
23. CUNHA, G.R. and DONJACOUR, A., 1987, Stromal-epithelial interactions in normal and abnormal prostatic development, *Progress in Clinical and Biological Research*, 239251-272.
24. TAPLIN, M.E. and. HO, S.M., 2001, Clinical review 134: The endocrinology of prostate cancer, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86 (8), 3467-3477.
25. MCCORMACK, R.T., RITTENHOUSE, H.G., FINLAY, J.A., SOKOLOFF, R.L., WANG, T.J., WOLFERT, R.L., LILJA, H., OESTERLING, J.E., 1995, Molecular forms of prostate-specific antigen and the human kallikrein gene family: a new era, *Urology*, 45 (5), 729-744.
26. ABRAHAMSSON, P.A., FALKMER, S., FALT, K., GRIMELIUS, L., 1989, The course of neuroendocrine differentiation in prostatic carcinomas. An immunohistochemical study testing chromogranin A as an "endocrine marker", *Pathology, Research and Practice*, 185 (3), 373-380.

27. THORPE, A. and NEAL, D., 2003, Benign prostatic hyperplasia, *Lancet*, 361(9366), 1359-1367.
28. COLEMAN, M.P., QUARESMA, M., BERRINO, F., LUTZ, J.M., DE ANGELIS, R., CAPOCACCIA, R., BAILI, P., RACHET, B., GATTA, G., HAKULINEN, T., MICHELI, A., SANT, M., WEIR, H.K., ELWOOD, J.M., TSUKUMA, H., KOIFMAN, S., GA, E.S., FRANCISCI, S., SANTAQUILANI, M., VERDECCHIA, A., STORM, H.H., YOUNG, J.L., 2008, Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD), *Lancet Oncology*, 9(8), 730-756.
29. CRAWFORD, E.D., MILLER, G.J., LABRIE, F., HIRANO, D., BATUELLO, J., GLODE, L.M., 2001, Prostate cancer pathology, screening, and epidemiology, *Reviews in Urology*, 3 (2) 2-10.
30. CARTER, B.S., BOVA, G.S., BEATY, T.H., STEINBERG, G.D., CHILDS, B., ISAACS, W.B., WALSH, P.C., 1993, Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features, *Journal of Urology*, 150(3), 797-802.
31. MITRA, A., FISHER, C., FOSTER, C.S., JAMESON, C., BARBACHANNO, Y., BARTLETT, J., BANCROFT, E., DOHERTY, R., KOTE-JARAI, Z., PEOCK, S., EASTONR EELES D., 2008, Prostate cancer in male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers has a more aggressive phenotype, *British Journal of Cancer*, 98 (2), 502-507.
32. HILL, P., WYNDER, E.L., GARBACZEWSKI, L., GARNES, H., WALKER A.R., 1979, Diet and urinary steroids in black and white North American men and black South African men, *Cancer Research*, 39 (12), 5101-5105.
33. HAYES, R.B., POTTERN, L.M., STRICKLER, H., RABKIN, C., POPE, V., SWANSON, G.M., GREENBERG, R.S., SCHOENBERG, J.B., LIFF, J., SCHWARTZ, A.G., HOOVER, R.N., FRAUMENI J.F., 2000, Sexual behaviour, STDs and risks for prostate cancer, *British Journal of Cancer*, 82 (3), 718-725.
34. ADAMI, H.O., KUPER, H., ANDERSSON, S.O., BERGSTROM, R., DILLNER, J., 2003, Prostate cancer risk and serologic evidence of human papilloma virus infection: a population-based case-control study, *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 12 (9), 872-875.
35. HUGGINS, C., HODGES, C.V., 1972, Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 22 (4), 232-240.
36. HO, S.M., LEUNG, Y.K., CHUNG, I., 2006, Estrogens and antiestrogens as etiological factors and therapeutics for prostate cancer, *Annals of The New York Academy of Sciences*, 1089, 177-193.
37. ISAACS, J.T., FURUYA, Y., BERGES, R., 1994, The role of androgen in the regulation of programmed cell death/apoptosis in normal and malignant prostatic tissue, *Seminars in Cancer Biology*, 5 (5), 391-400.
38. VANDER GRIEND, D.J., D'ANTONIO, J., GUREL, B., ANTONY, L., DEMARZO, A.M., ISAACS, J.T., 2010, Cell-autonomous intracellular androgen receptor signaling drives the growth of human prostate cancer initiating cells, *Prostate*, 70 (1), 90-99.

39. CHANG, C.S., KOKONTIS, J., LIAO, S.T., 1988, Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors, *Science*, 240 (4850), 324-326.
40. CALLEWAERT, L., VAN TILBORGH, N., CLAESSENS, F., 2006, Interplay between two hormone-independent activation domains in the androgen receptor, *Cancer Research*, 66 (1), 543-553.
41. GELMANN, E.P., 2002, Molecular biology of the androgen receptor, *Journal of Clinical Oncology*, 20 (13), 3001-3015.
42. MCEWAN, I.J., 2004, Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain, *Endocrine Related Cancer*, 11 (2), 281-293.
43. YOUNG, C.Y., ANDREWS, P.E., MONTGOMERY, B.T., TINDALL, D.J., 1992, Tissue-specific and hormonal regulation of human prostate-specific glandular kallikrein, *Biochemistry*, 31 (3), 818-824.
44. PERRY, J.E., GROSSMANN, M.E., TINDALL, D.J., 1996, Androgen regulation of gene expression, *The Prostate Supplement*, 679-681.
45. FASCIANA, C., VAN DER MADE, A.C., FABER, P.W., TRAPMAN, J., 1996, Androgen regulation of the rat keratinocyte growth factor (KGF/FGF7) promoter, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 220 (3), 858-863.
46. THOMPSON, I.M., GOODMAN, P.J., TANGEN, C.M., LUCIA, M.S., MILLER, G.J., FORD, L.G., LIEBER, M.M., CESPEDES, R.D., ATKINS, J.N., LIPPMAN, S.M., CARLIN, S.M., RYAN, A., SZCZEPANEK, C.M., CROWLEY, J.J., COLTMAN, C.A., 2003, The influence of finasteride on the development of prostate cancer, *The New England Journal of Medicine*, 349 (3), 215-224.
47. ANDRIOLE, G.L., BOSTWICK, D.G., BRAWLEY, O.W., GOMELLA, L.G., MARBERGER, M., MONTORSI, F., PETTAWAY, C.A., TAMMELA, T.L., TELOKEN, C., TINDALL, D.J., SOMERVILLE, M.C., WILSON, T.H., FOWLERR, I.L., RITTMASER, S., 2010, Effect of dutasteride on the risk of prostate cancer, *The New England Journal of Medicine*, 362 (13), 1192-1202.
48. LABRIE, F., BELANGER, A., LUU-THE, V., LABRIE, C., SIMARD, J., CUSAN, L., GOMEZ, J., CANDAS, B., 2005, Gonadotropin-releasing hormone agonists in the treatment of prostate cancer, *Endocrine Reviews*, 26 (3), 361-379.
49. LEON, C.G., LOCKE, J.A., ADOMAT, H.H., ETINGER, S.L., TWIDDY, A.L., NEUMANN, R.D., NELSON, C.C., GUNS, E.S., WASAN, K.M., 2010, Alterations in cholesterol regulation contribute to the production of intratumoral androgens during progression to castration-resistant prostate cancer in a mouse xenograft model, *Prostate*, 70 (4), 390-400.
50. MONTGOMERY, R.B., MOSTAGHEL, E.A., VESSELLA, R., HESS, D.L., KALHORN, T.F., HIGANO, C.S., TRUE, L.D., NELSON, P.S., 2008, Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth, *Cancer Research*, 68 (11), 4447-4454.

51. EDWARDS, J., KRISHNA, N.S., GRIGOR, K.M., BARTLETT, J.M., 2003, Androgen receptor gene amplification and protein expression in hormone refractory prostate cancer, *British Journal of Cancer*, 89 (3), 552-556.
52. FELDMAN, B.J. and FELDMAN D., 2001, The development of androgen-independent prostate cancer, *Nature Reviews. Cancer*, 1 (1), 34-45.
53. CULIG, Z., HOBISCH, A., CRONAUER, M.V., RADMAYR, C., TRAPMAN, J., HITTMAYER, A., BARTSCH, G., KLOCKER, H., 1994, Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor, *Cancer Research*, 54 (20), 5474-5478.
54. SLAMON, D.J., GODOLPHIN, W., JONES, L.A., HOLT, J.A., WONG, S.G., KEITH, D.E., LEVIN, W.J., STUART, S.G., UDOVE, J., ULLRICHET, A.L., 1989, Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer, *Science*, 244 (4905), 707-712.
55. BORG, A., BALDETORP, B., FERNO, M., KILLANDER, D., OLSSON, H., RYDEN, S., SIGURDSSON, H., 1994, ERBB2 amplification is associated with tamoxifen resistance in steroid-receptor positive breast cancer, *Cancer Letters*, 81 (2), 137-144.
56. PIETRAS, R.J., ARBOLEDA, J., REESE, D.M., WONGVIPAT, N., PEGRAM, M.D., RAMOS, L., GORMAN, C.M., PARKER, M.G., SLIWKOWSKI, M.X., SLAMON, D.J., 1995, HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells, *Oncogene*, 10 (12), 2435-2446.
57. CRAFT, N., SHOSTAK, Y., CAREY, M., SAWYERS, C.L., 1999, A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase, *Nature Medicine*, 5 (3), 280-285.
58. SLAMON, D.J., LEYLAND-JONES, B., SHAK, S., FUCHS, H., PATON, V., BAJAMONDE, A., FLEMING, T., EIERMANN, W., WOLTER, J., PEGRAM, M., BASELGAL, J., 2001, Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2, *The New England Journal of Medicine*, 344 (11), 783-792.
59. YEH, S., LIN, H.K., KANG, H.Y., THIN, T.H., LIN, M.F., CHANG, C., 1999, From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (10), 5458-5463.
60. LI, J., YEN, C., LIAW, D., PODSYPANINA, K., BOSE, S., WANG, S.I., PUC, J., MILIAREISIS, C., RODGERS, L., MCCOMBIE, R., BIGNER, S.H., GIOVANELLA, B.C., ITTMANN, M., TYCKO, B., HIBSHOOSH, H., WIGLERR, M.H., 1997, PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer, *Science*, 275 (5308), 1943-1947.
61. DATTA, S.R., BRUNET, A., GREENBERG, M.E., 1999, Cellular survival: a play in three Akts, *Genes and Development*, 13 (22), 2905-2927.

62. ZHOU, H., LI, X.M., MEINKOTH, J., PITTMAN, R.N., 2000, Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level, *The Journal of Cell Biology*, 151 (3), 483-494.
63. GRAFF, J.R., KONICEK, B.W., MCNULTY, A.M., WANG, Z., HOUCK, K., ALLEN, S., PAUL, J.D., HBAIU, A., GOODE, R.G., SANDUSKY, G.E., VESSELLAB, R.L., NEUBAUER, L., 2000, Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression, *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (32), 24500-24505.
64. WEN, Y., HU, M.C., MAKINO, K., SPOHN, B., BARTHOLOMEUSZ, G., YAN, D.H., HUNG, M.C., 2000, HER-2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the Akt pathway, *Cancer Research*, 60 (24), 6841-6845.
65. GIRI, D., OZEN, M., ITTMANN, M., 2001, Interleukin-6 is an autocrine growth factor in human prostate cancer, *American Journal of Pathology*, 159 (6), 2159-2165.
66. HOBISCH, A., EDER, I.E., PUTZ, T., HORNINGER, W., BARTSCH, G., KLOCKER, H., CULIG, Z., 1998, Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor, *Cancer Research*, 58 (20), 4640-4645.
67. TAPLIN, M.E., BUBLEY, G.J., SHUSTER, T.D., FRANTZ, M.E., SPOONER, A.E., OGATA, G.K., KEER, H.N., BALK, S.P., 1995, Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer, *The New England Journal of Medicine*, 332 (21), 1393-1398.
68. TAPLIN, M.E., RAJESHKUMAR, B., HALABI, S., WERNER, C.P., WODA, B.A., PICUS, J., STADLER, W., HAYES, D.F., KANTOFF, P.W., VOGELZANGE, N.J., SMALL, J., 2003, Androgen receptor mutations in androgen-independent prostate cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663, *Journal of Clinical Oncology*, 21 (14), 2673-2678.
69. GADDIPATI, J.P., MCLEOD, D.G., HEIDENBERG, H.B., SESTERHENN, I.A., FINGER, M.J., MOUL, J.W., SRIVASTAVA, S., 1994, Frequent detection of codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancers, *Cancer Research*, 54 (11), 2861-2864.
70. STEKETEE, K., TIMMERMAN, L., ZIEL-VAN DER MADE, A.C., DOESBURG, P., BRINKMANN, A.O., TRAPMAN, J., 2002, Broadened ligand responsiveness of androgen receptor mutants obtained by random amino acid substitution of H874 and mutation hot spot T877 in prostate cancer, *International Journal of Cancer*, 100 (3), 309-317.
71. TAPLIN, M.E., BUBLEY, G.J., KO, Y.J., SMALL, E.J., UPTON, M., RAJESHKUMAR, B., BALK, S.P., 1999, Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist, *Cancer Research*, 59 (11), 2511-2515.
72. SUZUKI, H., SATO, N., WATABE, Y., MASAI, M., SEINO, S., SHIMAZAKI, J., 1993, Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 46 (6), 759-765.

73. NEWMARK, J.R., HARDY, D.O., TONB, D.C., CARTER, B.S., EPSTEIN, J.I., ISAACS, W.B., BROWN, T.R., BARRACK, E.R., 1992, Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89 (14), 6319-6323.
74. MCDONNELL, T.J., TRONCOSO, P., BRISBAY, S.M., LOGOTHETIS, C., CHUNG, L.W., HSIEH, J.T., TU, S.M., CAMPBELL, M.L., 1992, Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer, *Cancer Research*, 52 (24), 6940-6944.
75. FURUYA, Y., KRAJEWSKI, S., EPSTEIN, J.I., REED, J.C., ISAACS, J.T., 1996, Expression of bcl-2 and the progression of human and rodent prostatic cancers, *Clinical Cancer Research*, 2 (2), 389-398.
76. GLEAVE, M.E., ZELLWEGER, T., CHI, K., MIYAKE, H., KIYAMA, S., JULY, L., LEUNG, S., 2002, Targeting anti-apoptotic genes upregulated by androgen withdrawal using antisense oligonucleotides to enhance androgen- and chemo-sensitivity in prostate cancer, *Investigational new drugs*, 20 (2), 145-158.
77. ERLICH, S., TAL-OR, P., LIEBLING, R., BLUM, R., KARUNAGARAN, D., KLOOG, Y., PINKAS-KRAMARSKI, R., 2006, Ras inhibition results in growth arrest and death of androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells, *Biochemical Pharmacology*, 72 (4), 427-436.
78. KATO, G.J., WECHSLER, D.S., DANG, C.V., 1992, DNA binding by the Myc oncoproteins, *Cancer Treatment Research*, 63, 313-325.
79. FLEMING, W.H., HAMEL, A., MACDONALD, R., RAMSEY, E., PETTIGREW, N.M., JOHNSTON, B., DODD, J.G., MATUSIK, R.J., 1986, Expression of the c-myc protooncogene in human prostatic carcinoma and benign prostatic hyperplasia, *Cancer Research*, 46 (3), 1535-1538.
80. BUTTYAN, R., SAWCZUK, I.S., BENSON, M.C., SIEGAL, J.D., OLSSON, C.A., 1987, Enhanced expression of the c-myc protooncogene in high-grade human prostate cancers, *Prostate*, 11 (4), 327-337.
81. GOODRICH, D.W., WANG, N.P., QIAN, Y.W., LEE, E.Y., LEE, W.H., 1991, The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle, *Cell*, 67 (2), 293-302.
82. BOOKSTEIN, R., RIO, P., MADREPERLA, S.A., HONG, F., ALLRED, C., GRIZZLE, W.E., LEE, W.H., 1990, Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87 (19), 7762-7766.
83. BOOKSTEIN, R., SHEW, J.Y., CHEN, P.L., SCULLY, P., LEE, W.H., 1990, Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated RB gene, *Science*, 247 (4943), 712-715.
84. OLIVIER, M., PETITJEAN, A., MARCEL, V., PETRE, A., MOUNAWAR, M., PLYMOTH, A., DE FROMENTEL, C.C., HAINAUT, P., 2009, Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective, *Cancer Gene Therapy*, 16 (1), 1-12.
85. HEEMERS, H.V. and TINDALL, D.J., 2007, Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex, *Endocrine Reviews*, 28 (7), 778-808.

86. ONATE, S.A., TSAI, S.Y., TSAI, M.J., O'MALLEY, B.W., 1995, Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily, *Science*, 270 (5240), 1354-1357.
87. FU, M., WANG, C., REUTENS, A.T., WANG, J., ANGELETTI, R.H., SICONOLFI-BAEZ, L., OGRYZKO, V., AVANTAGGIATI, M.L., PESTELL R.G., 2000, p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation, *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (27), 20853-20860.
88. GAUGHAN, L., LOGAN, I.R., COOK, S., NEAL, D.E., ROBSON, C.N., 2002, Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor, *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (29), 25904-25913.
89. FUJIMOTO, N., MIZOKAMI, A., HARADA, S., MATSUMOTO, T., 2001, Different expression of androgen receptor coactivators in human prostate, *Urology*, 58 (2), 289-294.
90. AGOULNIK, I.U., VAID, A., NAKKA, M., ALVARADO, M., BINGMAN, W.E., ERDEM, H., FROLOV, A., SMITH, C.L., AYALA, G.E., ITTMANN, M.M., WEIGEL, L., 2006, Androgens modulate expression of transcription intermediary factor 2, an androgen receptor coactivator whose expression level correlates with early biochemical recurrence in prostate cancer, *Cancer Research*, 66 (21), 10594-10602.
91. SHATKINA, L., MINK, S., ROGATSCH, H., KLOCKER, H., LANGER, G., NESTL, A., CATO, A.C., 2003, The cochaperone Bag-1L enhances androgen receptor action via interaction with the NH2-terminal region of the receptor, *Molecular and Cellular Biology*, 23 (20), 7189-7197.
92. ISAACS, J.T., 1999, The biology of hormone refractory prostate cancer. Why does it develop? *The Urologic clinics of North America*, 26 (2), 263-273.
93. DENMEADE, S.R., LIN, X.S., ISAACS, J.T., 1996, Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer, *Prostate*, 28 (4), 251-265.
94. BUI, M. and REITER, R.E., 1998, Stem cell genes in androgen-independent prostate cancer, *Cancer Metastasis Reviews*, 17 (4), 391-399.
95. CRAFT, N., CHHOR, C., TRAN, C., BELLDEGRUN, A., DEKERNION, J., WITTE, O.N., SAID, J., REITER, R.E., SAWYERS, C.L., 1999, Evidence for clonal outgrowth of androgen-independent prostate cancer cells from androgen-dependent tumors through a two-step process, *Cancer Research*, 59 (19), 5030-5036.
96. HANAFY, H.M., 1982, Carcinoma of the prostate, Where are we?, *International Surgery*, 67 (2), 175-177.
97. KREUL, S.M., HAVIGHURST, T., KIM, K., MENDONCA, E.A., WOOD, G.S., SNOW, S., BORICH, A., VERMA, A., BAILEY, H.H., 2012, A phase III skin cancer chemoprevention study of DFMO: long-term follow-up of skin cancer events and toxicity, *Cancer Prevention Research*, 5 (12), 1368-1374.
98. NGUYEN, C.T. and CAMPBELL, S.C., 2006, Staging of renal cell carcinoma: past, present, and future, *Clinical Genitourin Cancer*, 5(3), 190-197.
99. MCDONNELL, T.J., CHARI, N.S., CHO-VEGA, J.H., TRONCOSO, P., WANG, X., BUESO-RAMOS, C.E., COOMBES, K., BRISBAY, S., LOPEZ,

- R., PRENDERGAST, G., LOGOTHETISK, C., DO, A., 2008, Biomarker expression patterns that correlate with high grade features in treatment naive, organ-confined prostate cancer, *BMC Medical Genomics*, 1, 1.
100. ICZKOWSKI, K.A. and LUCIA, M.S., 2011, Current perspectives on Gleason grading of prostate cancer, *Current Urology Reports*, 12 (3), 216-222.
 101. LEPOR, H. and SHORE, N.D., 2012, LHRH Agonists for the Treatment of Prostate Cancer: 2012, *Reviews in Urology*, 14 (1-2), 1-12.
 102. TANNOCK, I., GOSPODAROWICZ, M., MEAKIN, W., PANZARELLA, T., STEWART, L., RIDER, W., 1989, Treatment of metastatic prostatic cancer with low-dose prednisone: evaluation of pain and quality of life as pragmatic indices of response, *Journal of Clinical Oncology*, 7 (5), 590-597.
 103. TANNOCK, I.F., DE WIT, R., BERRY, W.R., HORTI, J., PLUZANSKA, A., CHI, K.N., OUDARD, S., THEODORE, C., JAMES, N.D., TURESSON, I., ROSENTHALM, M.A., EISENBERGER, A., 2004, Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer, *The New England Journal of Medicine*, 351 (15), 1502-1512.
 104. PETRYLAK, D.P., TANGEN, C.M., HUSSAIN, M.H., P.N. LARA, JONES, J.A., TAPLIN, M.E., BURCH, P.A., BERRY, D., MOINPOUR, C., KOHLI, M., BENSON, M.C., SMALL, E.J., RAGHAVANE, D., CRAWFORD, D., 2004, Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer, *The New England Journal of Medicine*, 351 (15), 1513-1520.
 105. STERNBERG, C.N., 2005, Satraplatin in the treatment of hormone-refractory prostate cancer, *BJU International*, 96 (7), 990-994.
 106. SMALL, A.C. and OH, W.K., 2012, Bevacizumab treatment of prostate cancer, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12 (9), 1241-1249.
 107. DROR MICHAELSON, M., REGAN, M.M., OH, W.K., KAUFMAN, D.S., OLIVIER, K., MICHAELSON, S.Z., SPICER, B., GURSKI, C., KANTOFF, P.W., SMITH, M.R., 2009, Phase II study of sunitinib in men with advanced prostate cancer, *Annals of Oncology*, 20 (5), 913-920.
 108. DI LORENZO, G., FIGG, W.D., FOSSA, S.D., MIRONE, V., AUTORINO, R., LONGO, N., IMBIMBO, C., PERDONA, S., GIORDANO, A., GIULIANO, M., LABIANCAS, R., DE PLACIDO, A., 2008, Combination of bevacizumab and docetaxel in docetaxel-pretreated hormone-refractory prostate cancer: a phase 2 study, *European Urology*, 54 (5), 1089-1094.
 109. KELLY, W.K., HALABI, S., CARDUCCI, M., GEORGE, D., MAHONEY, J.F., STADLER, W.M., MORRIS, M., KANTOFF, P., MONK, J.P., KAPLAN, E., VOGELZANGE, N.J., SMALL, J., 2010, Randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial comparing docetaxel and prednisone with or without bevacizumab in men with metastatic castration-resistant prostate cancer: CALGB 90401, *Journal of Clinical Oncology*, 30 (13), 1534-1540.
 110. LEEUWENHOEK, A.V., 1978, Observationes de natis e semine genitali animalculis., *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 12, 1040-1043.
 111. VERLINDEN, B.K., NIEMAND, J., SNYMAN, J., SHARMA, S.K., BEATTIE, R.J., WOSTER, P.M., BIRKHOLTZ, L.M., 2011, Discovery of novel alkylated (bis)urea and (bis)thiourea polyamine analogues with potent antimalarial activities, *Journal of Medicinal Chemistry*, 54 (19), 6624-6633.

112. SUNKARA, P.S., FOWLER, S.K., NISHIOKA, K., RAO, P.N., 1980, Inhibition of polyamine biosynthesis by alpha-difluoromethyl ornithine potentiates the cytotoxic effects of arabinosyl cytosine in HeLa cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 95 (1), 423-430.
113. CASERO, R.A., JR. and WOSTER, P.M., 2001, Terminally alkylated polyamine analogues as chemotherapeutic agents, *Journal of Medicinal Chemistry*, 44 (1), 1-26.
114. MORGAN, D.M., 1998, Polyamines. An introduction, *Methods in Molecular Biology*, 79, 3-30.
115. LEETE, E., 1990, Recent developments in the biosynthesis of the tropane alkaloids, *Planta Medica*, 56 (4), 339-352.
116. CABBINESS, S.G., GEHRKE, C.W., KUO, K.C., CHAN, T.K., HALL, J.E., HUDIBURG, S.A., ODELL, G.V., 1980, Polyamines in some tarantula venoms. *Toxicon*, 18 (5-6), 681-683.
117. FAIRLAMB, A.H. and CERAMI, A., 1992, Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annual Reviews of Microbiology*, 46, 695-729.
118. SCHIPPER, R.G., PENNING, L.C., VERHOFSTAD, A.A., 2000, Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors?, *Seminars in Cancer Biology*, 10 (1), 55-68.
119. ALM, K., BERNTSSON, P.S., KRAMER, D.L., PORTER, C.W., OREDSSON, S.M., 2000, Treatment of cells with the polyamine analog N, N11-diethylnorspermine retards S phase progression within one cell cycle, *European Journal of Biochemistry*, 267 (13), 4157-4164.
120. BRYSON, K. and GREENALL, R.J., 2000, Binding sites of the polyamines putrescine, cadaverine, spermidine and spermine on A- and B-DNA located by simulated annealing, *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 18 (3), 393-412.
121. MCCANN, P.P. and PEGG, A.E., 1992, Ornithine decarboxylase as an enzyme target for therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 54 (2), 195-215.
122. BALASUNDARAM, D. and TYAGI, A.K., 1991, Polyamine--DNA nexus: structural ramifications and biological implications. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 100 (2), 129-140.
123. AUVINEN, M., PAASINEN, A., ANDERSSON, L.C., HOLTITA, E., 1992, Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation, *Nature*, 360 (6402), 355-358.
124. RAY, R.M., VIAR, M.J., YUAN, Q., JOHNSON, L.R., 2000, Polyamine depletion delays apoptosis of rat intestinal epithelial cells, *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 278 (3), 480-489.
125. PARK, M.H., 1989, The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). Purification of eIF-4D and its precursors and comparison of their activities, *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (31), 18531-18535.
126. CELANO, P., BAYLIN, S.B., GIARDIELLO, F.M., NELKIN, B.D., CASERO JR, R.A., 1988, Effect of polyamine depletion on c-myc expression in human colon carcinoma cells, *The Journal of Biological Chemistry*, 263 (12), 5491-5494.

127. POHJANPELTO, P. and HOLTTA, E., 1996, Phosphorylation of Okazaki-like DNA fragments in mammalian cells and role of polyamines in the processing of this DNA, *Embo Journal*, 15 (5), 1193-1200.
128. MAMONT, P.S., BOHLEN, P., MCCANN, P.P., BEY, P., SCHUBER, F., TARDIF, C., 1976, Alpha-methyl ornithine, a potent competitive inhibitor of ornithine decarboxylase, blocks proliferation of rat hepatoma cells in culture, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73 (5), 1626-1630.
129. MAMONT, P.S., DUCHESNE, M.C., GROVE, J., BEY, P., 1978, Anti-proliferative properties of DL-alpha-difluoromethyl ornithine in cultured cells. A consequence of the irreversible inhibition of ornithine decarboxylase, *Biochem Biochemical and Biophysical Research Communications*, 81 (1), 58-66.
130. MEYSKENS, F.L. and GERNER, E.W., 1999, Development of difluoromethylornithine (DFMO) as a chemoprevention agent, *Clinical Cancer Research*, 5 (5), 945-951.
131. RUSSELL, D.H., 1973, The roles of the polyamines, putrescine, spermidine, and spermine in normal and malignant tissues, *Life Sciences*, 13 (12), 1635-1647.
132. PERALTA SOLER, A., GILLIARD, G., MEGOSH, L., GEORGE, K., O'BRIEN, T.G., 1998, Polyamines regulate expression of the neoplastic phenotype in mouse skin, *Cancer Research*, 58 (8), 1654-1659.
133. BARRANCO, S.C., FORD, P.J., TOWNSEND JR C.M., 1989, Heterogeneous survival and cell kinetics responses of human astrocytoma clones to alpha-difluoromethylornithine in vitro, *Investigational New Drugs*, 7 (2-3), 155-161.
134. BELLO-FERNANDEZ, C., PACKHAM, G., CLEVELAND, J.L., 1993, The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (16), 7804-7808.
135. WAGNER, A.J., MEYERS, C., LAIMINS, L.A., HAY, N., 1993, c-Myc induces the expression and activity of ornithine decarboxylase, *Cell Growth and Differentiation*, 4 (11), 879-883.
136. PACKHAM, G. and CLEVELAND, J.L., 1995, The role of ornithine decarboxylase in c-Myc-induced apoptosis, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 194, 283-290.
137. CHENG, Y., CHATURVEDI, R., ASIM, M., BUSSIÈRE, F.I., SCHOLZ, A., XU, H., CASERO JR, R.A., WILSON, K.T., 2005, Helicobacter pylori-induced macrophage apoptosis requires activation of ornithine decarboxylase by c-Myc, *Journal of Biological Chemistry*, 280 (23), 22492-22496.
138. REDDY, B.S., 2007, Strategies for colon cancer prevention: combination of chemopreventive agents, *Subcellular Biochemistry*, 42, 213-225.
139. GERNER, E.W., MEYSKENS JR, F.L., GOLDSCHMID, S., LANCE, P., PELOT, D., 2007, Rationale for, and design of, a clinical trial targeting polyamine metabolism for colon cancer chemoprevention, *Amino Acids*, 33 (2), 189-195.
140. GERNER, E.W. and MEYSKENS JR, F.L. 2004, Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nature Reviews. Cancer*, 4 (10), 781-792.

141. TABIB, A. and BACHRACH, U., 1998, Polyamines induce malignant transformation in cultured NIH 3T3 fibroblasts, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 30 (1), 135-146.
142. WALLACE, H.M., FRASER, A.V., HUGHES, A., 2003, A perspective of polyamine metabolism, *The Biochemical Journal*, 376 (1), 1-14.
143. PERSSON, L., WALLSTROM, E.L., NASIZADEH, S., DARTSCH, C., JEPSSON, A., WENDT, A., HOLMGREN, J., 1998, Regulation of mammalian ornithine decarboxylase, *Biochemical Society Transactions*, 26 (4), 575-579.
144. TANG, X., KIM, A.L., FEITH, D.J., PEGG, A.E., RUSSO, J., ZHANG, H., ASZTERBAUM, M., KOPELOVICH, L., EPSTEIN, E.H., BICKERSM, J.R., ATHAR, D.R., 2004, Ornithine decarboxylase is a target for chemoprevention of basal and squamous cell carcinomas in Ptch1+/- mice, *The Journal of Clinical Investigation*, 113 (6), 867-875.
145. HELLER, J.S. and CANELLAKIS, E.S., 1981, Cellular control of ornithine decarboxylase activity by its antizyme, *Journal of Cellular Physiology*, 107 (2), 209-217.
146. MURAKAMI, Y., FUJITA, K., KAMEJI, T., HAYASHI, S., 1985, Accumulation of ornithine decarboxylase-antizyme complex in HMOA cells, *The Biochemical Journal*, 225 (3), 689-697.
147. PEGG, A.E., 2006, Regulation of ornithine decarboxylase, *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (21), 14529-14532.
148. COFFINO, P., 2001, Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation, *Biochimie*, 83 (3-4), 319-323.
149. FUJITA, K., MURAKAMI, Y., HAYASHI, S., 1982, A macromolecular inhibitor of the antizyme to ornithine decarboxylase, *The Biochemical Journal*, 204 (3), 647-652.
150. MURAKAMI, Y., NISHIYAMA, M., HAYASHI, S., 1989, Involvement of antizyme in stabilization of ornithine decarboxylase caused by inhibitors of polyamine synthesis, *European Journal of Biochemistry*, 180 (1), 181-184.
151. NILSSON, J., GRAHN, B., HEBY, O., 2000, Antizyme inhibitor is rapidly induced in growth-stimulated mouse fibroblasts and releases ornithine decarboxylase from antizyme suppression, *The Biochemical Journal*, 346 (3), 699-704.
152. MURAKAMI, Y., ICHIBA, T., MATSUFUJI, S., HAYASHI, S., 1996, Cloning of antizyme inhibitor, a highly homologous protein to ornithine decarboxylase, *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (7), 3340-3342.
153. MANGOLD, U. and LEBERER, E., 2005, Regulation of all members of the antizyme family by antizyme inhibitor, *The Biochemical Journal*, 385 (1), 21-28.
154. JUNG, M.H., KIM, S.C., JEON, G.A., KIM, S.H., KIM, Y., CHOI, K.S., PARK, S.I., JOE, M.K., KIMM, K., 2000, Identification of differentially expressed genes in normal and tumor human gastric tissue, *Genomics*, 69 (3), 281-286.
155. KOIKE, C., CHAO, D.T., ZETTER, B.R., 1999, Sensitivity to polyamine-induced growth arrest correlates with antizyme induction in prostate carcinoma cells, *Cancer Research*, 59 (24), 6109-6112.

156. FEITH, D.J., SHANTZ, L.M., PEGG, A.E., 2001, Targeted antizyme expression in the skin of transgenic mice reduces tumor promoter induction of ornithine decarboxylase and decreases sensitivity to chemical carcinogenesis, *Cancer Research*, 61 (16), 6073-6081.
157. PEGG, A.E., XIONG, H., FEITH, D.J., SHANTZ, L.M., 1998, S-adenosylmethionine decarboxylase: structure, function and regulation by polyamines, *Biochemical Society Transactions*, 26 (4), 580-586.
158. REGENASS, U., METT, H., STANEK, J., MUELLER, M., KRAMER, D., PORTER, C.W., 1994, CGP 48664, a new S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitor with broad spectrum antiproliferative and antitumor activity, *Cancer Research*, 54 (12), 3210-3217.
159. MANNI, A., GROVE, R., KUNSELMAN, S., ALDAZ, C.M., 1995, Involvement of the polyamine pathway in breast cancer progression, *Cancer Letters*, 92 (1), 49-57.
160. FOGEL-PETROVIC, M., KRAMER, D.L., GANIS, B., CASERO JR, R.A., PORTER, C.W., 1993, Cloning and sequence analysis of the gene and cDNA encoding mouse spermidine/spermine N1-acetyltransferase--a gene uniquely regulated by polyamines and their analogs, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1216 (2), 255-264.
161. COLEMAN, C.S., STANLEY, B.A., JONES, A.D., PEGG, A.E., 2004, Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase-2 (SSAT2) acetylates thialysine and is not involved in polyamine metabolism, *The Biochemical Journal*, 384 (1), 139-148.
162. CASERO JR, R.A., CELANO, P., ERVIN, S.J., APPLGREN, N.B., WIEST L., PEGG, A.E., 1991, Isolation and characterization of a cDNA clone that codes for human spermidine/spermine N1-acetyltransferase, *The Journal of Biological Chemistry*, 266 (2), 810-814.
163. VUJCIC, S., HALMEKYTO, M., DIEGELMAN, P., GAN, G., KRAMER, D.L., JANNE, J., PORTER, C.W., 2000, Effects of conditional overexpression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase on polyamine pool dynamics, cell growth, and sensitivity to polyamine analogs, *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (49), 38319-38328.
164. FOGEL-PETROVIC, M., SHAPPELL, N.W., BERGERON, R.J., PORTER, C.W., 1993, Polyamine and polyamine analog regulation of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in MALME-3M human melanoma cells, *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (25), 19118-19125.
165. XIAO, L. and CASERO JR, R.A., 1996, Differential transcription of the human spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SSAT) gene in human lung carcinoma cells, *The Biochemical Journal*, 313 (2) 691-696.
166. COLEMAN, C.S., HUANG, H., PEGG, A.E., 1995, Role of the carboxyl terminal MATEE sequence of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in the activity and stabilization by the polyamine analog N1,N12-bis(ethyl)spermine, *Biochemistry*, 34 (41), 13423-13430.
167. WANG, Y., XIAO, L., THIAGALINGAM, A., NELKIN, B.D., CASERO JR, R.A., 1998, The identification of a cis-element and a trans-acting factor involved in the response to polyamines and polyamine analogues in the regulation of the

- human spermidine/spermine N1-acetyltransferase gene transcription, *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (51), 34623-34630.
168. WANG, Y., DEVEREUX, W., STEWART, T.M., CASERO JR, R.A., 1999, Cloning and characterization of human polyamine-modulated factor-1, a transcriptional cofactor that regulates the transcription of the spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase gene, *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (31), 22095-22101.
 169. BABBAR, N., IGNATENKO, N.A., CASERO JR, R.A., GERNER, E.W., 2003, Cyclooxygenase-independent induction of apoptosis by sulindac sulfone is mediated by polyamines in colon cancer, *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (48), 47762-47775.
 170. BABBAR, N., GERNER, E.W., CASERO JR, R.A., 2006, Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SSAT) by aspirin in Caco-2 colon cancer cells, *The Biochemical Journal*, 394 (1), 317-324.
 171. CHOI, W., GERNER, E.W., RAMDAS, L., DUPART, J., CAREW, J., PROCTOR, L., HUANG, P., ZHANG, W., HAMILTON, S.R., 2005, Combination of 5-fluorouracil and N1,N11-diethylnorspermine markedly activates spermidine/spermine N1-acetyltransferase expression, depletes polyamines, and synergistically induces apoptosis in colon carcinoma cells, *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (5), 3295-3304.
 172. HOLTTA, E., 1977, Oxidation of spermidine and spermine in rat liver: purification and properties of polyamine oxidase, *Biochemistry*, 16 (1), 91-100.
 173. VUJCIC, S., LIANG, P., DIEGELMAN, P., KRAMER, D.L., PORTER, C.W., 2003, Genomic identification and biochemical characterization of the mammalian polyamine oxidase involved in polyamine back-conversion, *The Biochemical Journal*, 370 (1), 19-28.
 174. WU, T., YANKOVSKAYA, V., MCINTIRE, W.S., 2003, Cloning, sequencing, and heterologous expression of the murine peroxisomal flavoprotein, N1-acetylated polyamine oxidase, *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (23), 20514-20525.
 175. BERGERON, R.J., WEIMAR, W.R., LUCHETTA, G., STREIFF, R.R., WIEGAND, J., PERRIN, J., SCHREIER, K.M., PORTER, C., YAO, G.W., DIMOVA, H., 1995, Metabolism and pharmacokinetics of N1,N11-diethylnorspermine, *Drug Metabolism and Disposition*, 23 (10), 1117-1125.
 176. LAWSON, K.R., MAREK, S., LINEHAN, J.A., WOSTER, P.M., CASERO JR, R.A., PAYNE, C.M., GERNER, E.W., 2002, Detoxification of the polyamine analogue N1-ethyl-N11-[(cycloheptyl)methyl]-4,8-diazaundecane (CHENSpm) by polyamine oxidase, *Clinical Cancer Research*, 8 (5), 1241-1247.
 177. WANG, Y., HACKER, A., MURRAY-STEWART, T., FRYDMAN, B., VALASINAS, A., FRASER, A.V., WOSTER, P.M., CASERO JR, R.A., 2005, Properties of recombinant human N1-acetylpolyamine oxidase (hPAO): potential role in determining drug sensitivity, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 56 (1), 83-90.
 178. BEY, P., BOLKENIUS, F.N., SEILER, N., CASARA, P., 1985, N-2,3-Butadienyl-1,4-butanediamine derivatives: potent irreversible inactivators of mammalian polyamine oxidase, *Journal of Medicinal Chemistry*, 28 (1), 1-2.

179. DEVEREUX, W., WANG, Y., STEWART, T.M., HACKER, A., SMITH, R., FRYDMAN, B., VALASINAS, A.L., REDDY, V.K., MARTON, L.J., WARD, T.D, WOSTER, P.M., CASERO, R.A., 2003, Induction of the PAOh1/SMO polyamine oxidase by polyamine analogues in human lung carcinoma cells, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 52 (5), 383-390.
180. VUJCIC, S., DIEGELMAN, P., BACCHI, C.J, KRAMER, D.L., PORTER, C.W., 2002, Identification and characterization of a novel flavin-containing spermine oxidase of mammalian cell origin, *The Biochemical Journal*, 367 (3), 665-675.
181. WANG, Y., HACKER, A., MURRAY-STEWART, T., FLEISCHER, J.G., WOSTER, P.M., CASERO JR., R.A., 2005, Induction of human spermine oxidase SMO(PAOh1) is regulated at the levels of new mRNA synthesis, mRNA stabilization and newly synthesized protein, *The Biochemical Journal*, 386 (3), 543-547.
182. HASNE, M.P. and ULLMAN, B., 2005, Identification and characterization of a polyamine permease from the protozoan parasite *Leishmania major*, *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (15), 15188-15194.
183. SEILER, N., DELCROS, J.G., MOULINOX, J.P., 1996, Polyamine transport in mammalian cells. An update, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 28 (8), 843-861.
184. LESSARD, M., ZHAO, C., SINGH, S.M., POULIN, R., 1995, Hormonal and feedback regulation of putrescine and spermidine transport in human breast cancer cells, *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (4), 1685-1694.
185. CIPOLLA, B.G., HAVOUI, R., MOULINOX, J.P., 2007, Polyamine contents in current foods: a basis for polyamine reduced diet and a study of its long term observance and tolerance in prostate carcinoma patients, *Amino Acids*, 33 (2), 203-212.
186. BYERS, T.L., KAMEJI, R., RANNELS, D.E., PEGG, A.E., 1987, Multiple pathways for uptake of paraquat, methylglyoxal bis(guanyldiazide), and polyamines, *American Journal of Physiology*, 252 (1), 663-669.
187. COFFINO, P., 2001, Regulation of cellular polyamines by antizyme, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2 (3), 188-194.
188. SOULET, D., COVASSIN, L., KAOUASS, M., CHAREST-GAUDREAULT, R., AUDETTE, M., POULIN, R., 2002, Role of endocytosis in the internalization of spermidine-C(2)-BODIPY, a highly fluorescent probe of polyamine transport, *The Biochemical Journal*, 367 (2), 347-357.
189. SAKATA, K., KASHIWAGI, K., IGARASHI, K., 2000, Properties of a polyamine transporter regulated by antizyme, *The Biochemical Journal*, 347 (1) 297-303.
190. WATANABE, S., KUSAMA-EGUCHI, K., KOBAYASHI, H., IGARASHI, K., 1991, Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver, *The Journal of Biological Chemistry*, 266 (31), 20803-20809.
191. FEUERSTEIN, B.G., WILLIAMS, L.D., BASU, H.S., MARTON, L.J., 1991, Implications and concepts of polyamine-nucleic acid interactions, *The Journal of Cellular Biochemistry*, 46 (1), 37-47.

192. DENG, H., BLOOMFIELD, V.A., BENEVIDES, J.M., THOMAS, G.J., 2000, Structural basis of polyamine-DNA recognition: spermidine and spermine interactions with genomic B-DNAs of different GC content probed by Raman spectroscopy, *Nucleic Acids Research*, 28 (17), 3379-3385.
193. SAUVE, D.M., ANDERSON, H.J., RAY, J.M., JAMES, W., ROBERGE, M.M., 1999, Phosphorylation-induced rearrangement of the histone H3 NH₂-terminal domain during mitotic chromosome condensation, *The Journal of Cellular Biology*, 145 (2), 225-235.
194. BASU, H.S., STURKENBOOM, M.C., DELCROS, J.G., CSOKAN, P.P., SZOLLOSI, J., FEUERSTEIN, B.G., MARTON, L.J., 1992, Effect of polyamine depletion on chromatin structure in U-87 MG human brain tumour cells, *The Biochemical Journal*, 282 (3), 723-727.
195. BANCROFT, D., WILLIAMS, L.D., RICH, A., EGLI, M., 1994, The low-temperature crystal structure of the pure-spermine form of Z-DNA reveals binding of a spermine molecule in the minor groove, *Biochemistry*, 33 (5), 1073-1086.
196. THOMAS, T. and THOMAS, T.J., 1993, Structural specificity of polyamines in modulating the binding of estrogen receptor to potential Z-DNA forming sequences, *Journal of Receptor Research*, 13 (8), 1115-1133.
197. DESIDERIO, M.A., DANSI, P., TACCHINI, L., BERNELLI-ZAZZERA, A., 1999, Influence of polyamines on DNA binding of heat shock and activator protein 1 transcription factors induced by heat shock, *FEBS Letters*, 455 (1-2), 149-153.
198. PANAGIOTIDIS, C.A., ARTANDI, S., CALAME, K., SILVERSTEIN, S.J., 1995, Polyamines alter sequence-specific DNA-protein interactions, *Nucleic Acids Research*, 23 (10), 1800-1809.
199. HOLTTA, E. and HOVI, T., 1985, Polyamine depletion results in impairment of polyribosome formation and protein synthesis before onset of DNA synthesis in mitogen-activated human lymphocytes, *European Journal of Biochemistry*, 152 (1), 229-237.
200. IGARASHI, K. and KASHIWAGI, K., 2000, Polyamines: mysterious modulators of cellular functions, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 271 (3), 559-564.
201. SCHNIER, J., SCHWELBERGER, H.G., SMIT-MCBRIDE, Z., KANG, H.A., HERSHEY, J.W., 1991, Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and Cellular Biology*, 11 (6), 3105-3114.
202. CHATTOPADHYAY, M.K., PARK, M.H., TABOR, H., 2008, Hypusine modification for growth is the major function of spermidine in *Saccharomyces cerevisiae* polyamine auxotrophs grown in limiting spermidine, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (18), 6554-6559.
203. PARK, M.H., 2006, The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A), *Journal of Biochemistry*, 139 (2), 161-169.

204. DENG, W., JIANG, X., MEI, Y., SUN, J., MA, R., LIU, X., SUN, H., TIAN, H., SUN, X., 2008, Role of ornithine decarboxylase in breast cancer, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40 (3), 235-243.
205. YOUNG, L., SALOMON, R., AU, W., ALLAN, C., RUSSELL, P., DONG, Q., 2006, Ornithine decarboxylase (ODC) expression pattern in human prostate tissues and ODC transgenic mice, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 54 (2), 223-229.
206. TAKAHASHI, Y., MAI, M., NISHIOKA, K., 2000, alpha-difluoromethylornithine induces apoptosis as well as anti-angiogenesis in the inhibition of tumor growth and metastasis in a human gastric cancer model, *International Journal of Cancer*, 85 (2), 243-247.
207. MARCU, K.B., BOSSONE, S.A., PATEL, A.J., 1992, myc function and regulation, *Annu Rev Biochem*, 61, 809-860.
208. PALAVAN-UNSAL, N., ALOGLU-SENTURK, S.M., ARISAN, D., 2006, The function of polyamine metabolism in prostate cancer, *Experimental Oncology*, 28 (3), 178-186.
209. DAS, B., RAO, A.R., MADHUBALA, R., 1997, Difluoromethylornithine antagonizes taxol cytotoxicity in MCF-7 human breast cancer cells, *Oncology Research*, 9 (11-12), 565-572.
210. RAY, R.M., MCCORMACK, S.A., JOHNSON, L.R., 2001, Polyamine depletion arrests growth of IEC-6 and Caco-2 cells by different mechanisms, *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281 (1), G37-43.
211. RAY, R.M., ZIMMERMAN, B.J., MCCORMACK, S.A., PATEL, T.B., JOHNSON, L.R., 1999, Polyamine depletion arrests cell cycle and induces inhibitors p21(Waf1/Cip1), p27(Kip1), and p53 in IEC-6 cells, *American Journal of Physiology*, 276 (3), 684-691.
212. RAVANKO, K., JARVINEN, K., PAASINEN-SOHNIS, A., HOLTTA, E., 2000, Loss of p27Kip1 from cyclin E/cyclin-dependent kinase (CDK) 2 but not from cyclin D1/CDK4 complexes in cells transformed by polyamine biosynthetic enzymes, *Cancer Research*, 60 (18), 5244-5253.
213. LI, L., LI, J., RAO, J.N., LI, M., BASS, B.L., WANG, J.Y., 1999, Inhibition of polyamine synthesis induces p53 gene expression but not apoptosis, *American Journal of Physiology*, 276 (4), 946-954.
214. BHATTACHARYA, S., RAY, R.M., JOHNSON, L.R., 2009, Role of polyamines in p53-dependent apoptosis of intestinal epithelial cells, *Cellular Signaling*, 21 (4), 509-522.
215. THOMAS, T., SHAH, N., FAALAND, C., GALLO, M., YURKOW, E., SATYASWAROOP, P., 1997, Effects of a bis(benzyl)spermine analog on MCF-7 breast cancer cells in culture and nude mice xenografts, *Oncology Reports*, 4 (1), 5-13.
216. MARTY, C., MORI, G., SABINI, L., RIVAROLA, V., 2000, Effects of alpha-difluoromethylornithine on the cyclin A expression in Hep-2 cells, *Biocell*, 24 (1), 49-52.
217. OREDSSON, S.M., 2003, Polyamine dependence of normal cell-cycle progression, *Biochemical Society Transactions*, 31 (2), 366-370.

218. KRAMER, D.L., CHANG, B.D., CHEN, Y., DIEGELMAN, P., ALM, K., BLACK, A.R., RONINSON, I.B., PORTER, C.W., 2001, Polyamine depletion in human melanoma cells leads to G1 arrest associated with induction of p21WAF1/CIP1/SDI1, changes in the expression of p21-regulated genes, and a senescence-like phenotype, *Cancer Research*, 61 (21), 7754-7762.
219. FJOSNE, H.E., OSTENSEN, M.A., HAARSTAD, H., SUNDE, A., 1990, Androgen regulation of polyamine synthesis in seminal vesicle and in different lobes of the rat prostate, *Prostate*, 17 (1), 1-11.
220. DEVENS, B.H., WEEKS, R.S., BURNS, M.R., CARLSON, C.L., BRAWER M.K., 2000, Polyamine depletion therapy in prostate cancer, *Prostate Cancer and Prostatic Disease*, 3 (4), 275-279.
221. CROZAT, A., PALVIMO, J.J., JULKUNEN, M., JANNE, O.A., 1992, Comparison of androgen regulation of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase gene expression in rodent kidney and accessory sex organs, *Endocrinology*, 130 (3), 1131-1144.
222. LEVILLAIN, O., GRECO, A., DIAZ, J.J., AUGIER, R., DIDIER, A., KINDBEITER, K., CATEZ, F., CAYRE, M., 2003, Influence of testosterone on regulation of ODC, antizyme, and N1-SSAT gene expression in mouse kidney, *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 285 (3), F498-506.
223. TORRING, N., VINTER-JENSEN, L., PEDERSEN, S.B., SORENSEN, F.B., FLYVBJERG, A., NEXO, E., 1997, Systemic administration of insulin-like growth factor I (IGF-I) causes growth of the rat prostate, *Journal of Urology*, 158 (1), 222-227.
224. SHANTZ, L.M. and PEGG, A.E., 1998, Ornithine decarboxylase induction in transformation by H-Ras and RhoA, *Cancer Research*, 58 (13), 2748-2753.
225. SCHIPPER, R.G., DELI, G., DELOYER, P., LANGE, W.P., SCHALKEN, J.A., VERHOFSTAD, A.A., 2000, Antitumor activity of the polyamine analog N(1), N(11)-diethylnorspermine against human prostate carcinoma cells, *Prostate*, 44 (4), 313-321.
226. MOULINOX, J.P., QUEMENER, V., KHAN, N.A., 1991, Biological significance of circulating polyamines in oncology, *Cellular and Molecular Biology*, 37 (8), 773-783.
227. CLARK, R.B. and FAIR, W.R., 1975, The selective in vivo incorporation and metabolism of radioactive putrescine in the adult male rat, *Journal of Nuclear Medicine*, 16 (5), 337-342.
228. WANG, G.J., VOLKOW, N.D., WOLF, A.P., MADAJEWICZ, S., FOWLER, J.S., SCHLYER, D.J., MACGREGOR, R.R., 1994, Positron emission tomography study of human prostatic adenocarcinoma using carbon-11 putrescine, *Nuclear Medicine and Biology*, 21 (1), 77-82.
229. MARTON, L.J. and PEGG, A.E., 1995, Polyamines as targets for therapeutic intervention, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 35, 55-91.
230. EISEMAN, J.L., ROGERS, F.A., GUO, Y., KAUFFMAN, J., SENTZ, D.L., KLINGER, M.F., CALLERY, P.S., KYPRIANOU, N., 1998, Tumor-targeted apoptosis by a novel spermine analogue, 1,12-diaziridinyl-4,9-diazadodecane, results in therapeutic efficacy and enhanced radiosensitivity of human prostate cancer, *Cancer Research*, 58 (21), 4864-4870.

231. MCCLOSKEY, D.E., WOSTER, P.M., CASERO JR, R.A., DAVIDSON, N.E., 2000, Effects of the polyamine analogues N1-ethyl-N11-((cyclopropyl)methyl)-4,8-diazaundecane and N1-ethylN-11-((cycloheptyl)methyl)-4,8-diazaundecane in human prostate cancer cells, *Clinical Cancer Research*, 6 (1), 17-23.
232. KERR, J.F., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British Journal of Cancer*, 26 (4), 239-257.
233. ELLIS, R.E., YUAN, J.Y., HORVITZ, H.R., 1991, Mechanisms and functions of cell death, *Annual Review of Cell Biology*, 7, 663-698.
234. LETTRE, G. and HENGARTNER, M.O., 2006, Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7 (2), 97-108.
235. KUWANO, K. and HARA, N., 2000, Signal transduction pathways of apoptosis and inflammation induced by the tumor necrosis factor receptor family, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 22 (2), 147-149.
236. SHINTANI, T. and KLIONSKY, D.J., 2004, Autophagy in health and disease: a double-edged sword, *Science*, 306 (5698), 990-995.
237. CLARKE, P.G., 1990, Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms, *Anatomy and Embryology*, 181 (3), 195-213.
238. THORNBERRY, N.A., BULL, H.G., CALAYCAY, J.R., CHAPMAN, K.T., HOWARD, A.D., KOSTURA, M.J., MILLER, D.K., MOLINEAUX, S.M., WEIDNER, J.R., AUNINSET J., 1992, A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes, *Nature*, 356 (6372), 768-774.
239. GU, J., DONG, R.P., ZHANG, C., MCLAUGHLIN, D.F., WU, M.X., SCHLOSSMAN, S.F., 1999, Functional interaction of DFF35 and DFF45 with caspase-activated DNA fragmentation nuclease DFF40, *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (30), 20759-20762.
240. DEVERAUX, Q.L. and REED, J.C., 1999, IAP family proteins-suppressors of apoptosis, *Genes and Development*, 13 (3), 239-252.
241. GARCIA-CALVO, M., PETERSON, E.P., LEITING, B., RUEL, R., NICHOLSON, D.W., THORNBERRY, N.A., 1998, Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors, *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (49), 32608-32613.
242. STRASSER, A., 2005, The role of BH3-only proteins in the immune system, *Nature Reviews. Immunology*, 5 (3), 189-200.
243. GROSS, A., MCDONNELL, J.M., KORSMEYER, S.J., 1999, BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis, *Genes and Development*, 13 (15), 1899-1911.
244. SCHLESINGER, P.H., GROSS, A., YIN, X.M., YAMAMOTO, K., SAITO, M., WAKSMAN, G., KORSMEYER, S.J., 1997, Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (21), 11357-11362.
245. KASSIM, S.K., ALI, H.S., SALLAM, M.M., FAYED, S.T., SEADA, L.S., ABD-ELKAWY, E., SEADA, M.A., KHALIFA, A., 1999, Increased bcl-2

- expression is associated with primary resistance to chemotherapy in human epithelial ovarian cancer, *Clinical Biochemistry*, 32 (5), 333-338.
246. REAL, P.J., SIERRA, A., DE JUAN, A., SEGOVIA, J.C., LOPEZ-VEGA, J.M., FERNANDEZ-LUNA, J.L., 2002, Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells, *Oncogene*, 21 (50), 7611-7618.
 247. MUJOO, K., WATANABE, M., KHOKHAR, A.R., SIDDIK, Z.H., 2005, Increased sensitivity of a metastatic model of prostate cancer to a novel tetravalent platinum analog, *Prostate*, 62 (1), 91-100.
 248. JIANG, H., XIA, D., WU, L.J., CHEN, Z.D., 2011, Inhibition of Bcl-2 enhances the efficacy of epirubicin chemotherapy in PC-3 prostate cancer cells, *Chinese Medical Journal*, 124 (23), 4018-4021.
 249. ATZ, S.G., FISHER, J.K., CORRELL, M., BRONSON, R.T., LIGON, K.L., WALENSKY, L.D., 2012, Brain and testicular tumors in mice with progenitor cells lacking BAX and BAK, *Oncogene*, doi: 10.1038/onc.2012.421.
 250. LEE, W., KIM, K.Y., YU, S.N., KIM, S.H., CHUN, S.S., JI, J.H., YU, H.S., AHN, S.C., 2012, Piperonaline from Piper longum Linn. induces ROS-mediated apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430 (1), 406-412.
 251. CHEN, Y., MA, J., WANG, F., HU, J., CUI, A., WEI, C., YANG, Q., LI, F., 2012, Amygdalin induces apoptosis in human cervical cancer cell line hela cells, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 35 (1), 43-51.
 252. ZHANG, S., YE, J., ZHANG, Y., XU, X., LIU, J., ZHANG, S.H., KUNAPULI, S.P., DING, Z., 2013, P2y(12) protects platelets from apoptosis via pi3k-dependent bak/bax inactivation, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11 (1), 149-160.
 253. ZHAO, Y., LI, R., XIA, W., NEUZIL, J., LU, Y., ZHANG, H., ZHAO, X., ZHANG, X., SUN, C., WU, K., 2010, Bid integrates intrinsic and extrinsic signaling in apoptosis induced by alpha-tocopheryl succinate in human gastric carcinoma cells, *Cancer Letters*, 288 (1), 42-49.
 254. WANG, X., 2001, The expanding role of mitochondria in apoptosis, *Genes and Development*, 15 (22), 2922-2933.
 255. WURSTLE, M.L., LAUSSMANN, M.A., REHM, M., 2012, The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome, *Experimental Cell Rresearch*, 318 (11), 1213-1220.
 256. SCHULZE-OSTHOFF, K., FERRARI, D., LOS, M., WESSELBORG, S., PETER, M.E., 1998, Apoptosis signaling by death receptors, *European Journal of Biochemistry*, 254 (3), 439-459.
 257. ELMORE, S., 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicologic Pathology*, 35 (4), 495-516.
 258. TAIT, S.W. and GREEN, D.R., 2010, Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11 (9), 621-632.
 259. BODMER, J.L., SCHNEIDER, P., TSCHOPP, J., 2002, The molecular architecture of the tn timer superfamily, *Trends in Biochemical Sciences*, 27 (1), 19-26.

260. SARTORIUS, U., SCHMITZ, I., KRAMMER, P.H., 2001, Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis, *Chembiochem*, 2 (1), 20-29.
261. WALCZAK, H. and HAAS, T.L., 2008, Biochemical analysis of the native trail death-inducing signaling complex, *Methods in Molecular Biology*, 414, 221-239.
262. LACOUR, S., MICHEAU, O., HAMMANN, A., DROUINEAUD, V., TSCHOPP, J., SOLARY, E., DIMANCHE-BOITREL, M.T., 2003, Chemotherapy enhances tnfr-related apoptosis-inducing ligand disc assembly in ht29 human colon cancer cells, *Oncogene*, 22 (12), 1807-1816.
263. VAN HORSSSEN, R., TEN HAGEN, T.L., EGGERMONT, A.M., 2006, Tnf-alpha in cancer treatment: Molecular insights, antitumor effects, and clinical utility, *Oncologist*, 11 (4), 397-408.
264. PETTUS, B.J., CHALFANT, C.E., HANNUN, Y.A., 2002, Ceramide in apoptosis: An overview and current perspectives, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1585 (2-3), 114-125.
265. OREN, M. and ROTTER, V., 1999, Introduction: P53-the first twenty years, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55 (1), 9-11.
266. HOLLSTEIN, M., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B., HARRIS, C.C., 1991, P53 mutations in human cancers, *Science*, 253 (5015), 49-53.
267. LEVINE, A.J., MOMAND, J., FINLAY, C.A., 1991, The p53 tumour suppressor gene, *Nature*, 351 (6326), 453-456.
268. MIRZA, A., WU, Q., WANG, L., MCCLANAHAN, T., BISHOP, W.R., GHEYAS, F., DING, W., HUTCHINS, B., HOCKENBERRY, T., KIRSCHMEIER, P., GREENE, J.R., LIU, S., 2003, Global transcriptional program of p53 target genes during the process of apoptosis and cell cycle progression, *Oncogene*, 22 (23), 3645-3654.
269. FRIDMAN, J.S. and LOWE, S.W., 2003, Control of apoptosis by p53, *Oncogene*, 22 (56), 9030-9040.
270. MIYASHITA, T. and REED, J.C., 1995, Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene, *Cell*, 80 (2), 293-299.
271. CECCONI, F., ALVAREZ-BOLADO, G., MEYER, B.I., ROTH, K.A., GRUSS, P., 1998, Apaf1 (ced-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development, *Cell*, 94 (6), 727-737.
272. THORNBORROW, E.C., PATEL, S., MASTROPIETRO, A.E., SCHWARTZFARB, E.M., MANFREDI, J.J., 2002, A conserved intronic response element mediates direct p53-dependent transcriptional activation of both the human and murine bax genes, *Oncogene*, 21 (7), 990-999.
273. SYMONDS, H., KRALL, L., REMINGTON, L., SAENZ-ROBLES, M., LOWE, S., JACKS, T., VAN DYKE, T., 1994, P53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo, *Cell*, 78 (4), 703-711.
274. ZHANG, L., YU, J., PARK, B.H., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B., 2000, Role of bax in the apoptotic response to anticancer agents, *Science*, 290 (5493), 989-992.
275. SHEIKH, M.S., BURNS, T.F., HUANG, Y., WU, G.S., AMUNDSON, S., BROOKS, K.S., FORNACE, A.J., JR., EL-DEIRY, W.S., 1998, P53-dependent and -independent regulation of the death receptor killer/dr5 gene expression in

- response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha, *Cancer Research*, 58 (8), 1593-1598
276. LIU, X., YUE, P., KHURI, F.R., SUN, S.Y., 2004, p53 upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site, *Cancer Research*, 64 (15), 5078-5083.
 277. MIHARA, M., ERSTER, S., ZAIKA, A., PETRENKO, O., CHITTENDEN, T., PANCOSKA, P., MOLL, U.M., 2003, P53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria, *Molecular Cell*, 11 (3), 577-590.
 278. KUBBUTAT, M.H., JONES, S.N., VOUSDEN, K.H., 1997, Regulation of p53 stability by Mdm2, *Nature*, 387 (6630), 299-303.
 279. HAUPT, Y., MAYA, R., KAZAZ, A., OREN, M., 1997, Mdm2 promotes the rapid degradation of p53, *Nature*, 387 (6630), 296-299.
 280. MITCHELL, J.W., MANDAVA, N., WORLEY, J.F., PLIMMER, J.R., SMITH, M.V., 1970, Brassins: A new family of plant hormones from rape pollen, *Nature*, 225 (5237), 1065-1066.
 281. EPHRITIKHINE, G., FELLNER, M., VANNINI, C., LAPOUS, D., BARBIER-BRYGOO, H., 1999, The sax1 dwarf mutant of arabidopsis thaliana shows altered sensitivity of growth responses to abscisic acid, auxin, gibberellins and ethylene and is partially rescued by exogenous brassinosteroid, *Plant Journal*, 18 (3), 303-314.
 282. ARTECA, R.N. and ARTECA, J.M., 2008, Effects of brassinosteroid, auxin, and cytokinin on ethylene production in arabidopsis thaliana plants, *Journal of Experimental Botany*, 59 (11), 3019-3026.
 283. CLOUSE, S.D. and SASSE, J.M., 1998, Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 427-451.
 284. CLOUSE, S.D., LANGFORD, M., MCMORRIS, T.C., 1996, A brassinosteroid-insensitive mutant in arabidopsis thaliana exhibits multiple defects in growth and development, *Plant Physiology*, 111 (3), 671-678.
 285. NOGUCHI, T., FUJIOKA, S., CHOE, S., TAKATSUTO, S., YOSHIDA, S., YUAN, H., FELDMANN, K.A., TAX, F.E., 1999, Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of arabidopsis accumulate brassinosteroids, *Plant Physiology*, 121 (3), 743-752.
 286. ASAMI, T., NAKANO, T., FUJIOKA, S., 2005, Plant brassinosteroid hormones, *Vitamins and hormones*, 72, 479-504.
 287. CLOUSE, S.D., 1996, Plant hormones: Brassinosteroids in the spotlight, *Current Biology*, 6 (6), 658-661.
 288. MUSSIG, C. and ALTMANN, T., 2001, Brassinosteroid signaling in plants, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 12 (9), 398-402.
 289. THOMPSON, M.J., MEUDT, W.J., MANDAVA, N.B., DUTKY, S.R., LUSBY, W.R., SPAULDING, D.W., 1982, Synthesis of brassinosteroids and relationship of structure to plant growth-promoting effects, *Steroids*, 39 (1), 89-105.
 290. SAKAMOTO, T., 2006, Phytohormones and rice crop yield: Strategies and opportunities for genetic improvement, *Transgenic Research*, 15 (4), 399-404.

291. KRISHNA, P., 2003, Brassinosteroid-mediated stress responses, *Journal of Plant Growth Regulators*, 22 (4), 289-297.
292. SHARMA, I., PATI, P.K., BHARDWAJ, R., 2010, Regulation of growth and antioxidant enzyme activities by 28-homobrassinolide in seedlings of *Raphanus sativus* L. Under cadmium stress, *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 47 (3), 172-177.
293. YUAN, L., SHU, S., SUN, J., GUO, S., TEZUKA, T., 2012, Effects of 24-epibrassinolide on the photosynthetic characteristics, antioxidant system, and chloroplast ultrastructure in *Cucumis sativus* L. Under $\text{Ca(NO}_3)_2$ stress, *Photosynthesis Research*, 112 (3), 205-214.
294. CATTEROU, M., DUBOIS, F., SCHALLER, H., AUBANELLE, L., VILCOT, B., SANGWAN-NORREEL, B.S., SANGWAN, R.S., 2001, Brassinosteroids, microtubules and cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. I. Molecular, cellular and physiological characterization of the *Arabidopsis* bull mutant, defective in the $\Delta 7$ -sterol- C_5 -desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis, *Planta*, 212 (5-6), 659-672.
295. SASSE, J.M., 2003, Physiological actions of brassinosteroids: An update, *Journal of Plant Growth Regulators*, 22 (4), 276-288.
296. KANWAR, M.K., BHARDWAJ, R., ARORA, P., CHOWDHARY, S.P., SHARMA, P., KUMAR, S., 2012, Plant steroid hormones produced under Ni stress are involved in the regulation of metal uptake and oxidative stress in *Brassica juncea* L, *Chemosphere*, 86 (1), 41-49.
297. HASAN, S.A., HAYAT, S., ALI, B., AHMAD, A., 2008, 28-homobrassinolide protects chickpea (*Cicer arietinum*) from cadmium toxicity by stimulating antioxidants, *Environmental Pollution*, 151 (1), 60-66.
298. NAKASHITA, H., YASUDA, M., NITTA, T., ASAMI, T., FUJIOKA, S., ARAI, Y., SEKIMATA, K., TAKATSUTO, S., YAMAGUCHI, I., YOSHIDA, S., 2003, Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice, *Plant Journal*, 33 (5), 887-898.
299. ROMANUTTI, C., CASTILLA, V., COTO, C.E., WACHSMAN, M.B., 2007, Antiviral effect of a synthetic brassinosteroid on the replication of vesicular stomatitis virus in vero cells, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29 (3), 311-316.
300. SLAVIKOVA, B., KOHOUT, L., BUDESINSKY, M., SWACZYNOVA, J., KASAL, A., 2008, Brassinosteroids: Synthesis and activity of some fluoro analogues, *Journal of Medicinal Chemistry*, 51 (13), 3979-3984.
301. DAVISON, G.P., RESTREPO, R., MARTINEZ, G., COLL, F., LEON, O.S., 2003, Effects of a brassinosteroid analogue on mosquito larvae, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56 (3), 419-424.
302. DECOMBEL, L., TIRRY, L., SMAGGHE, G., 2005, Action of 24-epibrassinolide on a cell line of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 58 (3), 145-156.
303. WACHSMAN, M.B., LOPEZ, E.M., RAMIREZ, J.A., GALAGOVSKY, L.R., COTO, C.E., 2000, Antiviral effect of brassinosteroids against herpes virus and arenaviruses, *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 11 (1), 71-77.
304. WACHSMAN, M.B., CASTILLA, V., TALARICO, L.B., RAMIREZ, J.A., GALAGOVSKY, L.R., COTO, C.E., 2004, Antiherpetic mode of action of

- (22s,23s)-3beta-bromo-5alpha,22,23-trihydroxystigmastan-6-one in vitro, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23 (5), 524-526.
305. MICHELINI, F.M., RAMIREZ, J.A., BERRA, A., GALAGOVSKY, L.R., ALCHE, L.E., 2004, In vitro and in vivo antiherpetic activity of three new synthetic brassinosteroid analogues, *Steroids*, 69 (11-12), 713-720.
 306. SCHALLER, H., 2003, The role of sterols in plant growth and development, *Progress in Lipid Research*, 42 (3), 163-175.
 307. ZUREK, D.M. and CLOUSE, S.D., 1994, Molecular cloning and characterization of a brassinosteroid-regulated gene from elongating soybean (glycine max l.) epicotyls, *Plant Physiology*, 104 (1), 161-170.
 308. GODA, H., SHIMADA, Y., ASAMI, T., FUJIOKA, S., YOSHIDA, S., 2002, Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in arabidopsis, *Plant Physiology*, 130 (3), 1319-1334.
 309. VERT, G. and CHORY, J., 2006, Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling, *Nature*, 441 (7089), 96-100.
 310. ZHANG, Z., RAMIREZ, J., REBOUTIER, D., BRAULT, M., TROUVERIE, J., PENNARUN, A.M., AMIAR, Z., BILIGUI, B., GALAGOVSKY, L., RONA, J.P., 2005, Brassinosteroids regulate plasma membrane anion channels in addition to proton pumps during expansion of arabidopsis thaliana cells, *Plant Cell Physiology*, 46 (9), 1494-1504.
 311. XIA, X.J., HUANG, L.F., ZHOU, Y.H., MAO, W.H., SHI, K., WU, J.X., ASAMI, T., CHEN, Z., YU, J.Q., 2009, Brassinosteroids promote photosynthesis and growth by enhancing activation of rubisco and expression of photosynthetic genes in cucumis sativus, *Planta*, 230 (6), 1185-1196.
 312. ROBERTS, K. and MCCANN, M.C., 2000, Xylogenesis: The birth of a corpse, *Current Opinion in Plant Biology*, 3 (6), 517-522.
 313. VOIGT, B., WHITING, P., DINAN, L., 2001, The ecdysteroid agonist/antagonist and brassinosteroid-like activities of synthetic brassinosteroid/ecdysteroid hybrid molecules, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58 (8), 1133-1140.
 314. LI, J., WEN, J., LEASE, K.A., DOKE, J.T., TAX, F.E., WALKER, J.C., 2002, Bak1, an arabidopsis lrr receptor-like protein kinase, interacts with bri1 and modulates brassinosteroid signaling, *Cell*, 110 (2), 213-222.
 315. NAM, K.H. and LI, J., 2002, Bri1/bak1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling, *Cell*, 110 (2), 203-212.
 316. RUSSINOVA, E., BORST, J.W., KWAAITAAL, M., CANO-DELGADO, A., YIN, Y., CHORY, J., DE VRIES, S.C., 2004, Heterodimerization and endocytosis of arabidopsis brassinosteroid receptors bri1 and atserk3 (bak1), *Plant Cell*, 16 (12), 3216-3229.
 317. WANG, Z.Y., NAKANO, T., GENDRON, J., HE, J., CHEN, M., VAFEADOS, D., YANG, Y., FUJIOKA, S., YOSHIDA, S., ASAMI, T., CHORY, J., 2002, Nuclear-localized bzl1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis, *Developmental Cell*, 2 (4), 505-513.
 318. YIN, Y., WANG, Z.Y., MORA-GARCIA, S., LI, J., YOSHIDA, S., ASAMI, T., CHORY, J., 2002, Bes1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation, *Cell*, 109 (2), 181-191.

319. ZHAO, J., PENG, P., SCHMITZ, R.J., DECKER, A.D., TAX, F.E., LI, J., 2002, Two putative bin2 substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling, *Plant Physiology*, 130 (3), 1221-1229.
320. HE, J.X., GENDRON, J.M., SUN, Y., GAMPALA, S.S., GENDRON, N., SUN, C.Q., WANG, Z.Y., 2005, Bzr1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses, *Science*, 307 (5715), 1634-1638.
321. MORA-GARCIA, S., VERT, G., YIN, Y., CANO-DELGADO, A., CHEONG, H., CHORY, J., 2004, Nuclear protein phosphatases with kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in arabidopsis, *Genes and Development*, 18 (4), 448-460.
322. KOKA, C.V., CERNY, R.E., GARDNER, R.G., NOGUCHI, T., FUJIOKA, S., TAKATSUTO, S., YOSHIDA, S., CLOUSE, S.D., 2000, A putative role for the tomato genes dumpy and curl-3 in brassinosteroid biosynthesis and response, *Plant Physiology*, 122 (1), 85-98.
323. HU, Y., BAO, F., LI, J., 2000, Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct cycd3-induction pathway in arabidopsis, *Plant Journal*, 24 (5), 693-701.
324. JIANG, J. and CLOUSE, S.D., 2001, Expression of a plant gene with sequence similarity to animal tgf-beta receptor interacting protein is regulated by brassinosteroids and required for normal plant development, *Plant Journal*, 26 (1), 35-45.
325. FUJIOKA, S., NOGUCHI, T., YOKOTA, T., TAKATSUTO, S., YOSHIDA, S., 1998, Brassinosteroids in arabidopsis thaliana, *Phytochemistry*, 48 (4), 595-599.
326. ADAM, G., SCHMIDT, J., SCHNEIDER, B., 1999, Brassinosteroids, *Progress in The Chemistry of Organic Natural Products*, 78, 1-46.
327. BEZRUKOVA, M.V., AVAL'BAEV, A.M., KIL'DIBEKOVA, A.R., FATKHUTDINOVA, R.A., SHAKIROVA, F.M., 2002, Interaction of wheat lectin with 24-epibrassinolide in the regulation of cell division in wheat roots, *Doklady Biological Sciences*, 387, 533-535.
328. HOWELL, W.M., KELLER, G.E., KIRKPATRICK, J.D., JENKINS, R.L., HUNSINGER, R.N., MCLAUGHLIN, E.W., 2007, Effects of the plant steroidal hormone, 24-epibrassinolide, on the mitotic index and growth of onion (allium cepa) root tips, *Genetics and Molecular Research*, 6 (1), 50-58.
329. CHOUDHARY, S.P., BHARDWAJ, R., GUPTA, B.D., DUTT, P., GUPTA, R.K., BIONDI, S., KANWAR, M., 2010, Epibrassinolide induces changes in indole-3-acetic acid, abscisic acid and polyamine concentrations and enhances antioxidant potential of radish seedlings under copper stress, *Physiologia Plantarum*, 140 (3), 280-296.
330. CHOUDHARY, S.P., KANWAR, M., BHARDWAJ, R., GUPTA, B.D., GUPTA, R.K., 2011, Epibrassinolide ameliorates cr (vi) stress via influencing the levels of indole-3-acetic acid, abscisic acid, polyamines and antioxidant system of radish seedlings, *Chemosphere*, 84 (5), 592-600.
331. NAKAMURA, K., BINDOKAS, V.P., MARKS, J.D., WRIGHT, D.A., FRIM, D.M., MILLER, R.J., KANG, U.J., 2000, The selective toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium to dopaminergic neurons: The role of mitochondrial complex i

- and reactive oxygen species revisited. *Molecular Pharmacology*, 58 (2), 271-278.
332. CARANGE, J., LONGPRE, F., DAOUST, B., MARTINOLI, M.G., 2011, 24-epibrassinolide, a phytosterol from the brassinosteroid family, protects dopaminergic cells against mpp-induced oxidative stress and apoptosis, *Journal of Toxicology*, doi: 10.1155/2011/392859.
 333. RAROVA, L., ZAHLER, S., LIEBL, J., KRYSTOF, V., SEDLAK, D., BARTUNEK, P., KOHOUT, L., STRNAD, M., 2012, Brassinosteroids inhibit in vitro angiogenesis in human endothelial cells, *Steroids*, 77 (13), 1502-1509.
 334. BRADFORD, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
 335. PFAFFL, M.W., 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Research*, 29 (9), 45.
 336. ROSS, K.S., CARTER, H.B., PEARSON, J.D., GUESS, H.A., 2000, Comparative efficiency of prostate-specific antigen screening strategies for prostate cancer detection, *The Journal of the American Medical Association*, 284 (11), 1399-1405.
 337. SENANAYAKE, M.D., AMUNUGAMA, H., BONCHER, T.D., CASERO, R.A., WOSTER, P.M., 2009, Design of polyamine-based therapeutic agents: New targets and new directions, *Essays in Biochemistry*, 46, 77-94.
 338. IGARASHI, K., 1993, Role of polyamines in cell proliferation and differentiation, *Journal of Japanese Biochemical Society*, 65 (2), 86-104.
 339. LAUKAITIS, C.M. and GERNER, E.W., 2011, Dfmo: Targeted risk reduction therapy for colorectal neoplasia, *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 25 (4-5), 495-506.
 340. BACHMANN, A.S., 2004, The role of polyamines in human cancer: Prospects for drug combination therapies, *Hawaii Medical Journal*, 63 (12), 371-374.
 341. KAWAKITA, M., HIRAMATSU, K., SUGIMOTO, M., TAKAHASHI, K., TOI, M., 2004, Clinical usefulness of urinary diacetylpolyamines as novel tumor markers, *The Japanese Journal of Clinical Pathology*, 52 (4), 321-327.
 342. CIPOLLA, B.G., ZIADE, J., BANSARD, J.Y., MOULINOX, J.P., STAERMAN, F., QUEMENER, V., LOBEL, B., GUILLE, F., 1996, Pretherapeutic erythrocyte polyamine spermine levels discriminate high risk relapsing patients with m1 prostate carcinoma, *Cancer*, 78 (5), 1055-1065.
 343. RAJ, K.P., ZELL, J.A., ROCK, C.L., MCLAREN, C.E., ZOUMAS-MORSE, C., GERNER, E.W., MEYSKENS, F.L., 2013, Role of dietary polyamines in a phase iii clinical trial of difluoromethylornithine (dfmo) and sulindac for prevention of sporadic colorectal adenomas, *British Journal of Cancer*, 108 (3), 512-518.
 344. FARRIOL, M., SEGOVIA-SILVESTRE, T., VENEREO, Y., ORTA, X., 2000, Polyamines in the gastrointestinal tract, *Nutrición hospitalaria*, 15 (3), 85-91.
 345. NOWOTARSKI, S.L., WOSTER, P.M., CASERO, R.A., 2013, Polyamines and cancer: Implications for chemotherapy and chemoprevention, *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 15, doi: 10.1017/erm.2013.3.

346. ALARCON, R.A., 2012, Anticancer system created by acrolein and hydroxyl radical generated in enzymatic oxidation of spermine and other biochemical reactions. *Medical Hypotheses*, 79 (4), 522-530.
347. AGOSTINELLI, E., ARANCIA, G., VEDOVA, L.D., BELLI, F., MARRA, M., SALVI, M., TONINELLO, A., 2004, The biological functions of polyamine oxidation products by amine oxidases: Perspectives of clinical applications, *Amino Acids*, 27 (3-4), 347-358.
348. HAHM, H.A., ETTINGER, D.S., BOWLING, K., HOKER, B., CHEN, T.L., ZABELINA, Y., CASERO, R.A., JR., 2002, Phase I study of n(1),n(11)-diethylnorspermine in patients with non-small cell lung cancer, *Clinical Cancer Research*, 8 (3), 684-690.
349. ALLEN, W.L., MCLEAN, E.G., BOYER, J., MCCULLA, A., WILSON, P.M., COYLE, V., LONGLEY, D.B., CASERO, R.A., JR., JOHNSTON, P.G., 2007, The role of spermidine/spermine n1-acetyltransferase in determining response to chemotherapeutic agents in colorectal cancer cells, *Molecular Cancer Therapy*, 6 (1), 128-137.
350. ZHANG, J.L., TIAN, H.Y., LI, J., JIN, L., LUO, C., YE, W.C., JIANG, R.W., 2012, Steroids with inhibitory activity against the prostate cancer cells and chemical diversity of marine alga *tydemania expeditionis*, *Fitoterapia*, 83 (5), 973-978.
351. MEDIAVILLA-VARELA, M., PACHECO, F.J., ALMAGUEL, F., PEREZ, J., SAHAKIAN, E., DANIELS, T.R., LEOH, L.S., PADILLA, A., WALL, N.R., LILLY, M.B., DE LEON, M., CASIANO, C.A., 2009, Docetaxel-induced prostate cancer cell death involves concomitant activation of caspase and lysosomal pathways and is attenuated by ledgf/p75, *Molecular Cancer*, 8, 68.
352. HWANG, J.J., KIM, Y.S., KIM, M.J., KIM, D.E., JEONG, I.G., KIM, C.S., 2010, Histone deacetylase inhibitor potentiates anticancer effect of docetaxel via modulation of bcl-2 family proteins and tubulin in hormone refractory prostate cancer cells, *Journal of Urology*, 184 (6), 2557-2564.
353. TEHRANIAN, N., SEPEHRI, H., MEHDIPOUR, P., BIRAMIJAMAL, F., HOSSEIN-NEZHAD, A., SARRAFNEJAD, A., HAJIZADEH, E., 2012, Combination effect of pectasol and doxorubicin on viability, cell cycle arrest and apoptosis in du-145 and Incap prostate cancer cell lines, *Cell Biology International*, 36 (7), 601-610.
354. GUPTA, S., KASS, G.E., SZEGEZDI, E., JOSEPH, B., 2009, The mitochondrial death pathway: A promising therapeutic target in diseases, *Journal of Cellular and Molecular Medecine*, 13 (6), 1004-1033.
355. KULIKOV, A.V., SHILOV, E.S., MUFAZALOV, I.A., GOGVADZE, V., NEDOSPASOV, S.A., ZHIVOTOVSKY, B., 2012, Cytochrome c: The achilles' heel in apoptosis, *Cellular and Molecular Life Sciences* 69 (11), 1787-1797.
356. KUMI-DIAKA, J., SANDERSON, N.A., HALL, A., 2000, The mediating role of caspase-3 protease in the intracellular mechanism of genistein-induced apoptosis in human prostatic carcinoma cell lines, du145 and Incap, *Biology of The Cell*, 92 (8-9), 595-604.
357. HSU, A., BRAY, T.M., HELFERICH, W.G., DOERGE, D.R., HO, E., 2010, Differential effects of whole soy extract and soy isoflavones on apoptosis in prostate cancer cells, *Experimental Biology and Medicine*, 235 (1), 90-97.

358. BALDIN, V., LUKAS, J., MARCOTE, M.J., PAGANO, M., DRAETTA, G., 1993, Cyclin d1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in g1, *Genes and Development*, 7 (5), 812-821.
359. WOLTER, F., AKOGLU, B., CLAUSNITZER, A., STEIN, J., 2001, Downregulation of the cyclin d1/cdk4 complex occurs during resveratrol-induced cell cycle arrest in colon cancer cell lines, *The Journal of Nutrition*, 131 (8), 2197-2203.
360. CARLSON, B., LAHUSEN, T., SINGH, S., LOAIZA-PEREZ, A., WORLAND, P.J., PESTELL, R., ALBANESE, C., SAUSVILLE, E.A., SENDEROWICZ, A.M., 1999, Down-regulation of cyclin d1 by transcriptional repression in mcf-7 human breast carcinoma cells induced by flavopiridol, *Cancer Research*, 59 (18), 4634-4641.
361. BENDRIS, N., LEMMERS, B., BLANCHARD, J.M., ARSIC, N., 2011, Cyclin a2 mutagenesis analysis: A new insight into cdk activation and cellular localization requirements. *PLoS One*, 6 (7), e22879.
362. HENGLEIN, B., CHENIVESSE, X., WANG, J., EICK, D., BRECHOT, C., 1994, Structure and cell cycle-regulated transcription of the human cyclin a gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91 (12), 5490-5494.
363. JEFFREY, P.D., RUSSO, A.A., POLYAK, K., GIBBS, E., HURWITZ, J., MASSAGUE, J., PAVLETICH, N.P., 1995, Mechanism of cdk activation revealed by the structure of a cyclina-cdk2 complex, *Nature*, 376 (6538), 313-320.
364. NAGATA, D., SUZUKI, E., NISHIMATSU, H., YOSHIZUMI, M., MANO, T., WALSH, K., SATA, M., KAKOKI, M., GOTO, A., OMATA, M., HIRATA, Y., 2000, Cyclin a downregulation and p21(cip1) upregulation correlate with gata-6-induced growth arrest in glomerular mesangial cells, *Circulation Research*, 87 (8), 699-704.
365. YOON, M.K., MITREA, D.M., OU, L., KRIWACKI, R.W., 2012, Cell cycle regulation by the intrinsically disordered proteins p21 and p27, *Biochemical Society Transactions*, 40 (5), 981-988.
366. DETJEN, K.M., MURPHY, D., WELZEL, M., FARWIG, K., WIEDENMANN, B., ROSEWICZ, S., 2003, Downregulation of p21(waf/cip-1) mediates apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells in response to interferon-gamma, *Experimental Cell Research*, 282 (2), 78-89.
367. SHERR, C.J. and ROBERTS, J.M., 1995, Inhibitors of mammalian g1 cyclin-dependent kinases, *Genes and Development*, 9 (10), 1149-1163.
368. BOHNKE, A., WESTPHAL, F., SCHMIDT, A., EL-AWADY, R.A., DAHM-DAPHI, J., 2004, Role of p53 mutations, protein function and DNA damage for the radiosensitivity of human tumour cells, *International Journal of Radiation Biology*, 80 (1), 53-63.
369. SAYEED, A., KONDURI, S.D., LIU, W., BANSAL, S., LI, F., DAS, G.M., 2007, Estrogen receptor alpha inhibits p53-mediated transcriptional repression: Implications for the regulation of apoptosis, *Cancer Research*, 67 (16), 7746-7755.

370. MANDAL, S., MANDAL, A., JOHANSSON, H.E., ORJALO, A.V., PARK, M.H., 2013, Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (6), 2169-2174..
371. HUANG, Y., PLEDGIE, A., CASERO, R.A., JR., DAVIDSON, N.E., 2005, Molecular mechanisms of polyamine analogs in cancer cells, *Anticancer Drugs*, 16 (3), 229-241.
372. WARRELL, R.P., JR. and BURCHENAL, J.H., 1983, Methylglyoxal-bis(guanylhydrazone) (methyl-gag): Current status and future prospects, *Journal of Clinical Oncology*, 1 (1), 52-65.
373. POULIN, R., PELLETIER, G., PEGG, A.E., 1995, Induction of apoptosis by excessive polyamine accumulation in ornithine decarboxylase-overproducing 11210 cells, *The Biochemical Journal*, 311 (3), 723-727.
374. CASERO, R.A., WANG, Y., STEWART, T.M., DEVEREUX, W., HACKER, A., WANG, Y., SMITH, R., WOSTER, P.M., 2003, The role of polyamine catabolism in anti-tumour drug response, *Biochemical Society Transactions*, 31 (2), 361-365.
375. PAZ, E.A., GARCIA-HUIDOBRO, J., IGNATENKOS, N.A., 2011, Polyamines in cancer, *Advances in Clinical Chemistry*, 54, 45-70.
376. KAHANA, C., 2009, Regulation of cellular polyamine levels and cellular proliferation by antizyme and antizyme inhibitor, *Essays in Biochemistry*, 46, 47-61.
377. OLSEN, R.R. and ZETTER, B.R., 2011, Evidence of a role for antizyme and antizyme inhibitor as regulators of human cancer, *Molecular Cancer Research*, 9 (10), 1285-1293.
378. OLSEN, R.R., CHUNG, I., ZETTER, B.R., 2012, Knockdown of antizyme inhibitor decreases prostate tumor growth in vivo, *Amino Acids*, 42 (2-3), 549-558.
379. PERSSON, L., 2009, Polyamine homeostasis, *Essays in Biochemistry*, 46, 11-24.
380. THOMAS, T. and THOMAS, T.J., 2001, Polyamines in cell growth and cell death: Molecular mechanisms and therapeutic applications, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58 (2), 244-258.
381. ARISAN, E.D., COKER, A., PALAVAN-UNSAL, N., 2012, Polyamine depletion enhances the roscovitine-induced apoptosis through the activation of mitochondria in hct116 colon carcinoma cells, *Amino Acids*, 42 (2-3), 655-665.
382. COKER, A., ARISAN, E.D., PALAVAN-UNSAL, N., 2012, Silencing of the polyamine catabolic key enzyme ssat prevents cdk inhibitor-induced apoptosis in caco-2 colon cancer cells, *Molecular Medicine Reports*, 5 (4), 1037-1042.
383. DAI, H., KRAMER, D.L., YANG, C., MURTI, K.G., PORTER, C.W., CLEVELAND, J.L., 1999, The polyamine oxidase inhibitor mdl-72,527 selectively induces apoptosis of transformed hematopoietic cells through lysosomotropic effects, *Cancer Research*, 59 (19), 4944-4954.
384. DURANTON, B., HOLL, V., SCHNEIDER, Y., CARNESECCHI, S., GOSSE, F., RAUL, F., SEILER, N., 2002, Cytotoxic effects of the polyamine oxidase

- inactivator mdl 72527 to two human colon carcinoma cell lines sw480 and sw620, *Cell Biology and Toxicology*, 18 (6), 381-396.
385. TIAN, Y., WANG, S., WANG, B., ZHANG, J., JIANG, R., ZHANG, W., 2012, Overexpression of ssat by denspm treatment induces cell detachment and apoptosis in glioblastoma, *Oncology Reports*, 27 (4), 1227-1232.
 386. BABBAR, N., MURRAY-STEWART, T., CASERO, R.A., JR., 2007, Inflammation and polyamine catabolism: The good, the bad and the ugly *Biochemical Society Transactions*, 35 (2), 300-304.
 387. CHATURVEDI, R., CHENG, Y., ASIM, M., BUSSIÈRE, F.I., XU, H., GOBERT, A.P., HACKER, A., CASERO, R.A., JR., WILSON, K.T., 2004, Induction of polyamine oxidase 1 by helicobacter pylori causes macrophage apoptosis by hydrogen peroxide release and mitochondrial membrane depolarization, *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (38), 40161-40173.
 388. BASU, H.S., THOMPSON, T.A., CHURCH, D.R., CLOWER, C.C., MEHRAEIN-GHOMI, F., AMLONG, C.A., MARTIN, C.T., WOSTER, P.M., LINDSTROM, M.J., WILDING, G., 2009, A small molecule polyamine oxidase inhibitor blocks androgen-induced oxidative stress and delays prostate cancer progression in the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model, *Cancer Research*, 69 (19), 7689-7695.
 389. DE MATTEI, M., GAGLIANO, N., MOSCHENI, C., DELLAVIA, C., CALASTRINI, C., PELLATI, A., GIOIA, M., CARUSO, A., STABELLINI, G., 2005, Changes in polyamines, c-myc and c-fos gene expression in osteoblast-like cells exposed to pulsed electromagnetic fields, *Bioelectromagnetics*, 26 (3), 207-214.
 390. DE CARVALHO, J.T., JR., DALBONI, M.A., WATANABE, R., PERES, A.T., GOES, M.A., MANFREDI, S.R., CANZIANI, M.E., CENDOROGLO, G.S., GUIMARAES-SOUZA, N., BATISTA, M.C., CENDOROGLO, M., 2011, Effects of spermidine and p-cresol on polymorphonuclear cell apoptosis and function, *Artif Organs*, 35 (2), 27-32.
 391. EISENBERG, T., KNAUER, H., SCHAUER, A., BUTTNER, S., RUCKENSTUHL, C., CARMONA-GUTIERREZ, D., RING, J., SCHROEDER, S., MAGNES, C., ANTONACCI, L., FUSSI, H., DESZCZ, L., HARTL, R., SCHRAML, E., CRIOLLO, A., MEGALOU, E., WEISKOPF, D., LAUN, P., HEEREN, G., BREITENBACH, M., GRUBECK-LOEBENSTEIN, B., HERKER, E., FAHRENKROG, B., FROHLICH, K.U., SINNER, F., TAVERNARAKIS, N., MINOIS, N., KROEMER, G., MADEO, F., 2009, Induction of autophagy by spermidine promotes longevity, *Nature Cell Biology* 11 (11), 1305-1314.
 392. RAMOT, Y., TIEDE, S., BIRO, T., ABU BAKAR, M.H., SUGAWARA, K., PHILPOTT, M.P., HARRISON, W., PIETILA, M., PAUS, R., 2011, Spermidine promotes human hair growth and is a novel modulator of human epithelial stem cell functions, *PLoS One*, 6 (7), e22564.
 393. GOZUACIK, D. and KIMCHI, A., 2007, Autophagy and cell death, *Current Topics in Developmental Biology*, 78, 217-245.
 394. GOZUACIK, D. and KIMCHI, A., 2004, Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism, *Oncogene*, 23 (16), 2891-2906.

395. DE CARVALHO, J.T., JR., DALBONI, M.A., WATANABE, R., PERES, A.T., GOES, M.A., MANFREDI, S.R., CANZIANI, M.E., CENDOROGLO, G.S., GUIMARAES-SOUZA, N., BATISTA, M.C., CENDOROGLO, M., 2010, Effects of spermidine and p-cresol on polymorphonuclear cell apoptosis and function, *Artif Organs*, 35 (2), 27-32.
396. AGOSTINELLI, E., TEMPERA, G., MOLINARI, A., SALVI, M., BATTAGLIA, V., TONINELLO, A., ARANCIA, G., 2007, The physiological role of biogenic amines redox reactions in mitochondria. New perspectives in cancer therapy, *Amino Acids*, 33 (2), 175-187.
397. AGOSTINELLI, E., TEMPERA, G., DALLA VEDOVA, L., CONDELLO, M., ARANCIA, G., 2007, Mdl 72527 and spermine oxidation products induce a lysosomotropic effect and mitochondrial alterations in tumour cells, *Biochemical Society Transactions*, 35 (2), 343-348.
398. AGOSTINELLI, E. and SEILER, N., 2007, Lysosomotropic compounds and spermine enzymatic oxidation products in cancer therapy, *International Journal of Oncology*, 31 (3), 473-484.
399. MARRA, M., LOMBARDI, A., AGOSTINELLI, E., GIUBERTI, G., ZAPPAVIGNA, S., TEMPERA, G., VITALE, G., BIFULCO, M., ABBRUZZESE, A., CARAGLIA, M., 2008, Bovine serum amine oxidase and spm potentiate docetaxel and interferon-alpha effects in inducing apoptosis on human cancer cells through the generation of oxidative stress, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783 (12), 2269-2278.
400. MARRA, M., AGOSTINELLI, E., TEMPERA, G., LOMBARDI, A., MEO, G., BUDILLON, A., ABBRUZZESE, A., GIUBERTI, G., CARAGLIA, M., 2007, Anticancer drugs and hyperthermia enhance cytotoxicity induced by polyamine enzymatic oxidation products, *Amino Acids*, 33 (2), 273-281.
401. LORENZO, P.I. and SAATCIOGLU, F., 2008, Inhibition of apoptosis in prostate cancer cells by androgens is mediated through downregulation of c-jun n-terminal kinase activation, *Neoplasia*, 10 (5), 418-428.
402. KOKONTIS, J.M., HAY, N., LIAO, S., 1998, Progression of Incap prostate tumor cells during androgen deprivation: Hormone-independent growth, repression of proliferation by androgen, and role for p27kip1 in androgen-induced cell cycle arrest, *Molecular Endocrinology*, 12 (7), 941-953.
403. ATTAR, R.M., JURE-KUNKEL, M., BALOG, A., CVIJIC, M.E., DELL-JOHN, J., RIZZO, C.A., SCHWEIZER, L., SPIRES, T.E., PLATERO, J.S., OBERMEIER, M., SHAN, W., SALVATI, M.E., FOSTER, W.R., DINCHUK, J., CHEN, S.J., VITE, G., KRAMER, R., GOTTARDIS, M.M., 2009, Discovery of bms-641988, a novel and potent inhibitor of androgen receptor signaling for the treatment of prostate cancer, *Cancer Research*, 69 (16), 6522-6530.
404. TOWNSEND, P.A., STEPHANOU, A., PACKHAM, G., LATCHMAN, D.S., 2005, Bag-1: A multi-functional pro-survival molecule, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37 (2), 251-259.
405. TOWNSEND, P.A., DUBLIN, E., HART, I.R., KAO, R.H., HANBY, A.M., CUTRESS, R.I., POULSOM, R., RYDER, K., BARNES, D.M., PACKHAM, G., 2002, Bag-i expression in human breast cancer: Interrelationship between bag-1 rna, protein, hsc70 expression and clinico-pathological data, *Journal of Pathology*, 197 (1), 51-59.

- 406. SHARP, A., CRABB, S.J., TOWNSEND, P.A., CUTRESS, R.I., BRIMMELL, M., WANG, X.H., PACKHAM, G., 2004, Bag-1 in carcinogenesis, *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 6 (7), 1-15.
- 407. WALLER, A.S., SHARRARD, R.M., BERTHON, P., MAITLAND, N.J., 2000, Androgen receptor localisation and turnover in human prostate epithelium treated with the antiandrogen, casodex, *Journal of Molecular Endocrinology*, 24 (3), 339-351.
- 408. FRIGO, D.E. and MCDONNELL, D.P., 2008, Differential effects of prostate cancer therapeutics on neuroendocrine transdifferentiation, *Molecular Cancer Therapeutics*, 7 (3), 659-669.

EKLER

Tablo 1. Kullanılan cihazların listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Buzdolabı (No frost)	4263TMB	Arçelik
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Dikey akışlı güvenlik kabini	Model:	HeraSafe
Distile Su Cihazı	D56412	TKA-Pacific
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low	New Brunswick
Elektroforez sistemi	165-8000	Bio-Rad
Elektroforez transfer sistemi	170-4155	Bio-Rad
Floresan ataçmanlı invert	Model: 1X71	Olympus
Fluorometre	Fluoroskan	Thermo Labsystems
Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Hemositometre	Z359629	Sigma Aldrich
HPLC	1200 series	Agilent
Invert Mikroskop	XDS-1B	SOIF
İnkübatör	EN 025	Nüve
Kantitatif eş zamanlı PCR	PTC-1148C	Bio-Rad
Kar-buz makinası	AF80	Scotsman
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab
Masaüstü soğutmalı santrifüj	5417R	Eppendorf
Mikropipet (0,5µl-10µl)	EH52836	Thermo Scientific
Mikropipet (2µl-20µl)	CJ17240	Thermo Scientific
Mikropipet (20µl-200µl)	EH46925	Thermo Scientific
Mikropipet (200µl-1000µl)	T27274	Thermo Scientific
Mikroplaka okuyucu,	680	Bio-Rad
Otoklav	OTO32	Nüve
pH Metre	N315	SEM/Mettler Toledo
PVDF Membran	88518	Thermo Scientific
Sıvı azot tankı ve ikmal tankı	Arpege 40	Air Liquid

Spektrofotometre	Ultraspec 2100	Biosciences
Tartı	LE6202S	Sartorius
Tüp rotasyon aleti	SRT9D	Stuart
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab
X-ray Film	34090	Thermo Scientific

Tablo 2. Hücre kültürü donanımları.

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
100 mm petri	93100	TPP
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
25cm² hücre büyütme kapları	90026	TPP
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
60 mm petri	93060	TPP
75cm² hücre büyütme kapları	90076	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
DU145 hücre hattı	CRL-2698	ATCC
Fetal Bovine Serum	P291509	Pan Biotech
Kriyovial tüp	V7634	NUNC
LNCaP hücre hattı	CRL-1740	ATCC
Penisilin/Streptomisin	P06-07100	Pan Biotech
RPMI besiyeri	21875	GIBCO
Steril pipetler (10ml)	94010	TPP
Steril pipetler (5ml)	94005	TPP
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	99722	TPP
Tripsin-EDTA	P10-0231	Pan Biotech

Tablo 3. Kullanılan kimyasalların listesi.

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
10X PBS	P04-53500	Pan Biotech
2-merkaptotanol	S4805940517	Merck
Akrilamid / Bis-Akrilamid 30 %	A3699	Sigma Aldrich
Amonyum persülfat	A3678	Sigma Aldrich
Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi antikorları	99412	Cell Signaling Technology
Apoptoz antikorları	9915	Cell Signaling Technology
AR antikor	sc-390429	Santa Cruz
AR siRNA	sc-29204	Santa Cruz
Benzoil klorid	A4746	AppliChem
Coomassie Blue Belirteci	500-0006	Bio-Rad
DAPI	D1306	Invitrogen
DCFH-DA	C6827	Invitrogen
Dietileter	296082	Sigma Aldrich
DiOC6 Boya	2129966	Fluka
DMSO	D5879	Sigma Aldrich
DTT	D0632	Sigma Aldrich
EDTA	A3452	Sigma Aldrich
Epibrassinolide	E1641	Sigma Aldrich
Etanol	A3452	Sigma Aldrich
Fetal Bovine Serum (FBS)	P290310	Pan Biotech
Film Geliştirici	P7042	Kodak
Film Sabitleştirici	P7167	Kodak
Glisin	A1067	AppliChem
Hidrojen peroksit	K39218400838	MERCK
Hücre döngüsü antikorları	9932	Cell Signaling Technology
İzopropanol	24137	Rieel-de Haen
Kazpaz antikorları	9929	Cell Signaling Technology
Laemli Tamponu	S3401	Sigma Aldrich
Luminol	A8511	Sigma Aldrich

MDL 72,527	M2949	Sigma Aldrich
MDM2 antikoru	sc-965	Santa Cruz
Metanol	24229	Sigma Aldrich
MTT	M2003	SIGMA
Negatif siRNA	1027280	Qiagen
Nutlin-3	N6287	Sigma Aldrich
ODC antikoru	sc-390366	Santa Cruz
p53 antikoru	2527	Cell Signaling Technology
Page Ruller Prestained Protein	SM0671	Fermentas
PAO antikoru	sc-166185	Santa Cruz
PAO siRNA	sc-44540	Santa Cruz
p-Coumaric Asit	C9008	Sigma Aldrich
Pifithrin α	P4359	Sigma Aldrich
Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi antikorları	9942	Cell Signaling Technology
Propidium Iodide	A2261	Appllichem
Protein İzolasyonu Tamponu	K0301	Fermentas
Saf Etanol	32221	Rieel-de Haen
SDS (Sodyum dedosil sülfat)	A3452	Appllichem
Sığır Serum Albumin (BSA)	500-0007	BioRad
Sodyum Klorür	A2942	AppliChem
SSAT antikoru	sc-67159	Santa Cruz
SSAT siRNA	sc-61616	Santa Cruz
TEMED	A1148	Appllichem
Trikloroasetik asit	T0699	Sigma Aldrich
TriPure RNA izolasyon ajanı	11667157001	Roche Applied Sciences
Tris Baz	A2264	Appllichem
Tris-HCl	A3452	Appllichem
Tween 20	S4927784 802	MERCK
Yağsız Süt Tozu	9999	Cell Signaling Technology
Yükleme standart antikorları	5142	Cell Signaling Technology
z-LEHD-FMK	550381	BD Biosciences

z-VAD-FMK	550377	BD Biosciences
------------------	--------	----------------

Tablo 4. Kullanılan moleküler biyoloji kitleri.

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Annexin V-PI kiti	BV-K101-3	MBL International
cDNA sentez kiti	170-8891	Bio-Rad
Cell Death ELISA	11774425001	Roche
Sitokrom c apoptoz kiti	K257-100	BioVision
Kantitatif eş zamanlı PCR kiti	170-8892	Bio-Rad
Sitoplazmik mitokondriyal protein izolasyon kiti	89874	Thermo Scientific
Sitoplazmik nuklear protein izolasyon kiti	K0311	Fermentas

Tez kapsamında elde edilen veriler ile gerçekleştirilen uluslar arası yayınlar (SCI)
OBAKAN, P., ARISAN, E.D., CALCABRINI, A., AGOSTINELLI, E., PALAVAN-UNSAL, N., 2013, Activation of Polyamine Catabolic Enzymes Involved in Diverse Responses Against Epibrassinolide-Induced Apoptosis in LNCaP and DU145 Prostate Cancer Cell Lines. *Amino Acids*. (Gönderildi).

Tez kapsamında elde edilen veriler ile gerçekleştirilen uluslar arası bildiriler:
OBAKAN, P., ARISAN, E.D., BULKENT, S., PALAVAN-UNSAL, N., Epibrassinolide Induces Apoptosis by Targeting Polyamine Catabolism in LNCaP Prostate Cancer Cells, *First International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey*, 23-24 November 2012, İstanbul-TURKEY.

OBAKAN, P., ARISAN, E.D., CALCABRINI, A., AGOSTINELLI, E., BULKENT, S., PALAVAN-UNSAL, N., Epibrassinolide Targets Polyamine Catabolism and Triggers Apoptosis in LNCaP, DU145 and PC3 Cell Lines. *International Congress on Polyamines: Biological and Clinical Perspectives*, 2-7 September 2012, İstanbul-TURKEY. (Sözlü sunum)

OBAKAN, P., ARISAN, E.D., BULKENT, S., PALAVAN-UNSAL, N., 24-Epibrassinolide induces SSAT and causes caspase-dependent apoptosis in different prostate cancer cell lines. *Biogenic Amines: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives*, September 21 – 25, 2011 Alberè di Tenna (Trento), ITALY. (Sözlü sunum)

OBAKAN, P., ARISAN, E.D., BULKENT, S., PALAVAN-UNSAL, N., 24-Epibrassinolide induced apoptosis by modulating polyamine catabolic pathway in various prostate cancer cell lines. *Gordon Research Conferences on Polyamines. Polyamine Genetics, Metabolism, Cellular Homeostasis and Drug Discovery*. June 18-19, 2009, June 19-24 Waterville Valley, USA.

ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı: Pınar Obakan

2. Doğum Tarihi: 26.07.1983

3. Ünvanı: Araştırma Görevlisi

4. Öğrenim Durumu:

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	İstanbul Üniversitesi	2007
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Université Paul Sabatier, Toulouse 3, Fransa	2008
Doktora	Biyoloji	İstanbul Üniversitesi	Devam

5. Akademik Unvanlar:

- **Biyolog:** 15.09.2008-11.02.2011, İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
- **Araştırma görevlisi:** 11.02.2011- İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

6. Yönetilen Yüksek Lisans ve Doktora Tezleri

6.1. Yüksek Lisans Tezleri

6.2. Doktora Tezleri

7. Yayınlar

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

1. ARISAN, E.D, **OBAKAN, P.**, COKER, A., PALAVAN-UNSAL, N., 2012, Inhibition of Ornithine Decarboxylase Altered The Roscovitine-Induced Mitochondria

Mediated Apoptosis In MCF-7 Breast Cancer Cells, *Molecular Medicine Reports*, 5: 1323-1329.

2. ARISAN, E.D, OBAKAN, P., COKER, A., CALCABRINI, A., AGOSTINELLI, E., PALAVAN-UNSAL, N. 2013, CDK Inhibitors Induce Mitochondria-Mediated Apoptosis Through The Activation Of Polyamine Catabolic Pathway in LNCaP, DU145 and PC3 Prostate Cancer Cells. *Current Pharmaceutical Design*, (Baskıya kabul edildi).

3. OBAKAN, P., ARISAN, E.D., CALCABRINI, A., AGOSTINELLI, E., PALAVAN-UNSAL, N., 2013, Activation of Polyamine Catabolic Enzymes Involved in Diverse Responses Against Epibrassinolide-Induced Apoptosis in LNCaP and DU145 Prostate Cancer Cell Lines. *Amino Acids*.(Gönderildi).

7.2. Uluslararası diğer hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

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

1. OBAKAN, P., ARISAN, E.D., BOLKENT, S., PALAVAN-UNSAL, N., Epibrassinolide Induces Apoptosis by Targetting Polyamine Catabolism in LNCaP Prostate Cancer Cells, *First International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey*, 23-24 November 2012, İstanbul-TURKEY.

2. BERRAK, Ö., AKKOC, Y., OBAKAN, P., ARISAN, E.D, COKER-GURKAN, A., PALAVAN-UNSAL, N., Effects of CDK Inhibitors and Rapamycin Combination on Autophagy With The Status of AR expression on Androgen Dependent LNCaP and Androgen Independent DU145 Prostate Cancer Cells, *First International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey*, 23-24 November 2012, İstanbul-TURKEY.

3. COSKUN, D., OBAKAN, P., ARISAN, E.D, COKER-GURKAN, A., PALAVAN-UNSAL, N., Epibrassinolide Induced Apoptotic Cell Death in HCT116 and

HT29 Colon Carcinoma cells, *First International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey*, 23-24 November 2012, İstanbul-TURKEY.

4. AKKOC, Y., ARISAN, E.D, COKER-GURKAN, A., **OBAKAN, P.**, PALAVAN-UNSAL, N., Understanding the Role of Bcl-2 in Curcumin induced Autophagic/Apoptotic Cell Death Mechanism in MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cells, *First International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey*, 23-24 November 2012, İstanbul-TURKEY.

5. ILHAN, H., COKER-GURKAN, A., ARISAN, E.D, **OBAKAN, P.**, PALAVAN-UNSAL, N., Diethylnorspermine (DENSp_m) Induced Apoptosis in SW480 Colon Cancer Cells, *First International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey*, 23-24 November 2012, İstanbul-TURKEY.

6. **OBAKAN, P.**, ARISAN, E.D., CALCABRINI, A., AGOSTINELLI, E., BOLKENT, S., PALAVAN-UNSAL, N., Epibrassinolide Targets Polyamine Catabolism and Triggers Apoptosis in LNCaP, DU145 and PC3 Cell Lines. *International Congress on Polyamines: Biological and Clinical Perspectives*, 2-7 September 2012, İstanbul-TURKEY. (Sözlü sunum)

7. AKYUZ, S., AKYUZ, T., **OBAKAN, P.**, ARISAN, E.D., BOLKENT, S., PALAVAN-UNSAL, N., FTIR Spectroscopic Investigation of The Effects of Polyamine Oxidase Inhibitor MDL 72527 on The Interaction of Epibrassinolide With Cultured LNCaP Prostate Cancer Cells. *International Congress on Polyamines: Biological and Clinical Perspectives*, 2-7 September 2012, İstanbul-TURKEY.

8. YILDIRIM, S., OZTURK M.B., ARISAN, E.D., **OBAKAN, P.**, COKER-GURKAN, A., PALAVAN-UNSAL., N., PPAR α is the Critical Upstream Factor in Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Roscovitine and Purvalanol A- Induced SSAT Upregulation in MCF-7 Cells. *International Congress on Polyamines: Biological and Clinical Perspectives*, 2-7 September 2012, İstanbul-TURKEY.

9. COKER-GURKAN, A., OBAKAN, P., ARISAN, E.D., CALCABRINI, A., AGOSTINELLI, E., PALAVAN-UNSAL, N., The Effect of Polyamine Catabolism Products on CDK Inhibitors-Induced on HCT116 wt and Bax ^{-/-} Colon Carcinoma Apoptotic Cell Death. *International Congress on Polyamines: Biological and Clinical Perspectives*, 2-7 September 2012, İstanbul-TURKEY.

10. KOSE, B., ALKURT, G., COKER-GURKAN, A., ARISAN, E.D., OBAKAN, P., PALAVAN-UNSAL, N., ODC is a Mediator of the Purvalanol-A-Induced Apoptotic Signaling via the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in MCF-7 Breast Cancer Cells. *International Congress on Polyamines: Biological and Clinical Perspectives*, 2-7 September 2012, İstanbul-TURKEY.

11. COSKUN, D., OBAKAN, P., ARISAN, E.D., COKER-GURKAN, A., PALAVAN-UNSAL, N., The Potential Role of Polyamines in EBR-Induced Apoptotic Cell Death in HCT116 Colon Carcinoma Cells. *International Congress on Polyamines: Biological and Clinical Perspectives*, 2-7 September 2012, İstanbul-TURKEY.

12. ILHAN, H., COKER-GURKAN, A., OBAKAN, P., ARISAN, E.D., PALAVAN-UNSAL, N., Timing is Critical in the Decision of Apoptosis or Autophagy by N1, N11-Diethylnorspermine (DENSp^m) treatment in HCT116 Colon Cancer Cells. *International Congress on Polyamines: Biological and Clinical Perspectives*, 2-7 September 2012, İstanbul-TURKEY.

13. IRMAK, O., ARISAN, E.D., COKER-GURKAN, A., OBAKAN, P., PALAVAN-UNSAL, N., The Role of Polyamine Catabolic Enzymes in Cisplatin-Induced Apoptotic Cell Death in MCF-7 Cells. *International Congress on Polyamines: Biological and Clinical Perspectives*, 2-7 September 2012, İstanbul-TURKEY.

14. ARISAN, E.D., BERRAK, O., OBAKAN, P., PALAVAN-UNSAL, N., Cyclin Dependent Kinases Exert Their Apoptotic Potential By Acting on mTOR-Mediated Energy Signaling Cascade In The Presence Of Activated Polyamine

Catabolism in LNCap, DU145 and PC3 Prostate Cancer Cells. *International Congress on Polyamines: Biological and Clinical Perspectives*, 2-7 September 2012, İstanbul-TURKEY.

15. OBAKAN, P., OZFILIZ, P., ARISAN E.D., COKER-GURKAN, A., PALAVAN-UNSAL, N., Purvalanol A is a Strong Apoptotic Inducer via Activating Polyamine Catabolic Pathway in MCF-7 Estrogen Receptor + Breast Cancer Cells. *EMBO Young Scientist Forum*, 14-16 June 2012, Istanbul-TURKEY.

16. AKKOC, Y., CELIK, M., OBAKAN, P., COKER-GURKAN, A., ARISAN, E.D., PALAVAN-UNSAL, N., The Functional Role of Bcl-2 in the Regulation of Curcumin-Induced Autophagy/ Apoptotic Cell Death in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Apoptosis and Cancer*, 14-15 June 2012, Cambridge- UK.

17. BERRAK, O., ARISAN, E.D., OBAKAN, P., PALAVAN-UNSAL, N., Investigation Of Possible Role of mTOR in CDK Inhibitors Induced Apoptotic Cell Death in LNCaP, DU145 and PC3 Prostate Cancer Cell Lines. *Graduate Student Immunology Congress*, April 27-28, 2012, Harvard University, Boston, USA .

18. OBAKAN, P., ARISAN, E.D., BOLKENT, S., PALAVAN-UNSAL, N., 24-Epibrassinolide Induces SSAT and Causes Caspase-Dependent Apoptosis In Different Prostate Cancer Cell Lines. *Biogenic Amines: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives*, September 21 – 25, 2011 Alberè di Tenna (Trento), ITALY. (Sözlü sunum)

19. OBAKAN, P., ARISAN, E.D., BOLKENT, S., PALAVAN-UNSAL, N., 24-Epibrassinolide Induced Apoptosis By Modulating Polyamine Catabolic Pathway In Various Prostate Cancer Cell Lines. *Gordon Research Conferences on Polyamines. Polyamine Genetics, Metabolism, Cellular Homeostasis and Drug Discovery*. June 18-19, 2009, June 19-24 Waterville Valley, USA.

20. ARISAN, E.D., OBAKAN, P., PALAVAN-UNSAL, N., Roscovitine Induced Apoptosis and Activated Polyamine Catabolic Pathway in LNCap, DU145 and PC3 Prostate Cancer Cell Lines. *Gordon Research Conferences on Polyamines*. Polyamine Genetics, Metabolism, Cellular Homeostasis and Drug Discovery. June 18-19, 2009, June 19-24 Waterville Valley, USA.

21. PALAVAN-UNSAL, N., ARISAN, E.D., OBAKAN, P., COKER, A., OZDEMİR, I., Cyclin Dependent Kinase Inhibitors Modulates Polyamine Metabolism in MDA-MB-231 Cells, *2nd International Conference on the Role of Polyamines and their Analogs in Cancer and other Diseases*, 1-6 December, 2010, Sapienza University of Roma, ITALY.

22. ARISAN, E.D., OBAKAN, P., COKER, A., PALAVAN-UNSAL, N., Investigation Of Purvalanol-Induced Apoptosis In MCF-7 Breast Cancer Cell Lines. *2nd International Conference on the Role of Polyamines and their Analogs in Cancer and other Diseases*, 1-6 December, 2010, Sapienza University of Roma, ITALY.

23. OBAKAN, P., ARISAN, E.D., PALAVAN-UNSAL, N., COKER, A., Combined Treatment of Roscovitine and DFMO Induced Caspase Dependent Apoptosis in MCF-7 cells. *2nd International Conference on the Role of Polyamines and their Analogs in Cancer and other Diseases*, 1-6 December, 2010, Sapienza University of Roma, ITALY. (Sözlü sunum)

24. ARISAN, E.D., PALAVAN-UNSAL, N., OBAKAN, P., Investigation of Roscovitine (CYC202)-Induced Apoptosis Related With Polyamine Metabolism in MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line. *IUBMB LIFE*, 61: 370, 2009. III. Congress of Molecular Medicine, From Cell to Bedside, 5-8 May 2009, Harbiye Military Museum, Istanbul, Turkey.

7.4. Yazılan uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler

7.5. Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

7.6. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

7.7. Diğer yayınlar

7.8. Uluslararası atıflar

Atıf sayısı: 1

ARISAN, E.D., PALAVAN-UNSAL, N., **OBAKAN, P.**, Investigation of Roscovitine (CYC202)-Induced Apoptosis Related With Polyamine Metabolism in MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line. *IUBMB LIFE*, 61: 370, 2009. III. *Congress of Molecular Medicine*, From Cell to Bedside, 5-8 May 2009, Harbiye Military Museum, Istanbul, Turkey.

8. Ulusal & Uluslararası Projeler

“Kolon Karsinoma Hücrelerinde Epibrassinolid Tarafından Tetiklenen Apoptotik Süreçte Poliaminlerin Rolü” (**TUBİTAK, Hızlı Destek Projesi, 212T168, 2013-2014 Bursiyer**)

“Farklı Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Epibrassinolidle Tetiklenen Apoptotik Süreçte Poliaminlerin Rollerinin Araştırılması” (**Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi BAP Projesi, 20958, 2012-2014, Yürütücü**)

“Cdk İnhibitörü Roskovitin Tarafından Tetiklenen Apoptotik Yolakta Poliamin Katabolizmasının Rolünün LNCaP, DU145 Ve PC3 Prostat Kanseri Hücre Hatlarında İncelenmesi” (**TUBİTAK, Hızlı Destek Projesi, 210T107, 2010-2011 Bursiyer**)

“Cdk İnhibitörü Purvalanolün (CYC 202) Meme Kanseri Hücrelerindeki (MCF-7) Etkisinin Apoptotik Sinyal Molekülleri ve Poliamin Parametreleri İle Araştırılması” (**İstanbul Kültür Üniversitesi, Araştırmacı, 2009-2010**)

“Cdk İnhibitörü Roskovitin (CYC 202) Meme Kanseri Hücrelerindeki (MCF-7) Etkisinin Apoptotik Sinyal Molekülleri ve Poliamin Parametreleri ile Araştırılması” (**İstanbul Kültür Üniversitesi, Araştırmacı, 2008-2009**)

9. İdari Görevler

10. Bilimsel ve Mesleki Kuruluşlara Üyelikler

2009: Biochemical Society

2010: Moleküler Kansere Araştırma Derneği (MOKAD)

2010: European Association for Cancer Research (EACR)

2012: Moleküler Biyoloji Derneği (MBD)

11. Ödüller ve Burslar

Biogenic Amines: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives, September 21 – 25, 2011 Alberè di Tenna (Trento), ITALY, Katılım Bursu (21-25 Eylül 2011)

Roma “La Sapienza” Üniversitesi Erasmus Öğretim Elemanı hareketliliği programı (Eylül, 2011)

TEV-Fransa Büyükelçiliği Müşterek Fransa Bursu (Yüksek Lisans, 2007-2008)

Katıldığı Uluslararası Bilimsel Etkinlikler:

- First International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 23-24 November 2012, İstanbul-TURKEY.

- International Congress on Polyamines: Clinical and Biological Perspectives, September 2-7, 2012, İstanbul- TURKEY.

- EMBO Young Scientist Forum, 14-16 June 2012, İstanbul-TURKEY.

- Biogenic Amines: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives, September 21 - 25, 2011 Alberè di Tenna (Trento), ITALY.

- Gordon Research Conferences on Polyamines. June 19-24, 2011, Waterville Valley,USA.

- Gordon Research Seminars on Polyamines. June 18-19, 2011, Waterville Valley,USA

- 2nd International Conference on the Role of Polyamines and their Analogs in Cancer and other Diseases” 1-6 December, 2010, Sapienza University of Roma, ITALY.

- III. Congress of Molecular Medicine, From Cell to Bedside, 5-8 May 2009, Harbiye Military Museum, İstanbul, Turkey.