

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**IRF5 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ VE SOX2 KÖK
HÜCRE FAKTÖRÜ İLİŞKİSİNİN PROSTAT KANSER
HÜCRELERİNDE BELİRLENMESİ**

Merve AKARÇAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Özge ÇEVİK

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından ADÜ-TPF-18003 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (TIP) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Merve AKARÇAY tarafından hazırlanan “IRF5 Transkripsiyon Faktörü ve SOX2 Kök Hücre Faktörü İlişkisinin Prostat Kanseri Hücrelerinde Belirlenmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10/ 07/ 2019

Unvan	Üniversite	İmza
Üye (T.D.): Doç. Dr. Özge ÇEVİK	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye: Prof. Dr. Aslıhan KARUL	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye: Doç.Dr. Sevgi DURNA DAŞTAN	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi	

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cavit KUM
Enstitü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Hedeflenen bir yolda ilerlemek, yapılan çalışmaları ve kazanılan birikimleri üst üste koymak bunları başarmak zaman, sabır ve emek ister.

Yüksek lisans eğitimimi tamamlamam için beni öğrencisi kabul ederek hayatımı yönlendiren, büyük ilgi ve anlayışla beni destekleyen, yol gösterici niteliği ile her zaman ılık tutan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan tüm katkılarından dolayı değerli hocam, tez danışmanım Doç. Dr. Özge ÇEVİK' e zamanını ayırdığı için teşekkür ederim.

Yüksek lisans yaptığım süre içerisinde bilgi birikimlerini ve tecrübelerini aktaran ADÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı hocalarım Prof.Dr. Aslıhan KARUL, Doç.Dr. Yusuf KURTULMUŞ, Dr. Öğrt. Üyesi Mustafa YILMAZ ve Dr. Öğrt. Üyesi Ayça TUZCU'ya teşekkür ederim.

Tezimin başlangıcından bitimine kadar olan deneysel çalışmalarında her konuda hep destek olan yardımını esirgemeyen çalışma arkadaşım Mustafa YILMAZ' a çok teşekkür ederim.

Laboratuvarda her zaman koşulsuz yardım eden bildiklerini benimle paylaşan Dr. Mürüvvet ABBAK' a teşekkür ederim.

Zor zamanlarımda samimiyetiyle yüzümü güldüren Aydın'a geldiğim günlerde manevi desteğini esirgemeyen hep yanımda olan canım arkadaşlarım Gizem ÇEBİ ve Özge KAYA' ya çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana destek olan, zor durumlarımda beni yalnız bırakmayan öncelikle sevgili aileme sonra okul hayatımın her döneminde hayatımda iz bırakıp, yol gösteren beni bugünlere getirdikleri için değerli öğretmenlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmalarımda kullanılan malzemeler TÜBİTAK-214Z057 nolu proje ile temin edilmiş olup, bu tez çalışmasının desteklenmesinde TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Merve AKARÇAY

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser ve Kanserin Moleküler Genetiği	3
2.1.1. Kanser Metabolizması	4
2.2. Prostat Kanseri.....	6
2.2.1. Prostat Kanseri Patogenezi	8
2.2.2. Prostat Kanseri Epidemiyolojisi	9
2.2.3. Prostat Kanseri Risk Faktörleri.....	10
2.2.3.1. Yaş	10
2.2.3.2. Ailesel geçmiş	10
2.2.3.3. İnsülin benzeri büyüme faktörleri.....	10
2.2.3.4. Obezite.....	11
2.2.3.5. Diğer faktörler	12
2.2.4. Prostat Kanseri Androjen Reseptörü(AR)	12
2.2.4.1. AR ifadesinin ve spesifik hücre fonksiyon düzenlenmesi	13
2.3. Prostat Bezi.....	14
2.4. Prostat Spesifik Antijen	15
2.5. İnterferonlar	16
2.5.1. İnterferonlarda Sinyal İletimi	17
2.5.2. İnterferon Tipleri	18
2.5.2.1. Alfa interferonlar	19
2.5.2.2. Beta interferonlar	19

2.5.2.3. Gama interferonlar.....	19
2.5.2.4. İnterferon etkileri.....	21
2.5.2.5. İnterferon etkisinin moleküler ve fizyolojik temeli.....	22
2.5.3. İnterferona Maruz Kalan Hücrelerdeki Biyokimyasal Değişiklikler	22
2.6. İnterferon Düzenleyici Faktörler.....	22
2.6.1. IRF5.....	25
2.7. Transkripsiyon Faktörleri	26
2.7.1. c-Myc.....	28
2.7.2. OCT4.....	28
2.7.3. Klf4 (Krüppel-Like Factor 4)	29
2.7.4. Nanog	29
2.7.5. SOX Ailesinin Keşfi.....	30
2.7.5.1. SOX2	32
2.7.5.2. Kanserde SOX2 düzensizliği.....	33
2.7.5.3. İmplantasyon öncesi gelişim ve pluripotenside SOX2.....	34
2.7.5.4. Fetal gelişimde SOX2.....	35
2.7.5.5. SOX protein ifadesinin ve aktivitesinin düzenlenmesi	36
2.7.5.6. Kök hücre biyolojisinde diğer SOX faktörlerinin katılımı.....	36
2.7.5.7. HücreSEL yeniden programlamada SOX faktörleri	36
2.8. Transkripsiyon Faktörlerinin Yapısı.....	37
2.9. Transkripsiyon Faktörlerinin Birbirleriyle İlişkisi	38
2.10. Transkripsiyon Aktivasyonu	39
2.10.1. Transkripsiyon Faktörleri Düzenleme	39
2.10.1.1. Transkripsiyon sentezi düzenleme	40
2.10.1.2. Transkripsiyon faktör aktivitesinin düzenlenmesi.....	40
2.10.2. Transkripsiyon Faktörü ve Kanser	40
2.11. Kök Hücre	41
2.11.1. Kök Hücre Tipleri.....	43
2.11.1.1. Embriyonik kök hücreler	43
2.11.1.1.1. Totipotent kök hücre.....	44
2.11.1.1.2. Pluripotent kök hücreler	44
2.11.1.1.3. İndüklenmiş pluripotent kök hücre.....	45
2.11.1.1.4. Multipotent kök hücre	46
2.11.1.2. Embriyonik olmayan kök hücreler	46

2.11.1.3. Organlardaki kök hücreler	47
2.11.1.3.1. Adiposit kök hücre	47
2.11.1.3.2. Nöronal kök hücre	48
2.11.1.3.3. Epidermal kök hücre.....	48
2.11.1.3.4. Dental pulpa kök hücresi	48
2.11.1.3.5. Kanser kök hücreleri.....	48
3. GEREÇ ve YÖNTEM	52
3.1. Kullanılan Malzemeler	52
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	52
3.3. Hücre Kültürü	53
3.3.1. Hücrelerin Büyütülüp Çoğaltılması.....	53
3.3.2. Hücrelerin Pasajlanması	53
3.3.3. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi	54
3.3.4. Hücre Sayımı	54
3.4. Pırf5 Ve Psox2 Plazmitlerinin Çoğaltılması ve İzolasyonu	55
3.4.1. Elektroporasyon.....	56
3.4.1.1. Bakteri kültürlerinin, araçlarının ve reaktiflerinin hazırlanması	56
3.4.1.2. Elektrocompetent bakterilerin büyümesi.....	57
3.4.1.3. Elektrocompetent bakteriyel hücrelerin hazırlanması	57
3.4.1.4. Elektrocompetent bakterilerin transformasyonu	57
3.4.2. Plazmid İzolasyonu	58
3.4.3. Plazmidlerin Safılık ve Miktar Tayini	60
3.5. IRF5 ve SOX2 İçin Transfeksiyonu	60
3.6. IRF5 ve SOX2 Overekspresyonunun Migrasyon Üzerine Etkisi	60
3.7. BCA Protein Tayini	61
3.8. Hücrelerde Yapılan Western Blot Çalışmaları	62
3.8.1. SDS PAGE/Western Blot	62
3.8.2. Western Blot Aşamasında Hazırlanan Çözeltiler:	63
3.9. İmmünopresipitasyon (IP) Deneyleri	65
3.10. CD133/CD44 Bağlanma Deneyleri	67
3.11. İstatistiksel Analiz	68
4. BULGULAR	69
4.1. Plazmidlerin Çoğaltılması ve Klonların Seçimi	69
4.2. Plazmit izolasyonu Sonrasında Agaroze Jel Elektroforezi.....	69

4.3. Plazmitlerin Protein İfadesi Kontrolü.....	70
4.4. Overekspresyon Yapılan Proteinlerin Western Blot Analizleri	70
4.5. SOX2'nin Hücre Migrasyonu Üzerine Etkisi.....	72
4.6. IRF5 İle SOX2 Protein Etkileşimleri Sonuçları	73
5. TARTIŞMA.....	77
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	84
KAYNAKLAR.....	85
ÖZGEÇMİŞ.....	108



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

APS	: Amonyum Per Sülfat
AR	: Androjen Reseptörü
ATP	: Adenozin Tri Fosfat
BCA	: Bicinchoninicasit
BPH	: Benign Prostat Hiperplazisi
BSA	: Bovine Serum Albümin
CRR	: Cis Düzenleyici Bölgeler
CSC	: Kanser Kök Hücresi
DBD	: DNA Bağlanma Domaini
DHT	: Dihidrotestesteron
DNA	: Deoksiribo NükleikAsit
ECM	: Ekstasellüler Matriks
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
eIF-2	: Elongasyon Faktörü-2
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
EpiSC	: Epiblast Kök Hücreleri
ES	: Embriyonik Hücre
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç dairesi
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
GAS	: IFN Gama ile Aktive Edilmiş Bölge
hK2	: Human Kallikrein-2
HKH	: Hematopoetik Kök hücre
HMG	: Yüksek Hareketlilik Grubu
IAD	: Interferon Associated Domaid
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
ICM	: Inner Cell Mass (İç hücre kitlesi)
IFN	: İnterferon
IFNARI	: İnterferon Reseptörü tipI
IFNARII	: İnterferon Reseptörü tip II
IFNGR	: İnterferon Gama Reseptör

IGF-I	: İnsülin benzeri Büyüme Faktörü
IL	: İnterlökin
IPSC	: İndüklenmiş Pluripotent Kök hücre
IRF	: İnterferon Düzenleyici Faktör
ISRE	: İnterferon ile uyarılmış yanıt elemanları
JAK1	: Janus Aktive Kinaz1
kDa	: KiloDalton
Klf-4	: Kruppel Like Factor-4
KKH	: Kanser Kök Hücresi
KLK3	: Kallikrein-3
LPS	: Lipopolisakkarit
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
MMP3	: Matriks Metalloproteinaz
NFKb	: Nükleer Faktör Kappa B
NK	: Naturel Killer(Doğal öldürücü hücreler)
OA	: Osteoartrit
OCT4	: Oktomer-Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü 4
PAMP	: Patojen ilişkili Moleküler modeller
PCa	: Prostat Kanseri
PI3K	: Fosfatidilinositol-3-Kinaz
PKR	: Protein Kinazlar
PRG	: Primer Yanıt Genleri
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
RA	: Romatoid Artrit
Rb	: Retinoblastoma
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOX2	: SRY-box 2
SOX2OT	: SOX2 Overlapping Transcript
SRG	: İkincil Tepki Genleri
SRY	: Sex Determining Region Y
STAT	: Sinyal Transdüser Proteinleri
TCA	: Trikarboksilik asit
TE	: Trofektoderm

TF	: Transkripsiyon Faktörleri
Th1	: T-Helper Cells
TLR	: Toll benzeri Reseptörler
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TYK2	: Tirozin Kinaz 2



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kanser metabolizmasını düzenleyen sinyal yolları.....	5
Şekil 2. Erkeklerde En Sık Görülen Kanserlerin Toplam Sayısı ve Yüzde Dağılımları...6	
Şekil 3. Normal prostat dokusu ile büyümüş prostat dokularının karşılaştırılması.7	
Şekil 4. İnsan prostat kanseri gelişiminin potansiyel paternlerini gösteren diyagram7	
Şekil 5. Protein kinaz B/AKT yolunun işlevleri.....9	
Şekil 6. Obezite ilişkili yağ dokusu disfonksiyonunun ve inflamasyonun kanser hücre metabolizmasına etkisi11	
Şekil 7. Androjen reseptörü (AR) geninin ve proteinin şematik diyagramı.....13	
Şekil 8. İnsan prostat anatomisi ve histolojisi şeması15	
Şekil 9. Tip1 interferon reseptör kompleks modeli16	
Şekil 10. JAK/STAT yolunun aktivasyonu.....17	
Şekil 11. İnterferon reseptörleri ve klasik JAK-STAT yollarının tip I ve tip II interferonlarla aktivasyonu.....18	
Şekil 12. Tip I interferonların (IFN'ler) şerit diyagramı.....19	
Şekil 13. İnterferon-gama (IFN-g) reseptör kompleksinin modeli.....20	
Şekil 14. İnterferonun antiviral etkisi.....21	
Şekil 15. İnterferon NK sistem.....22	
Şekil 16. Farklı fonksiyonel alanlar gösteren tam boy insan IRF'lerinin şematik gösterim.23	
Şekil 17. IRF' lerin stres sensörleri olduğunu gösteren şema.26	
Şekil 18. Programlama işlemi sırasında Nanog ihtiyacı.29	
Şekil 19. Nanog pluripotent kök hücrelerde kendini yenileme ve farklılaşma şeması ...30	
Şekil 20. SOX2 protein alanları31	
Şekil 21. SOXB1 grubunun üç ana alanı.....31	
Şekil 22. SOX proteinlerinin alan yapıları32	
Şekil 23. SOX proteinin transkripsiyon faktörleriyle aktivasyonunu gösteren şekil.33	
Şekil 24. SOX2 proteini kanser hücresi üzerinde etkileri34	
Şekil 25. Pluripotent, Fetal ve Yetişkin Progenitör ve Kök Hücrelerdeki SOX2 İfadesi...35	

Şekil 26. SOX Transkripsiyon Faktörleri Ailesi: Kök ve Progenitör Hücre Kaderinin Çok Yönlü Regülatörleri	37
Şekil 27. ESC' lerde SOX2-Pou5f1 / OCT4 gösterimi.....	38
Şekil 28. Blastosistin farklılaştığı dokular	41
Şekil 29. Kök hücre Hiyerarşisi	43
Şekil 30. Pluripotent hücreden gelişen doku ve organlar.	44
Şekil 31. Dört tip kök hücrede SOX2, Nanog ve OCT4'ün ilişkisi.....	45
Şekil 32. Pluripotent Kök hücrelerin farklılaşma Potansiyeli	45
Şekil 33. Kanser kök hücresi (CSC) modeli.	49
Şekil 34. Prostat kanseri (PCa) hücreleri ve PCa kök hücreleri ile ilişkili yollar	51
Şekil 35. Thoma lamında sayım yapılan karelerin toplam görüş alanı.	54
Şekil 36. Plazmid izolasyon basamakları.	59
Şekil 37. Scratch Assay	61
Şekil 38. İmmünopresipitasyon ile protein saflaştırma basamakları.....	66
Şekil 39. Agaroz jel elektroforezinde plazmidlerin ayrıştırılması.	69
Şekil 40. pIRF5 ekspresyon vektöründe IRF5 protein ekspresyon western blot ile kontrolü.	70
Şekil 41. pIRF5 ekspresyon vektöründe IRF5 protein ekspresyon düzeyleri.	71
Şekil 42. pSOX2 ekspresyon vektöründe SOX2 protein ekspresyon western blot ile kontrolü.	71
Şekil 43. pSOX2 ekspresyon vektöründe SOX2 protein ekspresyon düzeyleri.....	71
Şekil 44. pIRF5 ve pSOX2 vektörlerinin hücre proliferasyon grafiği	72
Şekil 45. pSOX2 ekspresyon vektörünün PC3 hücrelerinde migrasyon grafiği.	73
Şekil 46. SOX2 ile IP yapılan örneklerde SOX2 ve IRF5 protein ilişkisi	74
Şekil 47. IRF5 ile IP yapılan örneklerde SOX2 ve IRF5 protein ilişkisi.	74
Şekil 48. pIRF5 ve pSOX2 yapılan örneklerde CD133 bağlanma grafikler	75
Şekil 49. pIRF5 ve pSOX2 yapılan örneklerde CD133 bağlanma yüzdesi.....	75
Şekil 50. pIRF5 ve pSOX2 yapılan örneklerde CD44 bağlanma yüzdesi.....	76
Şekil 51. pIRF5 ve pSOX2 yapılan örneklerde CD44 bağlanma grafikleri.....	76

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Tezde kullanılan hücre kültürü kabini ve malzemeleri.....	53
Resim 2. Elektroporasyonda kullanılan elektroporator (Bio-Rad).	58
Resim 3. Elektroporasyonu yapılan E.coli katı besi yerinde seçilimi ve sıvı besi yerinde çoğaltılması.	58
Resim 4. BCA Protein tayini. Multiskan Spectrum ve eliza plate yüklemesi.....	62
Resim 5. SDS-PAGE jel dökümü.	64
Resim 6. Jeldeki proteinlerin PVDF membrana transferi.	65
Resim 7. DH5 α Bakterileri Kompetent hücre kolonileri.	69
Resim 8. Plazmit transfeksiyonunun PC3 hücrelerinde ekspresyonu	70
Resim 9. pIRF5 ve pSOX2 ekspresyon vektörlerinin transfeksiyon sonrası hücre morfolojileri.....	72
Resim 10. pSOX2 ekspresyon vektörünün PC3 hücrelerinde migrasyon plate görüntüsü	73

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Erkeklerde görülen ilk 10 kanser.....	9
Tablo 2. SEER Kanser İstatistikleri İncelemesi 1975-2012	10
Tablo 3. İnterferon tipleri.....	20
Tablo 4. SDS-poliakrilamid jelin yoğunluğuna göre hazırlanışı.	64



ÖZET

IRF5 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ ve SOX2 KÖK HÜCRE FAKTÖRÜ İLİŞKİSİNİN PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİNDE BELİRLENMESİ

Akarçay M. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya (Tıp) Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2019.

İnterferon Düzenleyici Faktör (IRF) ailesi interferonların bağışıklık sisteminin düzenlenmesini sağlayan transkripsiyon faktörleridir. İnterferon Düzenleyici Faktör 5 (IRF5) bu ailenin bir üyesi olup çeşitli hastalıklarda bulunan görevleri ile ilgili çalışmalar son yıllarda artmaktadır. SOX2, embriyonik kök hücre faktörü olarak bilinmektedir. Bu kök hücre faktörü hücrelerin farklılaşmasının yanında kanserin oluşum ve gelişiminde oldukça önemlidir. Bu tez çalışmasında bir transkripsiyon faktörü olan IRF5 ve bir kök hücre faktörü olan SOX2' nin prostat kanserindeki rolleri ve protein-protein ilişkisi araştırılmıştır. PC3 insan prostat kanseri hücre kültürü yapılarak, pIRF5 ve pSOX2 plazmidleri kullanılarak IRF5 ve SOX2 proteinleri overekspresyon deneyleri yapılmıştır. Overekspresyon yapılan örneklerde immunopresipitasyon (IP) yapılarak proteinler western blot ile değerlendirilmiştir. IRF5 ve SOX2 overekspresyon yapılan PC3 hücrelerinde migrasyon düzeyleri scratch yöntemi ile incelenmiştir. Prostat kanser hücrelerinde IRF5 ve SOX2 proteinlerinin birbirleri ile ilişkisi IP deneylerinde protein bantları ile gösterilmiştir. Prostat kanseri hücrelerinde IRF5' in hücre migrasyonunu anlamlı derecede azalttığı, SOX2' nin hücre migrasyonunu anlamlı derecede arttırdığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, IRF5 ve SOX2 proteinleri birbirleri ile etkileşimde bulunan iki transkripsiyon faktörü olup prostat kanser tedavisi için yeni sinyal yollarının ve çeşitli ilaç moleküllerinin gelişiminde önemli katkılar sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: CD133, CD44, Kanser İmmünolojisi, Kök Hücre Faktörleri, Prostat Kanseri.

ABSTRACT

DETERMINATION OF IRF5 TRANSCRIPTION FACTOR AND SOX2 STEM CELL FACTOR ASSOCIATIONS IN PROSTATE CANCER CELLS

**Akarçay M. Aydın Adnan Menderes University Graduate School of Health Sciences
Biochemistry (Medicine) Program Master Thesis, Aydın, 2019.**

The Interferon Regulatory Factor (IRF) family is the transcription factors that regulate the immune system of interferons. Interferon Regulatory Factor 5 (IRF5) is a member of this family. SOX2 is known as embryonic stem cell factor. This stem cell factor is important in the formation and development of cancer as well as the differentiation of cells. In this thesis, the role of a transcription factor, IRF5 and a stem cell factor, SOX2 in prostate cancer and protein-protein relationship were investigated. PC3 human prostate cancer cell culture was performed and IRF5 and SOX2 proteins overexpression experiments were performed using pIRF5 and pSOX2 plasmids. Immunoprecipitation (IP) was performed in the samples with overexpression and the proteins were evaluated by western blot. Migration levels in PC3 cells with IRF5 and SOX2 overexpression were examined by scratch method. The relationship between IRF5 and SOX2 proteins in prostate cancer cells is shown by protein bands in IP assays. It was found that IRF5 significantly reduced cell migration in prostate cancer cells and SOX2 significantly increased cell migration. As a result, the IRF5 and SOX2 proteins are two transcription factors that interact with each other, and may contribute significantly to the development of novel signaling pathways and various drug molecules for prostate cancer treatment.

Keywords:. CD133, CD144, Cancer Immunology, Stem Cell Factors, Prostate Cancer.

1. GİRİŞ

Kanser, yılda tahmini olarak 14.1 milyon yeni vaka ve 8.2 milyon ölümlle sonuçlanan heterojen bir hastalık grubudur (Ferlay ve ark, 2015). Klonal gelişim hipotezine göre açıklanan görüş kanserlerin bir tek somatik hücre ya da kök hücresinde başlama, progresyon ve ilerleme evrelerini kapsayan çok aşamalı bir süreçte genetik ve epigenetik değişimlerle olarak ortaya çıktığını savunmaktadır (Ekmekçi, 2018). Dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra kanserden ölümler ikinci sırada yer alır.

Kanseri açıklayabilmek için ökaryotik hücre ve organelleri, genom ve kalıtsal moleküllerin özellikleri, hasarları, onarımları, mutasyonlar ve genetik varyasyonlar, genetik bilginin akışı, apoptozis, sinyal yolları gibi tüm moleküler genetik olayların bilgisine sahip olunması gerekmektedir. İnsan vücudu farklı ve çok sayıda hücre tipinden oluşur. İnsan vücudunda hücre sayısının fazlalığı kadar da kanser çeşitliliği vardır. Prostat kanseri, erkekler arasında görülme oranı en yüksek kanser türüdür. Prostat kanseri başlangıcı, gelişimi ve ilerlemesi, farklı aşamalarda prostatın epitelyumu ve stroması arasında çoklu çevresel ve genetik risk faktörleri ile karsinogenik süreçleri içeren karmaşık olaylar bütünüdür. Teknoloji ve bilimin ilerlemesi ile birlikte tanı ve tedavi yöntemlerinin gelişmesi kanser vakalarının erken teşhisine katkı sağlar. Son yıllardaki araştırmalar, mevcut ilaçların iyileştirilmesine ve her tümör tipine uygun olarak hedeflenmiş tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır.

Kök hücreler sürekli kendini yenileme kapasitesi ile özelleşip aynı zamanda doku ve organlar oluşturmaya hizmet etmektedirler. Bir kök hücre kendi kendini yenileme veya farklılaşma hücre tipine özgü transkripsiyon faktörleri ile kontrol edilmektedir. Kök hücre faktörleri SOX2, OCT4 gibi faktörlerden oluşur. Bu faktörler kanser patogenezinin, kanserin tedavi edilmesine kadar pek çok araştırmada odak noktası olmuştur. Ayrıca son yıllarda kök hücre faktörlerinin hangi proteinler ile etkileşimde olduğu önemli çalışmaları beraberinde getirmiştir.

SOX2 Sry ilişkili olup DNA' ya bağlanan transkripsiyon faktörleri ailesinde yer almaktadır. EKH' lerin kendilerini yenileme özelliği için gerekli olup erken embriyoda veya eşey hücrelerinde ifade edilmektedir. SOX2' nin önemli işlevlerinden biri de OCT4 ve Nanog gen ifadesini düzenlemesidir. SOX2 geni embriyo kök hücrelerin pluripotensi özelliğinin korunmasını sağlamaktadır (Masui ve ark, 2007). Embriyolarda kök hücrelerin varlığının ve kök hücre belirteçlerinin ifadelerinin çalışılması ile birlikte tedavilerde

önemli katkılar sağlamıştır.

İnterferonlar alfa, beta ve gama olarak gruplanmaktadır. Spesifik reseptörlere bağlanmaları üzerine antiviral ve antiproliferatif aktivitelerde sinyal transdüksiyon yolağının aktivasyonuna yol açmaktadır. İnterferonlar tarafından virüs büyümesinin ve hücre proliferasyonunun inhibisyonu, bazıları interferonla indüklenebilir olan kendine özgü proteinlerin aktivitesine bağlı olan çeşitli fizyolojik değişikliklerle ilişkilidir. İnterferonlar, virüsler, patojenler veya tümör hücreleri gibi dış ajanlara karşı organizmanın doğal savunma mekanizmalarını temsil eder. İnterferon düzenleyici faktör (IRF) transkripsiyon faktörü ailesi memelilerde dokuz elemandan oluşmakta olup, bunlar orijinal tip I interferonların indüksiyonundaki rolleri için tanımlanmıştır (Miyamoto ve ark, 1988). IRF' nin ekspresyon kaybı, insan kanserlerinde gözlemlenmekte olup, kanserli dokuda aşırı eksprese edilmektedir (Lowther ve ark, 1999; Higgs ve ark, 2008).

Bu araştırmada bir transkripsiyon faktörü olan IRF5 proteininin kök hücre faktörlerinden SOX2 ile ilişkisini araştırılması planlanmış ve prostat kanseri tedavisinde yeni yaklaşımların ortaya çıkması konusunda odaklanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser ve Kanserin Moleküler Genetiği

Kanser, düzensiz hücre büyüme özelliği ile bilinen ve genetik mutasyonların sınırsız bölünme potansiyelinin oluşturduğu bir hastalıktır (Vogelstein ve ark, 2013). Bu genetik mutasyonlar, hücre proliferasyonu, anjiyogenez, invazyon ve apoptozdan kaçma ile ilgili çeşitli sinyal yolları ile birlikte tümör büyümesini yönlendirir (Hanahan ve ark, 2000). Onkogenik transformasyona sıklıkla hücre büyümesini desteklemek için hücrenin karbon düzenlemesinin aynı anda metabolik olarak yeniden programlanması eşlik etmektedir (Vander ve ark, 2017).

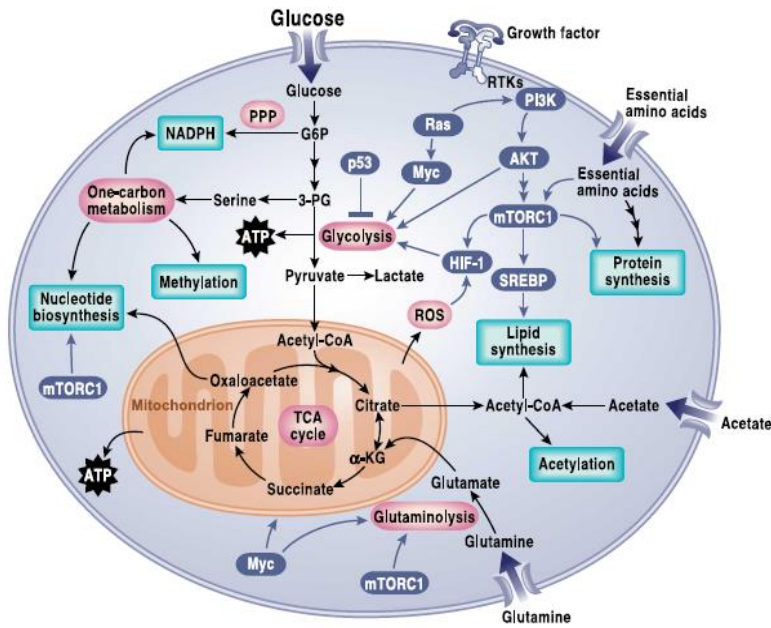
Hastalığa sahip olmayan bir kişide vücudun ihtiyacına göre hücreler bölünüp çoğalırlar, fonksiyonlarını yerine getirdikten sonra yok olurlar. Eğer hücreler sürekli bölünürler ise oluşan bu hücreler dokuda anormal büyümeye yol açarak tümör hücrelerini oluşturur. Hücre çoğalması kontrolsüz olarak bulunduğu bölgeden başka bir dokuya yayılım gösteriyorsa malign olarak tanımlanmaktadır (Ekmekçi, 2018). Metastaz yapmış tümör hücreleri kanserin tedavisini zorlaştırmaktadır. Kanser hücreleri büyümenin azalmış kontrolü, vücudun diğer kısımlarına yayılma gibi özellikler ile belirlenir. İnsanda kanserin gelişimi uzun yıllar içerisinde genetik hasarlar çeşitli kimyasallar, radyasyon veya virüsler gibi çevresel faktörlerin etkisiyle ortaya çıkabilmektedirler. Protoonkogenler normal hücre döngüsünü düzenleyen genler olarak beş gruba ayrılabilir. Bunlar; büyüme faktörleri, büyüme faktör reseptörleri, sinyal iletiler, transkripsiyon faktörleri ve apoptoz düzenleyicileridir. Protoonkogenler evrim süresince korunmuş genlerdir (Ekmekçi, 2018). Onkogenler kansere neden olan genler olup hücrelerde normal hücre bölünmesinin pozitif kontrolü ile ilgili protoonkogenlerin mutasyonla aktive olmuş formlarıdır. Onkogenler ilk kez tümöre yol açan virüslerde saptanmışlardır. Bilinen onkogenlerin büyük bir bölümü; transkripsiyon faktörlerini, büyümeyi düzenleyen ve hücrelerin diğer hücreler arasındaki etkileşimlerde rol oynayan proteinleri kodlamaktadır. Bazı onkogenler hatalı sinyal bağlayıcı yerleri olan yüzey reseptörlerini kodlar, böylece tirozin kinaz aktivitesinin düzenlenmesi bozulur. Onkogen oluşumuna neden olan mutasyonlar baskındır ve kanser tipine göre değişse de bazı genlerin mutasyonları daha sık görülebilir. Tümör baskılayıcı genler, normal koşullarda hücre bölünmesini kısıtlayan proteinleri kodlarlar. P53 geni kanser gelişimini durdurmada görevli olup hücre döngüsü ve apoptozu düzenleyen

transkripsiyon faktörüdür. Retinoblastoma geni hücre döngüsünü düzenleyerek hücre döngüsünün temel transkripsiyon faktörlerine bağlanıp baskılayarak hücre bölünmesini durdurur. Bu genlerdeki mutasyonlar tümör oluşumuna yol açar. Kanseri hücreleri büyük çekirdek, daha az sitoplazma, hücresel yapı düzensizliği, hücre zar proteinlerinde değişiklikler içerirler (Ekmekçi, 2018). Kanseri hücrelerinin belirgin özelliği apoptoza direnç göstermesidir. Apoptoz için sinyal genellikle dışarıdan, bir yüzey reseptörü aracılığıyla gelmektedir. Kaspaz denilen proteazlar apoptozu başlatan sorumlu enzimlerdir, apoptozu tetikleyen Bcl2 ve Bax proteinleri gibi gen ürünlerinin düzenlenmesi ile kontrol edilirler. Apoptotik yolağa giren hücrelerin bazı yapısal ve biyokimyasal değişiklikleri ilk olarak hücre iskelet yapısının parçalanmasıyla küçülerek diğer hücrelerden ayrılır. Kromatin ipliği yoğunlaşır ve sitoplazmik içerikleriyle beraber sitoplazma zarının parçalanmasıyla ortaya çıkan parçalar makrofajlarla ortadan kaldırılır. Hücreleri apoptotik yolağa sürüklenmesini sağlayan program çeşitli sinyallerle proapoptotik (Bax, Bak, Noxa gibi genleri) ve antiapoptotik (Bcl-2, Bcl-X, genleri gibi.) genlerle düzenlenir. Her iki apoptotik yolak kaspaz denilen ve hücrenin yıkımını kontrol eden proteolitik enzimi aktive eder. Kaspazlar, çekirdek zarının altındaki nükleer lamina proteinleri ve hücre içi iskelet protein bileşenleri çeşitli makromolekülleri peptit bağlarından kopararak ayırır (Ekmekçi, 2018). Kanseri hücrelerinin metastazında proteaz ve büyüme faktörleri önemli rol oynar. Bağışıklık sistemimiz tümör oluşumu, ilerlemesi, metastazında bariyer görevi görür. Kanseri hücreleri sürekli olarak yüzey antijenlerini değiştirerek dolaşımdaki sitotoksik T hücreleri doğal öldürücü hücreler ve makrofajları uyararak bağışıklık yanıtı oluştururlar (Ekmekçi, 2018). Kanseri insidansı toplumda coğrafi bölge, yaş ve cinsiyete göre değişiklik gösterir (Devesa ve ark, 2005). Pek çok kanseri plazma veya serumda ölçülebilen enzim, protein ve hormonların üretimindeki anormallikler ile ilişkilidir. Bu moleküller tümör belirteçleri olarak bilinir. Örneğin Prostat kanserinde PSA tümör belirteci olup prostat kanseri hakkında bilgi vermektedir.

2.1.1. Kanseri Metabolizması

Metabolizma bir hücrenin biyoenerjetik süreci yürütmesini sağlayan tüm biyokimyasal süreçleri kapsarken metabolik transformasyon ise kansere neden olan mutasyonlar ile hücresel metabolizmadaki değişiklikleri kapsamaktadır. 1921’ de Otto Warburg, tümör hücrelerinin oksijenli solunumla aşırı miktarda glikoz kullandığını ve

laktat oluşturduğunu gözlemlemiştir. Hızla büyüyen tümör hücrelerinde yüksek oranda glikoz alımı ve glikolizis artışı olduğu TCA döngüsünde faaliyet artışı, glutamin alımı, lipid ve nükleik asit sentezi artışı gibi bazı özgün metabolik olaylara sahip olduğu gösterilmiştir. Çünkü hızla çoğalacak olan hücrelerin sonraki hücrelere kesintisiz olarak tüm biyomoleküllerin miktarını iki kat artırmaları ATP, NADH ve NADPH gibi koenzimleri sentezlemeleri için gereklidir (Ekmekçi, 2018). Hem glutamin alımı hem de glutaminaz aktivitesi biyomoleküller tarafından uyarılarak, amino asit sentezine katkıda bulunan TCA döngüsünün transaminasyon reaksiyonları için glutamat sağlar. Bu glikolitik yoldaki artış, glikolitik ara ürünlerin çoğalan hücrelerin metabolik isteklerini yerine getirmek için yardımcı yollar sağlamasına izin verir (Lunt ve ark, 2011). NADPH, glutatyon gibi antioksidan sistemlerine katılarak ve hücrenin apoptozdan kaçmasına izin vererek kanserde merkezi bir rol oynar (Traverso ve ark, 2013). İnsan serumunda çok bulunan glikozu, glikolizisle aşama aşama parçalayarak hem ATP' yi hem de NADH, pürivik asit gibi molekülleri oluşturmakta, ayrıca aminoasitlerin ve nükleotidlerin iskeletini oluşturacak karbonları hızlı şekilde sağlamaktadır (Şekil 1).



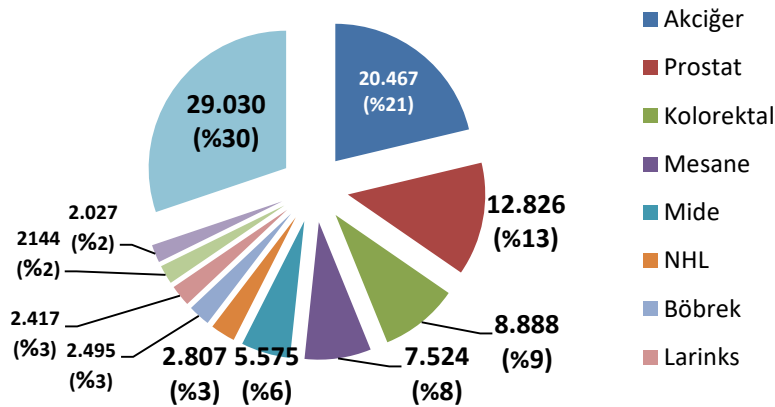
Şekil 1. Kanser metabolizmasını düzenleyen sinyal yolları (DeBerardinis ve ark, 2016).

Tümör hücreleri, nükleotid, protein ve lipid sentezi ile sonuçlanan anabolik bir büyüme programının anormal aktivasyonuna sahiptir. P53 gibi tümör baskılayıcıların kaybı veya Myc gibi onkogenlerin aktivasyonu, metabolik genlerin transkripsiyonel

düzenlenmesi ile anabolizmayı ilerletir. Metabolizma reaktif oksijen türlerini (ROS), asetilasyonu ve metilasyonu düzenleyerek sinyal verir. Normal hücrelerde büyüme faktörlerine bağlı kontrollü olarak artan glikolitik metabolizma ürünleri, kanser hücrelerinde bu sinyal metabolizmasında rolü olan bazı mutant ürünler PI3K ya da PTEN delesyonu nedeniyle kontrolsüz şekilde, AKT' nin sinyal yollarınca sürekli oluşturulur. Her bir glikozdan 36 ATP oluşturan mitokondriyal oksidatif fosforilasyonla karşılaştırıldığında aerobik glikoz ile yalnızca 2 ATP elde edilir (Ekmekçi, 2018). Pek çok hücre olayının düzenleyicisi olduğu bilinen P53 proteinin mitokondriyal oksidatif fosforilasyon, glikolizis, yağ asit oksidasyonu gibi hücresel metabolizma olaylarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Şekil 1).

2.2. Prostat Kanseri

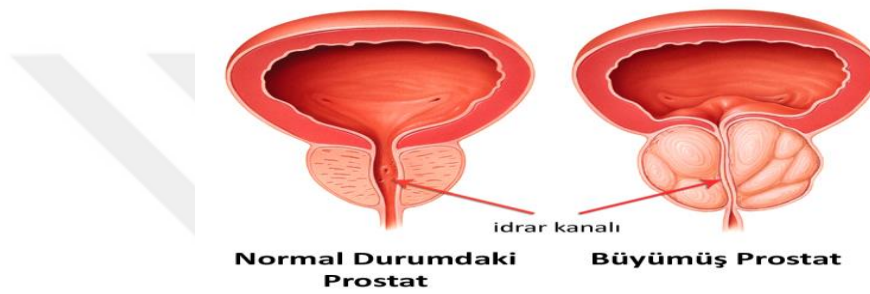
2009' da Birleşmiş Devletler'deki erkek kanserleri arasındaki sıklığı % 25 olarak belirlenmiştir. Afrika kökenli erkeklerde prostat kanseri, en sık görülen ve en yüksek ölüm oranına sahip kanser türü olurken; Asya yerlilerinde en az sıklıkta görülen kanser tipi olduğu yönünde bulgular yapılan çalışmalarda yer almaktadır (Verma ve ark, 2011). Prostat kanseri, özellikle endüstrisi gelişmiş ülkelerde görülen önemli bir sağlık problemi olmaktadır. Erkeklerde, akciğer kanserinden sonra gelen kansere bağlı ölüm nedenidir (Szliszka ve ark, 2013).



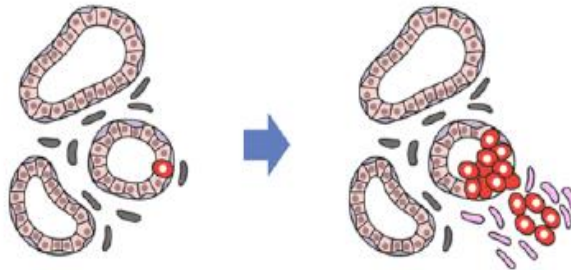
Şekil 2. Erkeklerde En Sık Görülen Kanserlerin Toplam Sayısı ve Yüzde Dağılımları

(<https://www.saglik.gov.tr/Eklenti/8635,kanser-istatistikleridocx.docx?0>)

Prostat kanseri, prostat bezindeki çoğalma ve apoptoz arasındaki dengenin bozulmasıyla, organ boyutunun anormal olarak büyümesi ile oluşur. İnsan prostat kanseri, prostat epitel hücresi kaynaklanır (Xin, 2013; Wang ve ark, 2013). Prostat kanseri başlangıcı, gelişimi, ilerlemesi çevresel ve genetik risk faktörleri, karsinojenik süreçleri içerirler (Hayward ve ark, 1997). Prostat kanserini tıp tarihine ilk olarak 1817 yılında Doktor George Langstaff kazandırmıştır. İlerlemiş prostat kanserli hastalarda androjenlerin kan dolaşımından uzaklaştırılması için orşiektomi ameliyatını ilk kez 1941 yılında Charles Brenton Huggins uygulamıştır (Abate-Shen ve ark, 2000; Parkin, 2001; Kumagai ve ark, 2007).



Şekil 3. Normal prostat dokusu ile büyümüş prostat dokularının karşılaştırılması.



Şekil 4. İnsan prostat kanseri gelişiminin potansiyel paternlerini gösteren diyagram (Tatsuo ve ark, 2014).

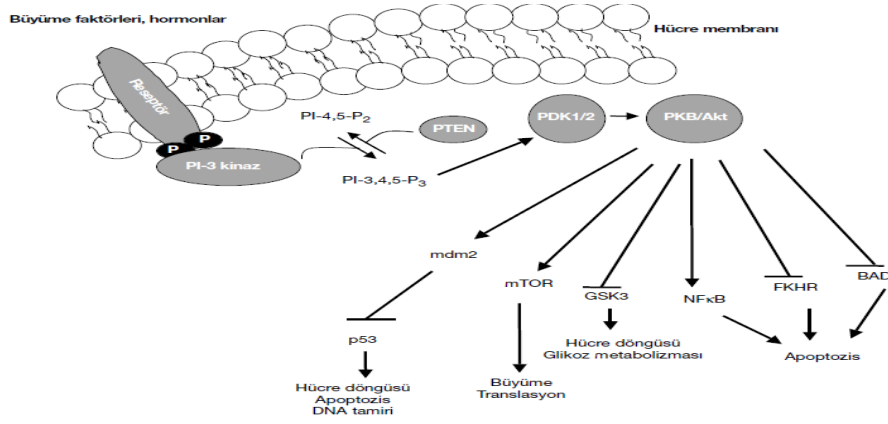
Primer prostat kanseri multifokal olarak kabul edilmesine rağmen, ilerlemiş prostat kanseri monoklonal olarak kabul edilmektedir (Shen ve ark, 2010). Kanser ilişkili stromal hücreler onkogenik süreçlerde çoğalırlar (Strand ve ark, 2010). Tümör büyümesi ve prostat kanseri hücrelerinin bakımı, hastalığın erken evrelerinde androjen hormonuna bağımlı olup daha sonraki aşamalarda tümör ilerlemesi androjen hormonundan bağımsız gelişmektedir (Lin ve ark, 2012). Prostat kanseri özellikle androjen reseptörü hedefleyen ajanlara çeşitli

cevaplar veren bir hastalıktır (Fraisie ve ark, 2014). Prostat kanseri, prostat bezi içerisinde sınırlı olabileceği gibi çevresinde bulunan lenf dokularına da yayılabilmektedir.

2.2.1. Prostat Kanseri Patogenezi

Prostat kanseri için risk faktörleri arasında yaş, ırk, diyet, hormonal, ailesel faktörler yer almaktadır. Prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesi androjenlerden etkilenmektedir. Androjen karşıtı tedaviye rağmen yenileyen tümörlerde, bu tümörlerin büyümeye devam etmeleri androjen reseptörleri tarafından düzenlenen gen ürünlerine bağlıdır. Diğer mutasyonlar genellikle onkogenik PI3K / AKT sinyal yolağının aktivasyonuna yol açar; bunların en yaygını PI3K aktivitesini durduran tümör baskılayıcı gen olan PTEN genini inaktive eden mutasyonlardır. PI3K / AKT ve STAT3 sinyal yollarının aktivasyonunun, prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonu için önemli yer tutmaktadır. Birçok prostat kanseri hücresi aşırı AKT aktivasyonundan türeyen büyümeyi destekleyen sinyallere bağlıdır (Şekil 5).

NFkB, apoptoz ve hücre döngüsünde yer alan genleri hedef alarak tümör büyümesini kolaylaştıran diğer faktördür. NFkB ailesi, transkripsiyon faktörlerini oluşturmak için heterodimere sahip p50 (p105'ten), p52 (p100'den), p65 (RelA), RelB ve c-Rel olmak üzere beş alt birimden oluşur. Her bir NFkB dimer içinde bulunan alt birimler, etkileşimli proteinlerde farklı işlevsel alanların varlığına bağlı olarak bu kompleksin biyolojik aktivitesini belirler (Chen ve ark, 2004). Sadece RelA, RelB ve cRel diğer transkripsiyon faktörleri ve koaktivatörler ile etkileşime izin veren C-terminal transaktivasyon alanlarını içerir (O'Dea ve ark, 2010). NFkB' nin en yaygın aktive edici formu, aktive edilmiş makrofajlarda mevcut olduğu gösterilen RelA: p50' dir (Ciesielski ve ark, 2002). AKT ve STAT3 sinyal yollarının kanser hücrelerinin proliferasyonuna, invazyonuna ve metastazına aracılık etmektedir (Şekil 5).



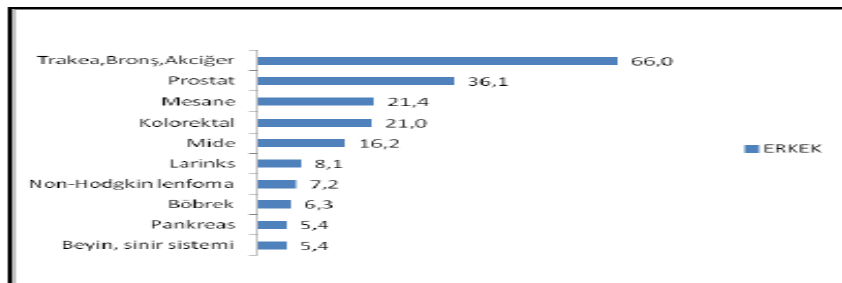
Şekil 5. Protein kinaz B/AKT yolunun işlevleri (Hanahan ve ark, 2000).

2.2.2. Prostat Kanseri Epidemiyolojisi

2012 yılında yaklaşık 1 milyon erkeğin prostat kanseri teşhisi konmuştur ve bu erkeklerin % 70' inden fazlası yüksek gelirli ülkelerden gelmektedir. Yaş standardize olmuş insidans oranları Avustralya ve Yeni Zelanda'da en yüksektir. Karayipler ve Afrika gibi kara popülasyonları olan ülkelere en yüksek ölüm oranlarına sahiptir (Ferlay ve ark, 2015).

Kanser insidansı yaş, ırk, coğrafik faktörler ve bireyin genetik özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Coğrafi değişiklikler çoğu zaman çevre faktörlerindeki farklılıklara bağlıdır (Jayadevappa ve ark, 2011).

Tablo 1. Erkeklerde görülen ilk 10 kanser (Türk Halk Sağlığı Kurumu, Kanser Daire Başkanlığı, 2009).



Prostat kanserinin en düşük insidansı aynı zamanda diyet, yaşam tarzı ve çevresel faktörlerle de ilişkili olan Asyalı erkeklerde bulunur (Akaza ve ark, 2011). Bazı çalışmalarda, Afrika kökenli Amerikalılarda Bcl2 gibi hücre apoptoz genlerinde ve EphB2

gibi tümör baskılama genlerinde daha yüksek oranlarda varyasyonlar görülmüştür (Whitmann ve ark, 2010; Wu ve ark, 2012). Afrika kökenli Amerikalıların prostat kanserlilerin Avrupa kökenli Amerikalılara kıyasla biyolojik ve genetik olarak daha agresif olduğunu göstermektedir (Wu ve ark, 2012).

2.2.3. Prostat Kanseri Risk Faktörleri

2.2.3.1. Yaş

Prostat kanseri insidansı yaşla ilişkilidir; yaşa göre insidans oranları 50 yaşından itibaren hızla yükselmektedir (Tablo 2). Daha yaşlı erkeklerin yüksek riskli prostat kanseri tanısı koyma olasılıkları daha yüksek olup sağkalım daha düşüktür. Sonuç olarak yaşla birlikte prostat kanseri tanısı konmuş erkeklerin sayısında artış gözlenmektedir.

Tablo 2. SEER Kanseri İstatistikleri İncelemesi 1975-2012

Şimdiki yaş	10 yıl	20 yıl	30 yıl
30	0.01	0.35	2.54
40	0.34	2.57	8.18
50	2.31	8.12	13.73
60	6.41	12.59	14.92
70	7.73	10.64	N/A

2.2.3.2. Ailesel geçmiş

Pozitif bir aile öyküsü, bir erkeğin prostat kanseri riskini önemli ölçüde etkiler. Risk tahminleri, prostat kanseri tanısı konan yakın derece akrabasına sahip bir erkek risk taşımaktadır. Prostat kanserinin aile öyküsü prostat kanseri riski için önemli risk faktörüdür (Addo ve ark, 2010).

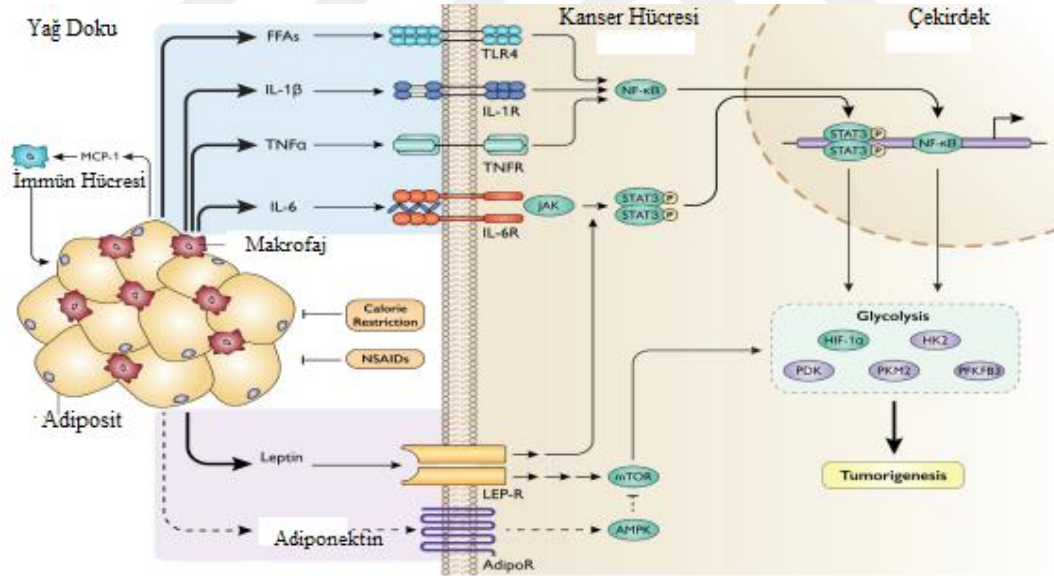
2.2.3.3. İnsülin benzeri büyüme faktörleri

İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I), mitotik ve antiapoptotik bir polipeptid etkileri prostat kanserinde önemli bir rol oynamaktadır. IGF tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve apoptozunu düzenler. IGF-1, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) sinyal yolunu aktive eder, bu da enerji üretmektedir bu enerjiyi proliferasyonun biyosentez

ihtiyaçlarını karşılamak için kullanır. Yapılan alışmalardan, IGF-I ile kanser riski arasında doğrudan bir ilişki olduğunu göstermiştir ve bu çalışma sonucunda prostat kanser riski artmış plazma IGF-I düzeyi ile arttığı bulunmuştur (Gennigens ve ark, 2006).

2.2.3.4. Obezite

Obezitenin, prostat gelişiminde rol oynayan metabolik olayların ve steroid hormonlarının onkogenезin değişken dolaşım düzeylerine sahip olması nedeniyle prostat kanseri için bir risk faktörü olmaktadır. Obezite ayrıca adipoz dokunun endokrin fonksiyonlarını da bozmaktadır (Steven ve ark, 2017). Özellikle fiziksel aktivite olmadığında obezitenin özgül metabolik sonucu insülin açısından insüline azalmış doku cevabıdır. Bu durum glikoz alımının azalması ile sonuçlanır. Bu insülin direnci, büyümeyi hızlandıran bir hormon olan ve böylelikle kanser gelişimi, ilerlemesi için biyolojik olarak bir risk faktörü olan yükselmiş kan seviyelerine yol açar (Kaaks ve ark, 2010).



şekil 6. Obezite ilişkili yağ dokusu disfonksiyonunun ve inflamasyonun kanser hücre metabolizmasına etkisi (Steven ve ark, 2017).

2.2.3.5. Diğer faktörler

Tütün ve sigara dumanı, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı' na (IARC) göre, 60' ın üzerinde çok sayıda kimyasal maddeyi içermektedir. Sigara içenlerin yüksek seviyelerde dolaşımdaki testosteronu olduğu bulunmuştur. Dolaşımdaki yüksek testosteron prostat kanseri riskini artırıp kanserin ilerlemesine katkıda bulunmaktadır. Alkol tüketimi, insan kanserleri için en önemli risk faktörlerinden biri olup aynı zamanda potansiyel olarak önlenabilir faktörlerden biri de olmaktadır (Rizos ve ark, 2010). Buna dair elde edilen alkolün etkisinin, etanol metabolizması, folat metabolizması ve DNA onarımı için enzimleri kodlayan genlerdeki çoklu değişikliklerle düzenlendiğini de göstermektedir (Rohrmann ve ark, 2008).

Doymuş hayvansal yağların yüksek kalori alımı, artan testosteron düzeyine bağlı olarak yüksek prostat kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir (Venkateswaran ve ark, 2010; Lophatananon ve ark, 2010). Doymuş hayvansal yağ ve prostat kanseri riskleri arasındaki olası biyolojik mekanizmalar bulunmaktadır:

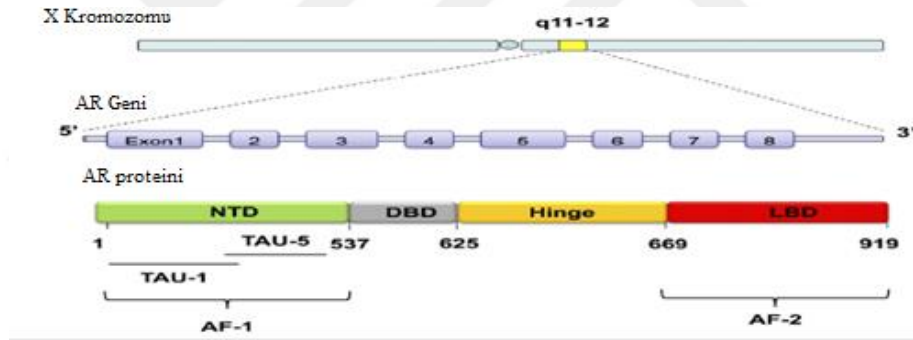
- (a) yüksek kalori alımı, bazal metabolizmayı ve insülin büyüme faktörlerini, tümör büyümesini artırır,
- (b) lipit metabolizması serbest radikaller üretir,
- (c) androjen ile prostat karsinogenezini teşvik eder (Arab ve ark, 2013).

Aynı zamanda süt ve süt ürünleri de doymuş hayvansal yağ seviyesinin artmasına katkıda bulunur. Kalsiyum metabolizmasındaki değişiklikler prostat kanseri hücrelerinde çoğalma, farklılaşma ve hücre ölümüne neden olabilmektedir (Raimondi ve ark, 2010; Hori ve ark, 2011).

2.2.4. Prostat Kanseri Androjen Reseptörü (AR)

Androjen reseptör geni, Xq11–12 kromozomu içinde yer alan ve sekiz eksonu olup molekül ağırlığı 110 kDa' dır (Heinlein ve ark, 2002). DNA üzerindeki hormon tepki elementlerine bağlanır. Çoğalma ve farklılaşma tepkilerinin düzenlenmesinde rol oynayan genleri düzenler. Androjen reseptörü değişken bir sayıya sahip bir N-terminal alanı, poliglutamin ve poliglisin tekrarları, iyi korunmuş bir DNA bağlama bölgesi ve bir ligand bağlayıcı alanı olmak üzere etki alanlarını içermektedir (Şekil 7). DNA ve ligand bağlayıcı bölgeler, bir nükleer lokalizasyon sinyali barındıran bir alan ile ayrılır. AR, prostat

bezinin normal gelişiminde kritik bir rol oynar (Sugimura ve ark, 1986). AR, transkripsiyon faktörlerinin nükleer reseptör familyasının bir üyesidir (Chang ve ark, 1988). Prostat hücreleri normal büyümesi için testosteron ve 5 α -dihidrotestosteron (DHT-A) şeklinde androjen uyarımını gerektirir. AR, aktif androjen dihidrotestosteronun (DHT) bağlanmasını takiben çekirdeğe translokasyona uğrayan bir transkripsiyon faktörüdür. Kompleks AR androjen oluştuktan sonra, çekirdeğe taşınır ve androjen yanıtı genlerinin transkripsiyonunda rol alır (Heinlein ve ark, 2004). AR androjen kompleksi hem normal hücrelerinde hem de prostat kanserinde, androjenik yanıtlara androjen reseptörü tarafından başlatılan sinyaller aracılık ederek genlerin ekspresyonunu düzenler. Böylece hücre proliferasyonuna, apoptozuna ve farklılaşmasına neden olur (Litvinov ve ark, 2003). Prostat kanseri hücrelerindeki ekspresyonu, steroid ve peptit hormonları tarafından düzenlenir. AR, ligand kaynaklı transkripsiyon faktörü, primer prostat kanserinde metastazlarda eksprese edilir. Programlanmış hücre ölümünün androjenik düzenlenmesi, kullanılan tümör modeline bağlıdır (Brodin ve ark, 1999).



Şekil 7. Androjen reseptörü (AR) geninin ve proteininin şematik diyagramı (Pakula ve ark, 2017).

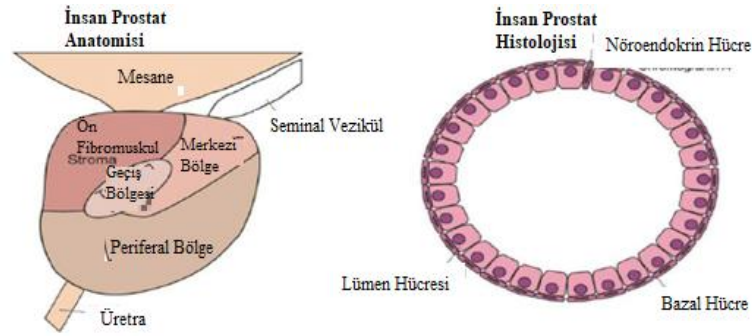
2.2.4.1. AR ifadesinin ve spesifik hücresel fonksiyon düzenlenmesi

Prostat kanseri çalışmalarında çok sayıda androjene duyarlı hücre hattı vardır ve AR pozitif hücre hatları androjenlerle tedaviden sonra farklı çoğalma tepkileri gösterir. PTEN fonksiyonunun kaybı AKT' nin aktivasyonuna yol açar. Bu şekilde etkilenen tümör hücreleri, hücre dışı sağkalım faktörlerine bağımlılıktan kaçıp ve apoptozu uyaran ajanlara dirençli olabilir (Cantley ve ark, 1999). Prostat ve diğer kanserlerdeki PTEN mutasyonlarının sıklığı, PI3K / AKT yolunun kanser hücrelerinin gelişimi ve çoğalmasında

etkili olan sinyallerin önemini vurgular (Cantley ve ark, 1999). PI3K / AKT sinyalleme prostat kanserinde dominant bir büyüme faktörü sağkalım yolu olarak tanımlanmıştır ve bu PI3K aktivasyonu veya PTEN inhibisyonundan kaynaklanmaktadır (Lin ve ark, 1999; Li ve ark, 2001). AKT fosforilasyonu, tümör baskılayıcı fosfataz ve tensin homologunun (PTEN) ekspresyon eksikliğinin bir sonucudur. Androjenler, prostat kanseri hücrelerinin göçünün önemli düzenleyicileri olarak rol alır ve bu süreç metastaz gelişimini başlatmaktadır. Androjenler LNCaP hücrelerinde daha yüksek bir seviyede ifade edilir (Krongrad ve ark, 1991). LNCaP hücreleri androjen bağımlı prostat hücreleridir. LNCaP hücreleri uzun bir süre boyunca steroid tükenmiş ortamda kültüre edildiğinde, AR gen ve protein seviyeleri giderek artar (Kokontis ve ark, 1994; Culig ve ark, 1999). Bu durum AR' nin düşük derişimlerde androjenler ve diğer steroidler ile etkili reseptör stimülasyonuna yol açar (Zhao ve ark, 1997). Prostat kanserinde AR mutasyonları ile ilgili ilk çalışmalar, LNCaP hücreleriyle gerçekleştirilmiştir. Bu mutasyon steroidler tarafından AR bağlanma afinitesine ve AR' nin daha yüksek aktivasyonuna yol açar (Veldscholte ve ark, 1992). Mutasyonlu AR ile enfekte olmuş hücreler, androjenden yoksun ortamlarda bir büyüme avantajı elde etmişlerdir.

2.3. Prostat Bezi

Prostat ilk olarak 1536 yılında anatomist olan Niccolo Massa bahsetmiş ve 1538 yılında ise anatomist Andreas Vesalius tarafından resmedilmiştir (Hellerstedt ve ark, 2002). Erkek üreme sisteminin ekzokrin bir organıdır. İnce bir fibromüsküler tabaka ile kaplıdır. Ön bölge, geçiş bölgesi, merkezi bölge ve periferik bölge olmak üzere dört bölgeden oluşur (Şekil 8). Yapısı tubuloalveolar bezlerden ve fibromuskuler stromadan oluşur. Yan ve arkada periferik bölge bu alan prostatın % 75 ini kapsamaktadır. Periferik bölge dışında merkezi bölge ve geçiş bölgesidir. Geçiş bölgesi sağlıklı bir prostatta küçüktür. Yaşa bağlı olarak ortaya çıkan benign prostat hiperplazisi (BPH) geçiş bölgesi kaynaklıdır. Prostatın ana işlevi hafif asidik olan prostat sıvısını salgılamak ve spermin hacimce % 20' sini oluşturmaktır. Prostat bezinin büyümesi, gelişmesi ve işlevlerini sürdürebilmesi için androjen hormonlarına gereksinim vardır.



Şekil 8. İnsan prostat anatomisi ve histolojisi şeması (Abate-Shen ve ark, 2000).

2.4. Prostat Spesifik Antijen

Prostat Spesifik Antijen (PSA), 1986 yılında prostat kanseri tanımlı hastaların teşhis edilmesinde Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onay almıştır. Prostat kanserinin tanısında ise 1994 yılında kullanılmaya başlanmıştır (Wolf ve ark, 2010). PSA, prostat epitel hücreleri tarafından salgılanan bir glikoprotein olup tek zincirli yapıdadır. Kromozom 19q13.4 yerleşimli bir gen olan kallikrein 3 (KLK3) geni tarafından kodlanmaktadır. 33 kDa moleküler ağırlığında olup 240 aminoasitlik, 4 intron ve 5 ekzondan oluşur. Prostata özgü olup glikoprotein yapısındaki serin proteaz aktivitesine sahiptir (Balk ve ark, 2003). PSA geninin promotor bölgesinde altı kilobazlık androjene duyarlı bölge bulunmaktadır (Sokoll ve ark, 1997). PSA 261 aminoasitten oluşur ve preproprotein olarak prostat epitel hücreleri tarafından sentezlenir. Prostatta bulunan salgı kesecikleri ve kanallardaki sekretuar epitelyum hücrelerce üretilir. 261 aminoasit içeren PSA' dan 17 aminoasit içeren öncü dizinin ayrılması ile inaktif proPSA oluşur (Kumar ve ark, 1997). ProPSA' nın human kallikrein 2 (hK2) tarafından kesilmesiyle ise 237 aminoasitlik aktif PSA oluşur (Darson ve ark, 1997; Mikolajczyk ve ark, 2001). PSA molekülünün içeriğinde 10 sistein ünitesi ve 5 disülfid bağı bulunmaktadır. PSA enziminin aktif bölgesinde histidin, aspartat, serin aminoasitleri yer almaktadır (Stamey ve ark, 1987). Prostat epitel hücrelerinde sentezlenen proPSA ekzositoz yoluyla seminal lümeneye salınır lümen içerisinde proPSA, aktif PSA' ya dönüşür. Seminal sıvı içerisinde aktif PSA proteolize uğrayarak inaktif PSA' ya dönüşebilir. PSA ayrıca kan dolaşımına girer ve dolaşımdaki yükselmesi prostat hastalıklarının göstergesidir. Dolaşımdaki PSA seviyesi, prostatın büyüklüğü ile orantılıdır ve ayrıca BPH' de de yükselebilir (Diamandis ve ark, 1997).

2.5. İnterferonlar

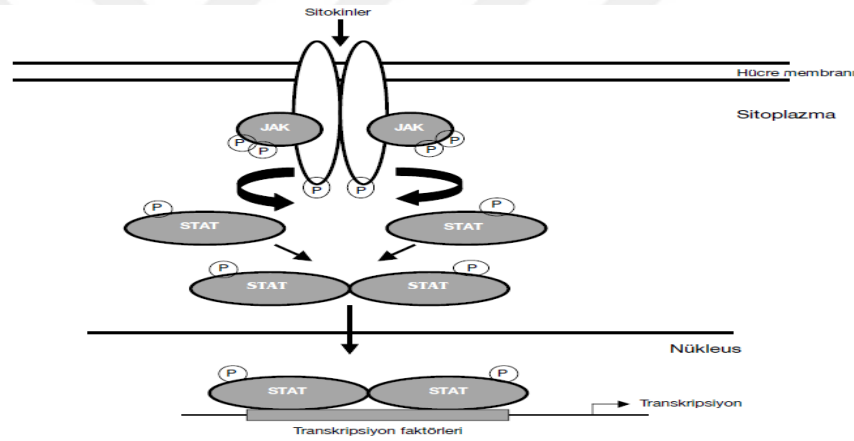
İnterferon ilk olarak Nogano ve Kojima tarafından 1954' te virüs önleyici bir faktör olarak bulunmuştur. 1957' de İngiliz bakteriyolog Alick Isaacs ve İsviçreli mikrobiyolog Jean Lindenmann tarafından keşfedilmiştir. İnterferonlar özgül hücreler tarafından patojenlere karşı cevap olarak bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilir. Bir hücrenin virüs saldırısına uğraması, interferon üretimine ilişkin depolanmış bilgiyi taşıyan DNA' sındaki bir geni aktif duruma getirir; hücre bir süre sonra az miktarlarda interferon üretmeye başlar. İnterferonlar antiviral ve antiproliferatif etkinliğe sahiptirler. İnterferonlar vücut hücrelerinin çoğunluğunca sentezlenir, belirli bir türe özgüdür fakat insanların tedavisinde kullanımı için insan hücrelerinden elde edilmesi gerekmektedir. İnsan immün yanıtta önemli rol oynar. İnterferonlar doğal olarak oluşan sinyal proteinleri ailesidir. Virüsle enfekte olan hücrelerden üretilen interferonlar, enfekte olmamış hücrelerin reseptörlerine bağlanarak bu hücreleri uyarır ve bu virüse karşı direnç oluşturmaktadır (Ryff ve ark, 2007).

İnterferonların hücrelerdeki faaliyetlerini gösterme yeteneği hücre üzerindeki interferonu tanıyabilen reseptörlerin varlığına bağlıdır. İnterferon reseptörleri IFNAR1, IFNAR2 olmak üzere en az iki ayrı alt birimden oluşan tip I IFN ve tip II IFN reseptörleri vardır. Tüm tip I interferonlar, tip I IFN reseptörü olarak bilinen insan hücrelerinin yüzeyinde ortak bir reseptöre bağlanır. Tip I IFN reseptörü, IFNAR1 ve IFNAR2 alt birimleri sırasıyla tirozin kinaz 2 (TYK2) ve Janus aktive kinaz (JAK1) ile ilişkilidir. IFN gama, tip II IFN reseptörü olarak bilinen ayrı bir hücre yüzeyi reseptörüne bağlanır. Bu reseptör, sırasıyla JAK1 ve JAK2 ile ilişkili olan iki alt birim, IFNGR1 ve IFNGR2' den oluşur. Tip I IFN reseptörü ile ilişkili olan JAK' ların aktivasyonu, STAT2 ve STAT1' in tirozin fosforilasyonu ile sonuçlanır (Şekil 9).



Şekil 9. Tip1 interferon reseptör kompleks modeli (Pestka ve ark, 2004).

IFNa reseptör kompleksi, iki farklı zincirden, IFNaR1 ve IFNaR2' den oluşur. Ligand IFNa, iki zincir kompleksine bağlanan bir monomerdir. IFN-a' nın komplekse girmesi üzerine, STAT2 IFNaR2' ye bağlanır ve STAT1' i alır. STAT1 ve STAT2 fosforile edilir, nükleusa transloke edilir. IFNGR1 alt birimi, IFN gama reseptörleri durumunda JAK1 ile birleşirken, JAK2, IFNGR2 ile yapısal olarak birleşir. Reseptör aktivasyonu, reseptör alt birimlerinin yeniden düzenlenmesi yoluyla gerçekleşen tipI ve tipII IFN aracılı sinyallemede ilk adımdır. Bunun ardından otofosforilasyon ve ilgili JAK' ların aktivasyonu, klasik JAK STAT sinyal yollarının aktivasyonu ile sonuçlanır. Her sinyal yolunun aktivasyonuna özgü transkripsiyon faktörlerinin üretimi takip eder. Bu transkripsiyon faktörleri çekirdeğe translokasyon yapar ve IFN ile uyarılmış yanıt elemanlarına (ISRE) ve IFN-gama aktive edilmiş bölgeye (GAS) elemanlarına bağlanır (Bach ve ark, 1997).

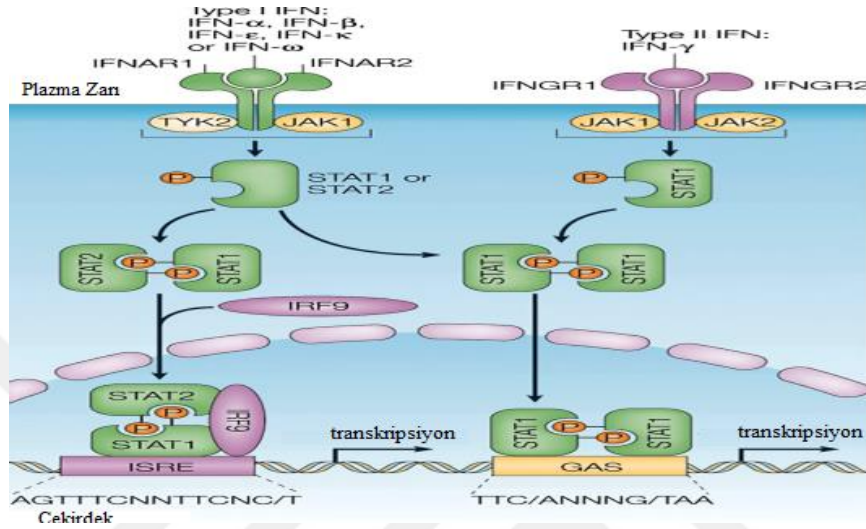


Şekil 10. JAK/STAT yolunun aktivasyonu (Bowman ve ark, 2000).

2.5.1. İnterferonlarda Sinyal İletimi

İnterferonlar aktivitelerini uygulamak için hücrelerin interferonun dış sinyalini algılamasına izin verip daha sonra iç kısımda transfer özelliğine sahiptir. Böylece hücrenin interferonla indüklenebilir proteinleri üretebildiği özgül membran reseptörlerine bağlanır. Bir reseptör iki alt birimden oluşur. Bir araya geldiğinde, bu iki alt birim gerçek interferon reseptörünü oluşturur. Bunlar, bir ekstrasitoplazmik bölgeye sahip transmembran proteinleri ve hücre içinde algılanan sinyal ile proteinlere bağlanan belirli motifleri gösteren intrasitoplazmik bölgedir. Bu aşamada, tirozin kalıntıları fosforile edebildikleri için

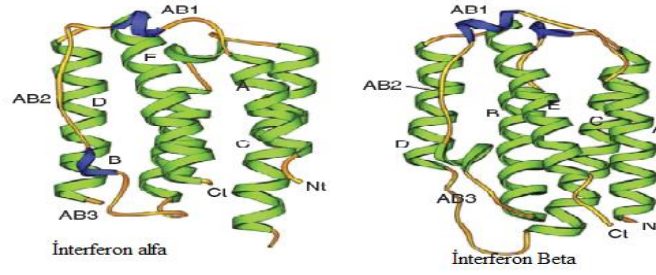
özellikle önemli olan tirozin kinaz proteinleri vardır. Bu proteinler JAK' lara aittir. Bu kinaz aktivitesine sahip proteinler, STAT proteinleri olup sinyal dönüştürücüleri olarak sinyalin içeri girmesine izin verebilir. Aynı zamanda transkripsiyon aktivatörleridir çünkü bu proteinler reseptör, daha sonra interferonla indüklenebilir genlerin transkripsiyonunu başlatarak çekirdeğe ulaşıncaya kadar ilerler (Schindler ve ark, 1995).



Şekil 11. İnterferon reseptörleri ve klasik JAK-STAT yollarının tip I ve tip II interferonlarla aktivasyonu (Platanias, 2005).

2.5.2. İnterferon Tipleri

Üç tür interferon alfa (α), beta (β) ve gama (γ) bulunmaktadır. Bu interferonlar iki tip olarak sınıflandırılmıştır: Tip I alfa ve beta formlarını içerirken tip II ise gama formundan oluşur. Tip I interferonlar, bir virüs tarafından herhangi bir hücre tarafından üretilir. Tip II interferon sadece doğal öldürücü hücreler ve T lenfositler tarafından salgılanır. Aynı zamanda tip I interferonlar sınıf I MHC moleküllerinin ifadesinde artışa neden olur, Th1 hücrelerinin gelişimini uyararak bu NK hücrelerinin parçalayıcı aktivitesini artırır. Tüm tip I interferonlar, hedef hücrelerin yüzeyinde bulunan spesifik reseptörlerine bağlanarak etkilerini gösterirler.



Şekil 12. Tip I interferonların (IFN'ler) şerit diyagramı (Pestka ve ark, 2004).

2.5.2.1. Alfa interferonlar

Lökosit interferonu olarak da bilinmektedir. Lökositler bir virüs ile enfekte olduğunda üretilir. İnsan kromozomu 9 ve murin kromozomu 4' e bağlanan 15 genden az ve 9 psödogen tarafından kodlanır. Önemli özelliği bu genlerin her birinin herhangi bir intron içermemesidir (De Andrea ve ark, 2002). Bu şekilde oluşturulan protein, çok asidik bir pH' ta kararlı olan 166 amino asitten oluşur. Alfa interferon, T-hücresi olarak adlandırılan hücrelerin farklılaşmasına neden olur. Lenfositlerin büyümesini inhibe eder. Alfa interferon NK hücreleri ve makrofajlar üzerinde etki gösterebilir, böylece interferon üretimini ve özellikle interlökin 1 üretimini ve bunların proliferasyonunu artırarak dolaşımdaki hücre sayısını artırır (Jonasch ve ark, 2001).

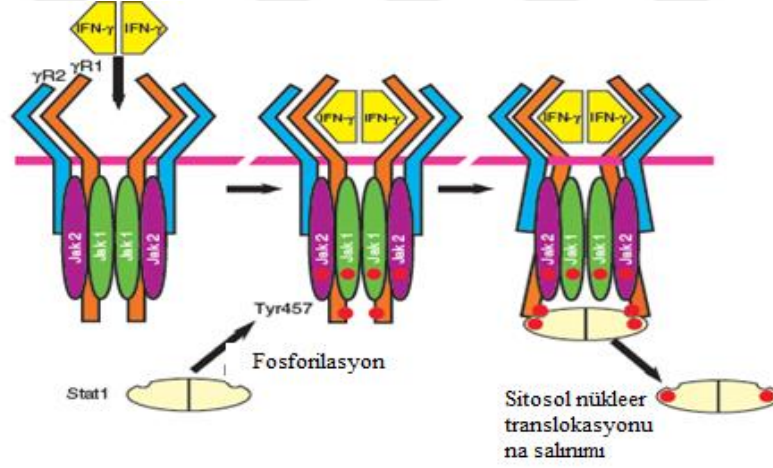
2.5.2.2. Beta interferonlar

İnterferon beta Isaacs ve Lindenmann tarafından ilk keşfedilen interferon ve ilk olarak gözlemlenen interferon tipidir. Fibroblast interferon olarak da bilinir çünkü epitel hücreleri ve fibroblastlar tarafından virüslerin etkisi altında üretilir. Ayrıca beta interferon, insan kromozomu 9' a yerleştirilmiş gen tarafından kodlanır. Bu protein 166 amino grup asitten oluşur (Almeida ve ark, 2008).

2.5.2.3. Gama interferonlar

Gama interferon, tip II interferon olarak adlandırılan ayrı bir alt sınıfa aittir. Bu bağışıklık interferon olarak adlandırılır. IFN gama genellikle bir dimer olarak bulunur ve 146 amino aside sahiptir. İnsanların 12q24.1 kromozomunda bulunan bir geni vardır.

İnterferon gama yapısı IFN alfa veya IFN betadan tamamen farklıdır. Gama interferon T4, T8, NK ve granüllü hücreler tarafından oluşturulur ve antijen ve mitojenlere etkin olur. İnterferon gama (IFN- γ) mitojen etki sonucu antijenle uyarılmış T helper hücrelerinden salınır. T-hücresi aktivitesini ve doğal öldürücü hücrelerin hücrel yıkım kapasitesini arttırmırlar. Bu Th1 hücreleri hücrel bağışıklığa dahil olduğundan, IFN gama hücrel bağışıklığı arttırmaktadır. IFN gama, IFNGR adlı reseptör kompleksine bağlanarak etki gösterir (Ank ve ark, 2006). IFN gama, lökosit çekiminin düzenlenmesi ve çeşitli bağışıklık hücre tiplerinin olgunlaşması, farklılaşması ve büyümesinin düzenlenmesi yoluyla bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. B-hücresi aktivasyonunu inhibe ederler. İnterferonda olduğu gibi sınıf 1 histo-uyumluluk kompleks hücreleri, tümör hücrelerinin proliferasyonunu da azaltabilir (Jonasch ve ark, 2001).



Şekil 13. İnterferon-gama (IFN-g) reseptör kompleksinin modeli (Pestka ve ark, 2004).

Tablo 3. İnterferon tipleri.

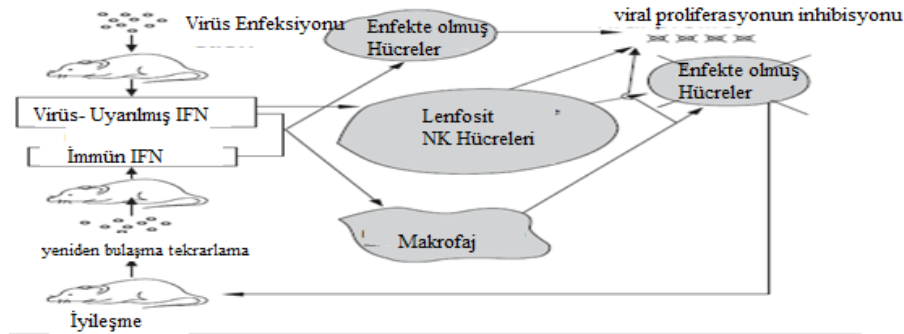
İNTERFERON TİP	BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLER	KAYNAK HÜCRE	KROMOZOM	ANA ÖZELLİK
ALFA İNTERFERON	166 aminoasit protein	Makrofajlar	9	Antiviral etki
BETA İNTERFERON	166 aminoasit glikoprotein	Fibroblastlar epitel hücreleri	9	Antiproliferatif etki
GAMA İNTERFERON	146 aminoasit glikoprotein	T lenfositleri	12	İmmünomodülatör etki

2.5.2.4. İnterferon etkileri

- a. Viral enfeksiyonlara karşı savunma özelliği gösterir.
- b. MHC sınıf I ve II reseptörü oluşumunu artırıp antijen sunumunu kolaylaştırır.
- c. İmmün hücreleri aktifleştirerek intörlökin sentezletir.
- d. Hızlı bölünen tümör hücrelerinin çoğalmasını engeller.
- e. Düşük derişimlerde antikor oluşumunu hızlandırır, yüksek derişimlerde ise yavaşlatır.

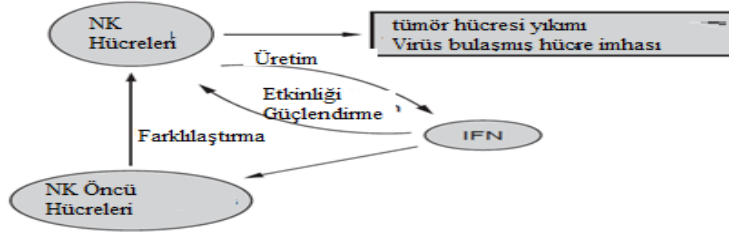
İnterferon, diğr hücrelerde bulunan özel reseptörler tarafından algılanır. İnterferonun antiviral aktivitesinin mekanizması interferon molekülünün reseptörüne bağlanması iki enzim sistemini aktive eder.

1. Bir 2-5A sentetaz sistemi: Enzim aktive edildiğinde, ATP ve çift zincirli RNA varlığında 2-5A sentezlenir. 2-5A, viral mRNA' yı indirgemek, böylece viral protein sentezini inhibe etmek için endonükleaz aktive eder.
2. Protein kinaz (PKR): Çift zincirli RNA varlığında aktive olur. Protein zincirlerinin sentezini başlatmak için gerekli olan başlangıç faktörü-2alfa fosforile eder. Böylece protein sentezini başlatmasını önleyerek viral proliferasyonu inhibe eder. İnterferon, enfekte hücrelerde viral proliferasyonu inhibe etmek için makrofajlar, NK aktivitesini artırır (Şekil 14).



Şekil 14. İnterferonun antiviral etkisi (İmanışlı, 2004).

İnterferon, tümör hücrelerinin çoğalmasını doğrudan inhibe eder. NK hücreleri doğal bağışıklıkta çalışan sitotoksik lenfositlerdir. IFN-NK sistemi tümörlere karşı konak savunmasından etkilenir. Böylece tümör metastazını inhibe etmektedir (Şekil 15).



Şekil 15. İnterferon NK sistem (İmanış1, 2004).

2.5.2.5. İnterferon etkisinin moleküler ve fizyolojik temeli

1. İnterferon-Reseptör Etkileşimi; İnterferonun hücrelerle etkileşimi, interferon molekülünün hücre zarı yüzeyinde bulunan kendine özgü reseptörlere bağlanması ile olur (Stanton ve ark, 1987).
2. İnterferon ile Aktive edilmiş Durumun Hücreler Arası Transferi; İnterferon ile uyarılmış hücreler, uyarılmamış hücelere antiviral aktiviteyi transfer edebilme yeteneği elde ederler bu transferin olabilmesi için ise hücreye temas gereklidir (Stanton ve ark, 1987).
3. Hücre İçi biyokimyasal Etkiler; İnterferon hücre yüzeyindeki kendine özgü reseptörlere bağlanarak ikincil hücre sinyal moleküllerini etkiler.

2.5.3. İnterferona Maruz Kalan Hücrelerdeki Biyokimyasal Değişiklikler

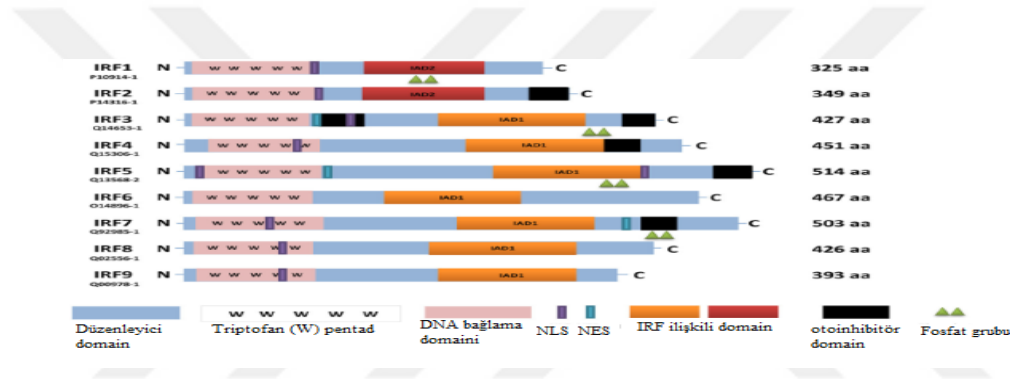
1. Proteinkinaz Yolu: İnterferon, inaktif proteinkinazı aktive eder. Aktif protein kinaz, peptid zincir elf-2 fosforile ederek inaktivasyonuna neden olarak protein sentezi bozulur.
2. Nükleaz Yolu: IFN 2'-5' oligoadenilat sentezini indükleyerek RNA' yı parçalamak üzere endoribonükleaz aktive edilir. RNA parçalanması ile protein sentezi engellenir.
3. m-RNA Metilasyon Yolu: İnterferon, mRNA metilasyonu işlemi inhibisyonu konakçının tümör hücrelerinde protein sentezini inhibe eder (Stanton ve ark, 1987).

2.6. İnterferon Düzenleyici Faktörler

İnterferonların ifadesi IRF' ler tarafından kontrol edilir. Memelilerde 9 üyeden oluşur. IRF1' in bulunmasının ardından 9 çeşit IRF ailesi bulunmuştur (Şekil 16). IRF

ailesi, IRF1, IRF2, IRF3, IRF4, IRF5, IRF6, IRF7, IRF8 (ICSBP) ve IRF9 (ISGF3Y), 1980' lerin sonunda Tip I interferon araştırmaları sonucunda tespit edilmiştir (Tamura ve ark, 2008). Interferon düzenleyici faktörlerin (IRF) ailesi, çeşitli çevresel stresleri algılayan transkripsiyon faktörleri olarak gösterilmiştir (Sato ve ark, 2001).

Interferon düzenleyici faktörler, korunmuş N-terminal DNA bağlama alanı içinde önemli bir homolojiye sahiptir. Tüm IRF' ler, N-terminalinde korunmuş bir triptofan pentad içeren bir DNA bağlanma alanı barındırır. Ayrıca IAD1 veya IAD2 olarak adlandırılan bir IRF aktivasyon alanı içerirler. Mevcut diğer alanlar bir nükleer lokalizasyon sinyali (NLS), nükleer ihracat sinyali (NIS) bir inhibitör alan ve bir düzenleyici alandır. IRF' ler, hedef genlerin promotörlerine bağlanarak biyolojik aktivitelere aracılık eder.



şekil 16. Farklı fonksiyonel alanlar gösteren tam boy insan IRF' lerinin şematik gösterim (Cherrie ve ark, 2018).

IRF  yeleri üç kategoriye ayrılmaktadır (Miyamoto ve ark, 1988):

1. Antionkogenik IRF (IRF1, IRF8 ve IRF5)
2. Onkogenik IRF (IRF2 ve IRF4)
3. Viral onkogenik IRF

Hücresel IRF (IRF1, IRF2, IRF3, IRF4) aktive edilmiş T hücrelerinde sekans bağlama proteini; IRF ailesinin lenfoid özgül  yesi IRF5, IRF6, IRF7, IRF8 ve IRF9 ifade edilmiştir. IRF' ler, paylaşılmış N-terminali DNA bağlanma alanı (DBD) aracılığıyla iki GAAA tekrarından oluşan interferon uyarılmış yanıt elementi (ISRE) motiflerine bağlanır (Tanaka ve ark, 1993). IRF' lerin d r nde, tip I IFN' lerin indüksiyonunda çekirdek moleküler olarak yer almıştır: IRF1, IRF3, IRF5 ve IRF7. IRF' ler, patojen ilişkili moleküler modellere (PAMP) yanıt olarak Toll benzeri reseptörler (TLR) ve sitosolik PRR'

ler dahil olmak üzere çeşitli desen tanıma reseptörlerine (PRR) yanıt olarak aktive edilir. Toll-benzeri reseptörler, doğuştan gelen bağışıklıkta önemli bir rol oynayan bir transmembran reseptörü ailesidir. TLR' ler, bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitlerden türetilen yüksek oranda korunmuş bileşenler olan patojenle ilişkili moleküler paternleri (PAMP' ler) tanıyarak patojenleri önlemektedir (Janeway, 1989; Takeda ve ark, 2003). İnsanda 10 TLR tespit edilmiştir. TLR1s, TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR6 hücre yüzeyi üzerinde ifade edilir. TLR sinyalleme durumunda, ligandın reseptöre bağlanması yoluyla aktivasyon gerçekleşir, bu da adaptör proteinlerini hemen alan bir konformasyon değişikliğine yol açar (Tamura ve ark, 2008; Ban ve ark, 2016).

IRF1 ve IRF5, tümör baskılayıcı aktiviteye sahiptir (Mori ve ark, 2002; Barnes ve ark, 2003). IRF' lerin fosforilasyonu tip I IFN' lerin ekspresyonunu ortaya çıkardıkları çekirdeğe translokasyonu başlatır (Yanai ve ark, 2007). Makrofajların dinamik olarak değişime cevap verme kapasitesi, sadece uyaranlara ve reaktif transkripsiyon faktörlerine bağlı olmayıp, aynı zamanda yanıt veren hücrenin kromatin durumuna da bağlıdır. İlk olarak NFkB' nin bazı genlere çok hızlı bağlanabildiğini ortaya çıkarmıştır (Saccani ve ark, 2001).

DNA, çekirdek histon alt birimleri (H1, H2a, H2b, H3 ve H4) için doğal bir afiniteye sahiptir ve DNA' nın etrafında sarılmasından zarar görmesini engelleyen nükleozomlar etrafında paketlenmesine izin verir. Cis düzenleyici bölgeler, nükleozomlar için artan bir afiniteye sahiptir. SRG' lerdeki promotörler, artmış kromatin erişilebilirliği ve transkripsiyonu için nükleozom yeniden modelleme ve protein sentezine bağımlıdır (Ramirez-Carrozzi ve ark, 2009). IRF5, LPS uyarılmasının bir sonucu olarak hızlı bir şekilde uyarılan PRG' lerin (TNF ve IL1a gibi) ve SRG' lere (IL6, IL12b) promotörlerine bağlanır ve bu da PolIII' nin işe alımında büyük artışlara yol açar (Krausgruber ve ark, 2011).

Birçok interferon düzenleyici faktörler, patojenlere karşı yanıt oluşumunda, gen ifadesinin, hücre döngüsünün ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynar (Takaoka ve ark, 2008). Bu ailenin proteinleri spesifik bir DNA-bağlayıcı alanını paylaşır. Bu alanda triptofan uçları DNA ile temas ettiğinde hidrofobik bir alan oluşturur. Bu alan beş adet yüksek korunumlu triptofan tekrarlarıyla ilk 115 aminoaside karakterize edilmiştir. Tüm IRF' ler arasında ortak olan alan Helix-Helix yapısı oluşturarak, IFN tarafından uyarılan genlerin promotor bölgesinde yer alan IFN ile uyarılan düzenleyici element (ISRE) bölgesine bağlanmaktadır (Lowther ve ark, 1999).

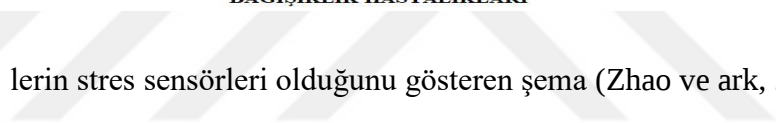
IRF moleküllerinin IRF bağlantı alanı (IAD) olarak da bilinen C-terminal bölgeleri

DBD' ye göre daha az korunuyor olsa da IRF üyelerinin bazıları, IRF3, IRF5, IRF7 bu bölgede benzerlik göstermektedir (Yoneyama ve ark, 1998). IRF1 ve IRF2 dışında IRF proteinlerinin C-terminali diğer transkripsiyon faktörleri ile etkileşimlerden sorumludur. Bu etkileşimler de IRF' lerin çekirdeğe taşınmalarına yardımcı olur (Higgs ve ark, 2008; Takoako ve ark, 2008). IRF aile üyeleri immün yanıtta, hücre farklılaşmasında ve tümör baskılamayı biçimlendirme de rol oynamaktadır (Lowther ve ark, 1999; Lin ve ark, 1999).

2.6.1. IRF5

IRF ailesi, genel olarak hem heterodimerlerin oluşumunda hem de diğer ilgili olmayan proteinlerle etkileşimlerinde hedef genlerin transkripsiyonunu yürütmek için ortak faktörler ile birlikte görev alır. IRF5, iki nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) içerir. IRF5 fosforilasyonu, 5' NLS' de ortaya çıkar. Nükleer translokasyona ve aktif hücrelerde IRF5' in tutulmasına aracılık eder (Barnes ve ark, 2002). Aktif hale getirildikten sonra IRF5, transkripsiyona aracılık ettiği çekirdeğe ulaşır. IRF5, proinflamatuvar genlerin ekspresyonunu harekete geçirerek, TLR sinyallemesinin akış aşağısında makrofaj inflamatuvar yanıtlarını düzenleyen bir anahtar transkripsiyon faktörüdür. İnsanlarda, IRF5 geni, 7q32 kromozomunda yer alır ve her biri bir alternatif promotör kodlayan 3 varyant (ekson 1A, 1B ve 1C) olan 5' UTR' de kodlayan ekzonlar artı bir kodlayıcı olmayan ekzondan oluşur (Mancl ve ark, 2005). IRF5 transkriptlerinin çoğunluğu, virüsle enfekte olmuş hücrelerde uyarılan bir IRF bağlama bölgesi içeren ekson 1A' dan türetilir (Mancl ve ark, 2005). IRF5 lokusu diğer IRF aile üyeleri tarafından düzenlenir. IRF5 geninin bir başka özelliği, ekson 1A ve 1B tarafından kodlanan promotör bölgesini kapsayan güçlü 700bp CpG adasıdır. Memeli gen promotörlerinin yaklaşık % 70' i CpG adaları bulundurur. Bu tür GC bakımından zengin bölgeler ağırlıklı olarak metillenmemiş ve transkripsiyon başlatma ile ilişkilidir (Saxonov ve ark, 2006). CpG adası, özellikle gelişim sırasında metillenmesi, transkripsiyon faktörü bağlanmasının doğrudan inhibisyonuna bağlı olarak, ilişkili promotörün susturulmasına yol açar. CpG adaları DNA' nın nükleozomlara bağlanmasını sınırlar, bağlanma için transkripsiyon faktörleri ile rekabet eder (Ramirez-Carrozzi ve ark, 2009; Fenouil ve ark, 2012). IRF5' in 9 bilinen izoformu bulunmaktadır, IRF5' in izoformları insan kanserlerinde bulunmuştur (Mancl ve ark, 2005). IRF5, monositler, makrofajlar, B hücreleri ve dendritik hücrelerde ifade edilir (Izaguirre ve ark, 2003; Barnes ve ark, 2004). IRF5 aktivasyonu, TLR7 ve TLR8 yolunun aşağı akışında

Şekil 17. IRF



2.7. Transkripsiyon Faktörleri

Tüm organizmalarda transkripsiyon düzenleyicisinin özgülüğü gen ekspresyon sisteminin elementleri olan transkripsiyon faktörlerin, DNA' nın cis düzenleyici bölgeleri (CRR) ile etkileşime girme yeteneğine bağlıdır. İnsan genomunun % 5' i transkripsiyon faktörlerini şifreler. Genel transkripsiyon faktörleri ve özel transkripsiyon faktörleri olmak üzere ikiye ayrılır. Genel transkripsiyon faktörleri bazal transkripsiyon için gerekli olurken özgül transkripsiyon faktörleri enhancerlar, upstream faktörler ve aktivatörlerdir. Genlerin transkripsiyonunun regülasyonu için DNA üzerinde belirli bir diziye bağlanabilen proteinler o diziye özgün DNA bağlanma proteini olarak adlandırılır (Latchman, 1997; Karin, 1990).

Transkripsiyon başlama, uzama ve sonlanma aşamalarından oluşur. Transkripsiyon faktörlerinin sentezinde önce bir gen RNA' ya çevrilip yazılır, daha sonra RNA proteine çevrilir. Transkripsiyon faktörleri kendi kendilerini denetleme özelliğine sahiptirler.

Transkripsiyon sonrası RNA işleme ise uçlarda işleme 5' cap ve poliA kuyruğu eklemesi, modifikasyon tRNA eklenmesi ve RNA splicing aşamalarından geçer. Transkripsiyon faktörleri tek başına ya da bir komplekste yer alan başka proteinlerle birlikte RNA polimeraz aracılığıyla bir genin transkripsiyonunu kolaylaştırarak aktivatör olarak rol alırlar. (Roeder, 1996). Transkripsiyon faktörleri DNA'daki genetik bilgiyi okuyup yorumlayan protein gruplarından biridir. DNA' ya bağlanarak gen transkripsiyonunu ya artırır ya da azaltır. Ökaryotlarda transkripsiyon faktörleri çekirdekte okunur sonra sitoplazmaya taşınır. Transkripsiyon faktörleri sitoplazmadan çekirdeğe geçebilmek için önce bir liganda bağlanmak zorundadırlar. Ligandlar transkripsiyon faktörlerinin etkin hale geçebilmesi için DNA' da başka kofaktörlere bağlanmaktadır. Örneğin, STAT proteinleri transkripsiyon faktörlerinin DNA' ya bağlanmaları için önce fosforile olmaları gerekir. DNA bağlanma bölgesi ökaryotlarda heterokromatinde yer alır. Heterokromatin kromozomun iç içe geçmiş olduğu bölgelerdir. Heterokromatindeki DNA' ya çoğu transkripsiyon faktörü tarafından erişilemez haldedir. Transkripsiyon faktörünün DNA' ya bağlanabilmesi için heterokromatinin histon modifikasyonları ile ökromatine dönüştürülmesi gerekmektedir. Bu transkripsiyon faktörleri de transkripsiyon başlama öncesi RNA polimerazın bağlanmasını sağlarlar. Ökaryotlarda transkripsiyonun gerçekleşmesi için genel transkripsiyon faktörlerine ihtiyaç vardır. Bu faktörlerin çoğu doğrudan DNA' ya bağlı olmadığı halde RNA polimeraz ile doğrudan etkileşirler. Bunların en önemlileri TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF ve TFIIH' dir. Bakteriyel TF' ler daha kısa sekansları tanır. Bu kısa motifler ökaryotik genomlarda birçok kez ortaya çıkabilir. TF' ler yaygın işlevsel olmayan bağlanma sergiler. Uyarılara tepki veren bu transkripsiyon faktörleri, ilgili genleri çalıştırır veya durdururlar, bu durum hücre morfolojisinde gerekli olan değişiklikleri mümkün kılar. Çoğu transkripsiyon faktörü, özellikle onkogen veya tümör baskılayıcıları hücre döngüsünü düzenlerler. Bunun bir örneği hücre büyümesi ve apoptozda önemli rol oynayan Myc onkogenidir. Nanog, OCT4, SOX2, Klf4, c-myc pluripotensiden sorumlu transkripsiyon faktörleridir. Embriyonik kök hücrelerinin pluripotentliğinin sağlanmasında rol oynar. Bu genlerin her birinin transkripsiyonunun eksikliğinde pluripotentlik sağlanmaz ve erken embriyonik ölüm gerçekleşir (Nichols ve ark, 1998; Mitsui ve ark, 2003; Avilion ve ark, 2003).

2.7.1. c-Myc

Myc, hücre büyümesi ve çoğalmasında rol oynayan genleri düzenleyen Myc transkripsiyon faktörünü kodlar (Dang, 2012). C-myc aşırı ekspresyonu prostat kanseri gelişimini destekler. Tümörlerde yüksek aktivasyona sahip bir onkogendir. Düşük düzeyde regüle edilmiş myc, tek başına proliferasyona neden olurken yüksek seviyelerde myc aşırı ekspresyonu, hücrel apoptoza yol açan tümör baskılayıcı mekanizmalarını aktive etmek için gereklidir (Murphy ve ark, 2008). C-myc onkogen genellikle prostat kanserinde yukarı regüle edilir ve c-myc upregülasyonu liganddan bağımsız prostat kanseri hücresi sağkalımını destekler (Bernard ve ark, 2003).

2.7.2. OCT4

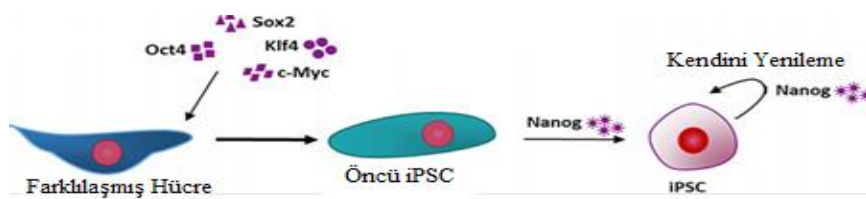
OCT4, embriyonik kök hücrelerin pluripotensi özelliğinin sürdürülmesinde rol oynayan proteindir ve hücrelerin teşhisinde en iyi bilinenidir. DNA' da ATTTGCAT oktomerini tanıma özelliği olan transkripsiyon faktörüdür. OCT4 transkripsiyon faktörü, insanda POU5f1 geni ile kodlanır. Embriyonik kök hücrelerin gelişiminde OCT4' ün ifade seviyesinin 3 önemli etkisi vardır: OCT4 ifadesindeki artış, hücrelerin primitif endoderm ve mezoderm yönünde farklılaşmasına neden olmaktadır. OCT4, erken embriyoda hücre kaderi düzenlenmesi için gereklidir, iç hücre kütlelerinde (ICM) eksprese edilir, farklılaşma süresi boyunca ekspresyonu azalır ve trofoblast hücrelerine farklılaşma üzerine düzenlenir. İfadesinin baskılanması veya eksik ifadelenmesi durumunda hücrelerin pluripotenslik özellikleri kaybolmakta ve sonuçta bu hücreler trofektoderm yönünde farklılaşmaktadır (Wu ve ark, 2014). Embriyonun iç hücre kitlesi hücrelerinin gelişimi için de ifade olması gerekmektedir. OCT4 protein seviyesi gastrulasyon aşamasında belirli seviyelerde seyrederek. Endoderm hücreleri farklılaşmaya ve ektoderme göç etmeye başladıklarında, bu hücrelerin OCT4 protein seviyeleri geçici olarak artar. Daha sonra OCT4 gen ekspresyonu endoderm ve epiblast hücrelerinde baskılanır. OCT4 farklılaşmış hücrelerde eksprese olmaz (Niwa ve ark, 2000).

2.7.3. Klf4 (Krüppel-Like Factor 4)

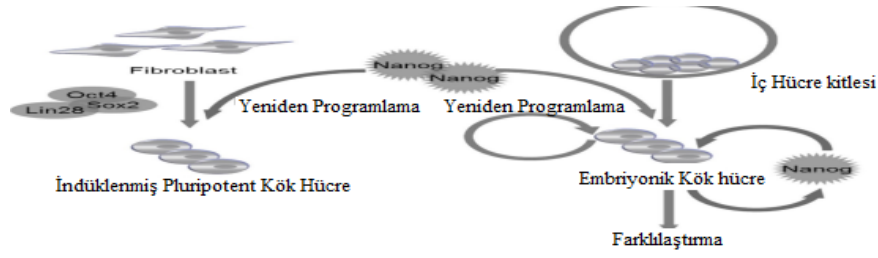
Hücre proliferasyonu, farklılaşması, gelişimi ve apoptozu olmak üzere pek çok biyolojik aktivitenin devamını sağlar. Klf4 ve Klf2 ise; EKH'lerin pluripotensin sağlanmasından sorumlu Nanog, myc gibi başka transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarını düzenlerler. Etkilediği gen yüksek seviyede ifade edildiğinde hücre bölünmesi baskılanır. Klf gen ailesi tek başlarına EKH'lerin kendilerini yenileme kapasitelerinde etkin rol oynamamaktadır (Parisi ve ark, 2008).

2.7.4. Nanog

Nanog proteini, hücrenin nükleer bileşenine yerleşmiş, 305 aminoasit içeren DNA bağlanmasını kolaylaştıran bir protein olup EKH'lerin, pluripotent özelliğini etkilemektedir. İn vitro olarak farklılaşmanın engellenmesinde rol oynar (Cavaleri ve ark, 2009). Nanog, OCT4 ve SOX2 birlikte İPKH'leri oluşturmak için kullanılır. Bu gen insan embriyonik kök hücreleri ve embriyonik germ hücreleri gibi farklılaşmamış hücrelerinde eksprese olurken; testis, over gibi farklılaşmış hücrelerde de saptanmıştır. Nanog geninin eksprese olmaması sonucu EKH'ler kendi kendini yenileme özelliklerini kaybederler. Bu durum EKH'lerin ekstraembriyonik doku hücrelerine dönüşmelerini indükler (Mitsui ve ark, 2003).



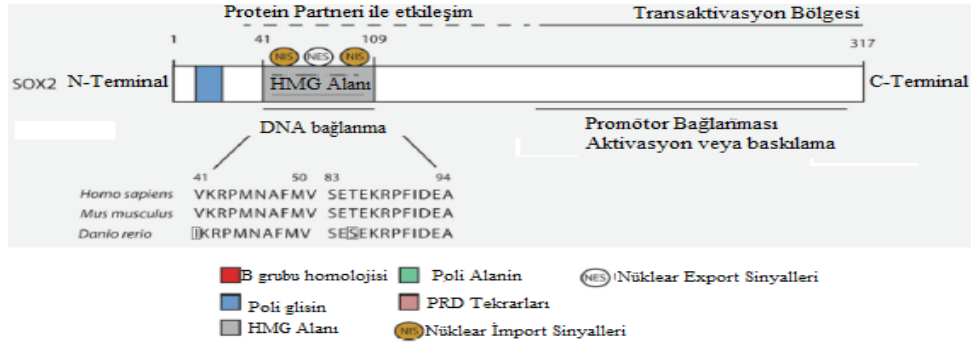
Şekil 18 Programlama işlemi sırasında Nanog ihtiyacı.



Şekil 19. Nanog pluripotent kök hücrelerde kendini yenileme ve farklılaşma şeması (Zhang ve ark, 2016).

2.7.5. SOX Ailesinin Keşfi

Sry' nin erkek belirleyici bir gen olarak tanımlanmıştır. SOX geni ailesi üzerine yapılan araştırmalar memeli testis determinasyon Sry faktörünün seminal keşfiyle başlamıştır. Bu durum da embriyonik gelişimin genetik düzenlemesi alanında da bir atılım olmuştur. Bu keşiften kısa bir süre sonra, Sry' ye benzer Yüksek Hareketlilik Grubu (HMG) sekanslarını paylaşan birçok gen, genomda tanımlanmış ve embriyolarda eksprese oldukları bulunmuştur. Sry DNA' ya diziye özgü şekilde bağlanan HMG alanı taşıyıcı (Sinclair ve ark, 1990). Sry' nin HMG alanına yüksek aminoasit benzerliğine sahip bir HMG alanı içeren proteinlere SOX proteinleri denir (Şekil 22). SOX HMG yapıları, hem X-ışını kristalografisi hem de NMR kullanılarak yüksek çözünürlükte çalışılmıştır. Omurgalılarda temelde B, C, D, E ve F şeklinde sınıflandırılmış ve tanımlanmış 21 farklı SOX geni vardır (Bowles ve ark, 2000; Schnitzler ve ark, 2014). SOX ailesi, gelişimsel ve kök hücre biyolojisindeki önemini gösteren bir grup ilişkili transkripsiyon faktörüdür. SOX2' nin HMG domaini türler arasında oldukça korunmuştur. SOX14 ve SOX21' i içeren SOXB2 proteinleri, SOXB1 proteinlerine benzer bir HMG alanına sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda bunlarla birlikte B homolojisi olarak bilinen kısa bir bazik amino asit sekansını paylaşırlar. SOXB2 proteinleri C-terminali dizisinde bir baskı alanına sahiptir (Kamachi ve ark, 2000). SOXC, SOXE ve SOXF grupları, SOXB1 proteinlerine benzer olan, HMG alanları ve C-terminal bölgesinde bir aktivasyon alanı olan toplam 300-500 amino asit uzunluğunda protein düzenlenişine sahiptir. SOXE proteinleri ayrıca HMG alanının N-terminal tarafında bir kendinden dimerizasyon alanı içerir (Bernard ve ark, 2003; Stolt ve ark, 2010).

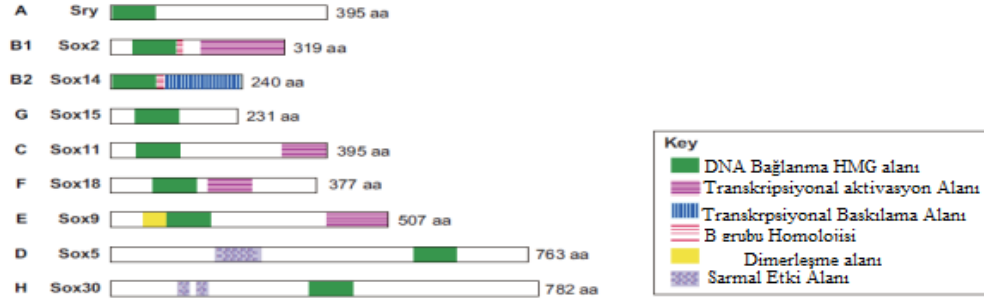


Şekil 20. SOX2 protein alanları (Weina ve ark, 2014).

SOX proteinleri, ATGTGTT' ye veya ilgili sekans motiflerine, üç a-helikazdan oluşan HMG alanıyla bağlanabilir. Bu bağlanma, HMG alanının, minör oluğu genişleten ve DNA' nın ana oluğa doğru bükülmesine neden olan DNA' nın küçük oluğu ile etkileşimi ile belirlenir (Reményi ve ark, 2003). SOXA grubu, memeli Y kromozomlarında kodlanan sadece Sry içerir. SOXB grubu iki alt gruba ayrılmıştır. SOXB1, SOX1, SOX2 ve SOX3'ü içerir (Şekil 21). Bu aile üyeleri, kısa N terminal sekanslarına, ardından HMG alanı ve HMG alanından sonra uzun C-terminal sekanslarına sahiptir. SOX proteinlerinin, erken embriyonik durumlar (SOX1, SOX2 ve SOX3), ektoderm (SOX2), endoderm (SOX7, SOX17 ve SOX18) ve kondrojenik gelişim (SOX5, SOX6 ve SOX9) gibi tüm yönlere katıldığı bilinmektedir (Şekil 22).

	N-Terminal Alanı	HMG Alanı	C-Terminal Alanı	Protein Büyüklüğü	Ekzon Sayısı	Kromozomda Yeri
SOX1				391 aa	1	13q34
SOX2				317 aa	1	3q26.3
SOX3				446 aa	1	Xq27

Şekil 21. SOXB1 grubunun üç ana alanı (Weina ve ark, 2014).



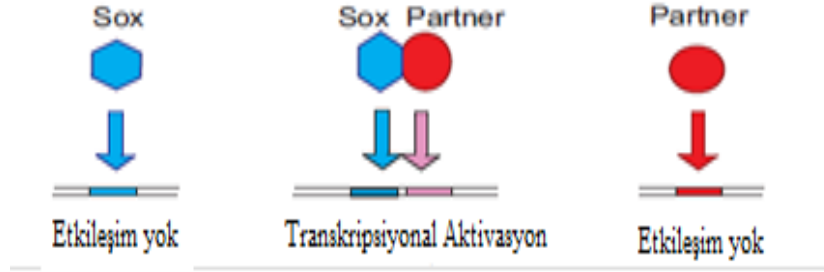
Şekil 22. SOX proteinlerinin alan yapıları (Kamachi ve ark, 2013).

2.7.5.1. SOX2

1994' te SOX ailesi üyelerinden biri olan SOX2 geni, insanlarda keşfedilmiştir. SOX2, SOX2 overlapping transcript (SOX2OT) adı verilen başka bir genin intronu içinde yer alır ve tek ekzondan oluşur (Fantès ve ark, 2003; Grzybowska, 2012). SOX2 geni, 3q26.3 – q27 kromozomunda bulunur, SOXB1 grubuna aittir. SOX2 proteini, 317 amino asitten oluşan 34.3 kDa ağırlığında bir transkripsiyon faktörüdür. SOX2, üç ana alandan oluşur: Amino ucu, karboksil ucu ve HMG olmak üzere üç bölgeden oluşur (Şekil 20).

HMG bölgesi türlerde evrimsel olarak korunmuştur, bu bölge SOX2' nin diğer proteinlere ve DNA' ya bağlanma bölgesidir. Amino ucunda hedef genlerin aktivasyonu ya da baskılanmasına yol açan promotor bağlanmasından sorumlu olarak iş gören transaktivasyon bölgesi bulunur (Sinclair ve ark, 1990; Schepers ve ark, 2002). SOX2, hücre farklılaşmasının ve embriyo gelişiminin düzenlenmesinde rol oynar (Takahashi ve ark, 2006). OCT4 ve Nanog ile birlikte, insan embriyo hücrelerinde bazı hedef genlerin ifadesini düzenlemektedir. SOX2' nin transkripsiyonel düzeyde aktivasyonu için Nanog, OCT4 gibi diğer pluripotensi elemanları ile DNA' ya bağlanması gerekmektedir (Kamachi ve ark, 2000). SOX2 ekspresyonu oositte başlar, iki hücreli embriyoda görülür, 4 ve 8 hücreli aşamalardan morula evresine kadar ekspresyonu artarak devam eder (Avilion ve ark, 2003; Keramari ve ark, 2010). Morula ve blastosist gibi erken embriyonik safhalarda, germ hücrelerinde ve epiblastta ifade edilir. Embriyo gelişiminde SOX2 geninin ifadesinin baskılanması durumunda embriyolar yok olur. Trofektodermal ve kısmen endodermal farklılaşmayı engelleyerek EKH' lerin pluripotansiyel özelliğinin sürdürülmesinde gereklidir (Adachi ve ark, 2010). SOX2' nin en önemli görevlerinden biri de OCT4 ekspresyonunu regüle etmesidir. SOX2' nin farelerde artışı EKH' lerin çeşitli hücre

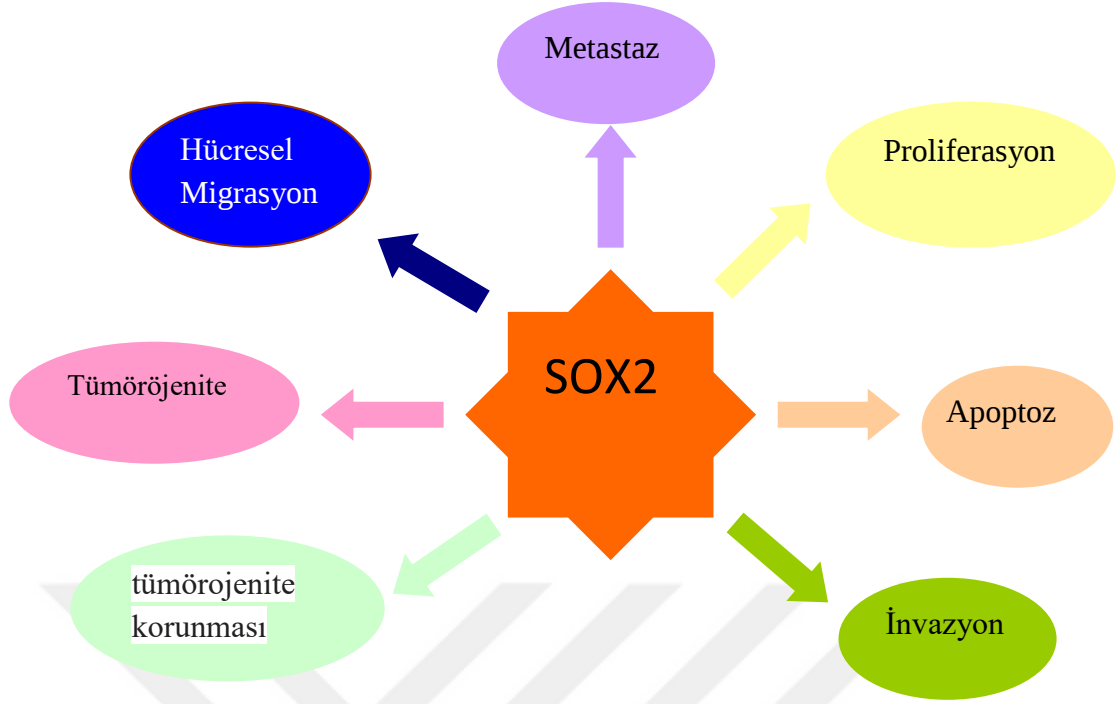
tiplerine dönüşümüne, nöronal farklılaşmaya ya da kitlesel hücre ölümlerine yol açarken (Zhao ve ark, 2004; Kopp ve ark, 2008); insanda artışı trofektoderm soyuna ait hücelere dönüşümünü sağlar (Adachi ve ark, 2010).



Şekil 23. SOX proteinin transkripsiyon faktörleriyle aktivasyonunu gösteren şekil (Kamachi ve ark, 2013).

2.7.5.2. Kanserde SOX2 düzensizliği

Düzensiz ifadelenen SOX2 çeşitli sinyal yollarını etkileyerek pek çok tümör oluşumu, ilerlemesi ile ilişkili bir onkogen olarak etki gösterdiği gösterilmiştir (Matsuoka ve ark, 2012). İnsanda glioblastomadan türetilen tümör başlatıcı hücrelerde SOX2' nin etkisizleştirilmesi, hücre çoğalmasının inhibisyonuna, SOX2' nin tümör başlatan hücrelerde kendini yenileme yeteneğinin sürdürülmesinde rol oynadığını göstermektedir. SOX2 ayrıca prostat kanser hücrelerinin proliferasyonunda rol oynamaktadır. SOX2 çoğu insan tümör tipinde aşırı ifade edilmektedir. SOX2 susturulması proliferasyonun, tümör tümörjenitesinin kaybına neden olmaktadır.



Şekil 24. SOX2 proteini kanser hücresi üzerinde etkileri.

2.7.5.3. İmplantasyon öncesi gelişim ve pluripotenside SOX2

SOX2, erken bölünme aşamalarından zigotik olarak eksprese edilir ve preimplantasyon blastosistlerinde hem iç hücre kütlesi hem de trofektoderimde güçlü bir şekilde ifade edilmektedir. Blastosist içinde trofektoderm (TE) ve iç hücre kitlesi (ICM) oluşumu memeli embriyosundaki ilk soy belirtimidir (Rossant ve ark, 2009). SOX2 başlangıçta hem ICM’ de hemde TE’ de bulunur, daha sonra da ICM ile sınırlıdır (Avilion ve ark, 2003). Özellikle bu faktörler tarafından bağlanan hedef genlerin büyük bir kısmı OCT4 / SOX2 konsensus bağlanma bölgelerini içerir (Tomioka ve ark, 2002; Masui ve ark, 2007). Bu durum SOX2’ nin DNA’ ya etkili bir şekilde bağlanmak için OCT4 ile iş birliği içinde olduğunu göstermektedir.

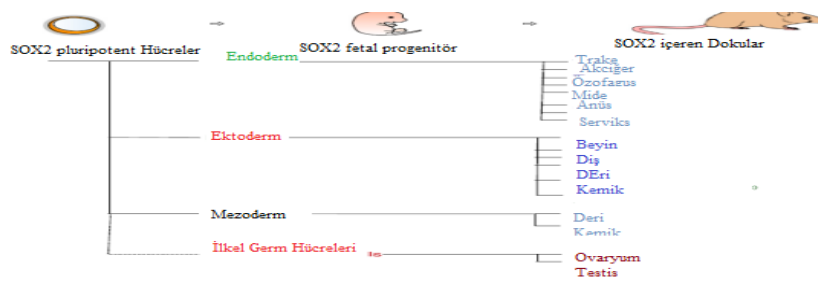
Kendiliğinden yenilenen pluripotent kök hücreler, postimplantasyon embriyonik 5.5 günlük embriyolarının epiblastından türetilebilir ve epiblast kök hücreleri (EpiSCs) olarak adlandırılır. Bu kültürlenmiş pluripotent hücreler, ektopik olarak böbrek kapsülleri içine aşılandığında teratokarsinoma oluşturma kapasitesini korurlar, fakat ES hücrelerinden farklı olarak, gelişmekte olan blastosiste katkıda bulunma kabiliyetleri yoktur. ES

hücrelerinin korunması, çekirdek pluripotensi transkripsiyon faktörleri OCT4, SOX2 ve Nanog' un ifadesi her iki hücre tipi için ortaktır. Bununla birlikte, SOX2 ve Nanog transkript seviyeleri, ES hücreleri ile karşılaştırıldığında EpiSC' lerde azalır (Tesar ve ark, 2007; Brons ve ark, 2007; Guo ve ark, 2010; Zhang ve ark, 2010b; Greber ve ark, 2010). ES hücrelerinin EpiSC koşullarında farklılaştığı durumlarda, bir hedef gen geliştiricilerin bir alt kümesine OCT4 bağlanmasının yeniden yer değiştirmesi vardır (Buecker ve ark, 2014).

2.7.5.4. Fetal gelişimde SOX2

Embriyonun gastrulasyondan sonra SOX2 ifadesi nöroektoderm, duyu plazmaları, bağırsak endodermi ile sınırlandırılır (Avilion ve ark, 2003). SOX2 eksikliği erken implantasyon sonrası ölümcüllüğe neden olmaktadır. SOX2' nin vitro olarak nöral soya doğru ESC farklılaşmasının ilk aşamalarında ifade edilir, SOX2 fetal progenitör hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol ederek gelişmekte olan merkezi ve periferik sistemde rol oynamaya devam etmektedir (Stolt ve ark, 2010).

Endodermin organ spesifikasyonunda rol oynar. SOX2 düzeylerinde ciddi azalma özofagusun trake dönüşmesine yol açarak gelecekteki trake özofagusun ayrılmamasına neden olur. SOX2 delesyonunun hücre proliferasyonu üzerinde etkisi nöral progenitör SOX2 delesyonu üzerine hücre döngüsünden çıkarken trake, dil ve özofagus gibi hücre proliferasyonunda değişiklik olmadan değiştirilmiş farklılaşma programları sergiler (Şekil 25).



Şekil 25. Pluripotent, Fetal ve Yetişkin Progenitör ve Kök Hücrelerdeki SOX2 İfadesi (Abby ve ark, 2013).

2.7.5.5. SOX Protein ifadesinin ve aktivitesinin düzenlenmesi

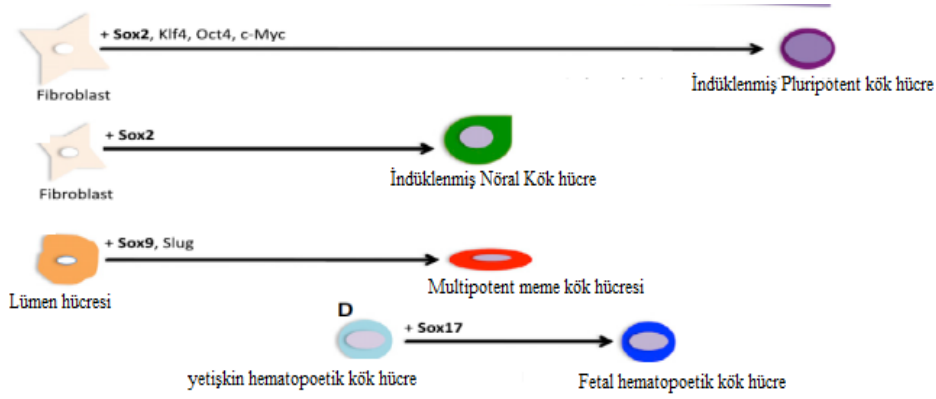
SOX aktivitesi çoklu seviyelerde düzenlenebilir. SOX proteinleri işlevlerini ortaya çıkarmak için ortak faktörlerle birlikte çalışır. SOX ekspresyonu ayrıca miRNA' lar tarafından transkripsiyonel olarak düzenlenir. SOX2 translasyon sonrası modifikasyonlarının meydana gelebileceği bölgeler, iki kısa amino asit uzanımı içinde yer alır: biri HMG domaininde ve diğeri C-terminal domaininde, bu modifikasyonların birbiriyle rekabet edebileceğini düşündürmektedir. Örneğin, SOX2 iki bölgede fosforile edilir. AKT kinazlar tarafından HMG alanında bir treoninin fosforilasyonu, ubiquitin aracılı proteolizi inhibe ederek protein kararlılığını artırır (Jeong ve ark, 2008).

2.7.5.6. Kök hücre biyolojinde diğer SOX faktörlerinin katılımı

SOX2 gibi SOXE grubu üyesi SOX9, çeşitli endoderm ve ektodermden oluşan dokularda eksprese edilir. SOX9 ekspresyonu insan memesinin tümörojenik, metastaz edici yeteneklerini artırır. SOX9' un SOXE grubunun bir üyesi olduğu SOX10 ifadesi kök hücre sağ kalımını garantiler. Nöral krest hücrelerinde nöronal farklılaşmayı bastırır. SOXF grubu üyesi SOX17, fetal ve neonatal hematopoetik kök hücrelerin bakımı için gereklidir fakat erişkin hematopoezde dispense edilebilir. SOXE grubu üyesi SOX8 ve SOXG grubu üyesi SOX15 kas hücrelerini ve bunların bir myoblast hücre dizisindeki bireysel aşırı ekspresyonlar MyoD ekspresyonunun farklılaşmasını önler (Bass ve ark, 2009).

2.7.5.7. Hücresel yeniden programlamada SOX faktörleri

SOX2, somatik hücrelerden kaynaklı pluripotent kök hücrelerin (İPSC) türetilmesi için önemli yeniden programlama faktörlerinden biridir. Yeniden programlamanın sonuna doğru SOX2 gereklidir (Chen ve ark, 2008). SOX2 faktörlerinin ayırıcı yeteneklerinin ortak hedef genleri aktive etmek için OCT4 ile etkileşime girmesinden kaynaklanır.



Şekil 26. SOX Transkripsiyon Faktörleri Ailesi: Kök ve Progenitor Hücre Kaderinin Çok Yönlü Regülatörleri (Abby ve ark, 2013).

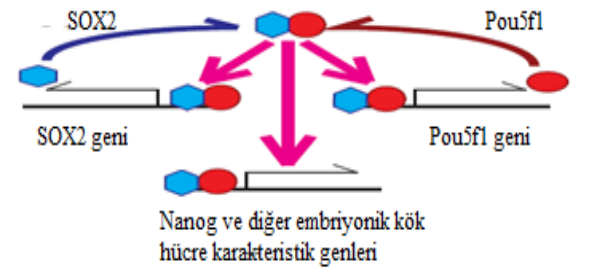
2.8. Transkripsiyon Faktörlerinin Yapısı

DNA bağlanma bölgesi (DBB): Düzenlenen genin yanındaki promotor bölgesindeki enhancer DNA dizilerine bağlanır. Transaktivasyon bölgesi (TAB) transkripsiyon düzenleyici başka proteinler için bağlanma yerlerine sahiptir. Sinyal algılama bölgesi moleküler sinyalleri algılayıp transkripsiyon kompleksine ileterek genin ayarlamasını yapar. Bazen de DNA bağlanma ve sinyal algılama bölgesi, transkripsiyon yapısını oluşturan farklı proteinlerde yer alırlar (Warnmark ve ark, 2003). Düzenleyici elemanların bir TF tarafından özel olarak tanınmasına katkıda bulunan bir diğer faktör DNA / kromatinin diğer proteinlerle birlikte etkileşime girebilme yeteneğidir. DNA' ya dimer veya daha yüksek düzen yapıları olarak bağlanan ökaryotik TF' ler tarafından sağlanır. TF dimerizasyonu tek başına monomerlerin her biriyle etkileşime bağlı olarak bağlanma afinitesini sinerjistik olarak artırır. Bu durum genomdaki rastlantısal oluşum olasılığını azaltır. Transkripsiyon faktörleri gen ifadesinin düzenlenmesi için canlılarda bulunmak zorundadır. İnsan genomunda DNA' ya bağlanabilen yaklaşık 2600 protein vardır, bunların çoğu ise transkripsiyon faktörü olduğu bilinmektedir (Babu ve ark, 2004). Dolayısıyla genomdaki genlerin bir kısmını transkripsiyon faktörlerini şifrelemektedir, bu protein grubu insan proteinleri arasında en kalabalık olanıdır. Genlerin genelde iki tarafında birkaç farklı transkripsiyon faktörünün bağlanma yerleri bulunmaktadır ve bu genlerin verimli olarak ifadesi için birkaç transkripsiyon faktörünün beraber etkisi gerekmektedir (Brivanlou ve ark, 2002).

2.9. Transkripsiyon Faktörlerinin Birbirleriyle İlişkisi

Embriyonik kök hücrelerinin pluripotensinin OCT4 ve SOX2 dahil olmak üzere birkaç önemli transkripsiyon faktörü ile sürdürülmektedir. SOX2, Nanog, OCT4 ve SOX2' nin kendisi de dahil olmak üzere pluripotent kök hücre özgül genlerinin ekspresyonunu düzenleyen OCT-SOX artırıcılarını aktive etmek için in vitro olarak OCT4 ile sinerjistik olarak etki etmektedir. Bu bulgular SOX2' nin SOX artırıcı aktivitesi için ES hücreleri tarafından gerekli olmaktadır. Epiblast ve farklılaşmamış ES hücreleri içinde yüksek oranda eksprese edilen üç transkripsiyon faktörünü OCT4, Nanog ve SOX2 tanımlanmıştır. Bu genlerin her birinin boş mutasyonları pluripotent hücrelerin korunamaması nedeniyle erken embriyonik ölüme neden olur (Maruyama ve ark, 2005).

SOX2 ve diğer SOX faktörleri OCT-SOX aktivatörüne bağlı genlerin ekspresyonunu etkilemektedir. OCT4 ekspresyonunu pozitif veya negatif yönden etkileyen çoklu genleri ise SOX2 düzenlemektedir (Masui ve ark, 2007). Preimplantasyon morula döneminde OCT4 ve SOX2' nin, blastosist döneminde ise OCT4 SOX2 ve Nanog EKH' lerin farklılaşmasında önemli rolü vardır. EKH' lerde SOX2 gen ekspresyonu kendisi ve OCT4 geni tarafından, OCT4 gen ekspresyonu ise kendisi ve SOX2 geni tarafından düzenlenmektedir (Okumura ve ark, 2005). SOX proteinlerinin önemli bir özelliği, genellikle gen düzenleyici işlevlerini, yalnızca ortak transkripsiyon faktörleri ile kompleksler oluşturarak göstermeleridir (Kamachi ve ark, 2000). Böylelikle, SOX bağlı transkripsiyonel düzenlenme için gerekli olan ikinci bir ortak protein için bir bağlanma bölgesi ile birlikte bir fonksiyonel SOX-bağlanma bölgesine eşlik eder ve tek bir SOX proteininin tek başına DNA bölgesine bağlanması transkripsiyonel aktivasyona yol açmaz (Han ve ark, 2012).



Şekil 27. ESC' lerde SOX2-Pou5f1 / OCT4 gösterimi (Kamachi ve ark, 2013).

2.10. Transkripsiyon Aktivasyonu

Birçok kopyalama faktörü transkripsiyonun aktivasyonu için olması gereken özgül bölgeleri içerir. DNA bağlanma etki alanlarında olduğu gibi, birkaç farklı aktivasyon alanı da bulunmaktadır. Bu aktivasyon alanları, bazal transkripsiyon kompleksinin bileşenleriyle etkileşime girerek işlev görür. Bu bir RNA polimeraz II kompleksi ve gen promotöründe bir araya gelen ve transkripsiyonun gerçekleşmesi için gerekli olan TFIIB ve TFIID gibi çeşitli transkripsiyon faktörleridir (Roeder, 1996; Nikolov ve ark, 1997). Spesifik transkripsiyon faktörlerinin bağlanması, gen transkripsiyonunu uyarabilir.

Gen transkripsiyonunun düzenlenmesi, hem özgül dokuya özgü gen ekspresyonuna hem de özgül uyaranlara yanıt olarak gen aktivitesinin düzenlenmesine merkezi bir yaklaşımdır. Bu nedenle, transkripsiyondan sonra çoğu durumda düzenlenme, transkripsiyon seviyesinde gerçekleşir. Transkripsiyon faktörleri olarak bilinen proteinler, transkripsiyon üzerinde gözlemlenen etkiyi üretecek şekilde genin transkripsiyonunu pozitif veya negatif olarak düzenler (Latchman, 1997). Pozitif etki eden bir faktörün aktivitesine müdahale ederek, transkripsiyon üzerindeki uyarıcı etkisini bloke eder. Negatif etki eden faktör, aktivasyon alanının aktivitesini söndürme olarak bilinen bir durumda engellemek için pozitif etkili faktörle etkileşime girerek etki yapabilir. Aktivitesini azaltmak için doğrudan ya da dolaylı olarak bazal transkripsiyonel kompleks ile etkileşerek işlev görmektedir. Başka bir molekülün DNA bağlanma alanına transfer edildiğinde aktivasyon alanları gibi işlev görebilen tanımlanmış inhibitör alanlara sahiptirler (Latchman, 1997). Bu nedenle, transkripsiyonel aktivatörlerin ve baskılayıcıların belirli bir genin düzenleyici bölgesine bağlanması arasındaki denge transkripsiyon hızını belirler.

2.10.1. Transkripsiyon Faktörleri Düzenleme

Transkripsiyon faktörleri iki seviyede düzenlenebilir:

- Transkripsiyon faktörü sentezinin düzenlenmesi
- Transkripsiyon faktör aktivitesinin düzenlenmesi

2.10.1.1. Transkripsiyon sentezi düzenleme

Birçok farklı durumda, bir transkripsiyon faktörü, belirli bir hücre tipinde sentezlenerek düzenlenir. Bunun örneği sadece iskelet kas hücrelerinde sentezlenen MyoD transkripsiyon faktörüyle ilgilidir. Bu nedenle, bu durumda, farklılaşmamış fibroblast hücrelerinde MyoD faktörünün aşırı ekspresyonu, kasa özgü gen ifadesinin indüksiyonunda bu faktörün kritik rolünü gösteren iskelet kas hücrelerine dönüştürmek için yeterlidir (Edmondson ve ark, 1993). Özgül bir uyarana yanıt olarak özgül genlerin uyarılmasında önemli bir rol oynayan transkripsiyon faktörlerini düzenlemek için kullanılabilir. Spesifik hücre tipinde özel uyarana yanıt olarak transkripsiyon sonrası modifikasyonun ardından özel transkripsiyon faktörleri de sentezlenir (Ramji ve ark, 1993).

2.10.1.2. Transkripsiyon faktör aktivitesinin düzenlenmesi

Transkripsiyon faktörü sentezinin düzenlenmesi önemli bir kontrol noktasıdır. Bu durumda, belirli bir uyarana cevap olarak bir transkripsiyon faktörünün geliştirilmiş sentezi, karşılık gelen genin geliştirilmiş transkripsiyonu ile kontrol edilecek, bu da daha sonra başka transkripsiyon faktörlerinin sentezini gerektirir. Transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, belirli bir ligandın bağlanması, protein-protein etkileşimi ve transkripsiyon faktörü fosforilasyonundaki değişimleri içerebilen bir dizi farklı mekanizma yoluyla gerçekleşebilir. Bir hücre tipinde veya belli bir uyarana yanıt olarak transkripsiyon sonrası modifikasyonun ardından transkripsiyon faktörleri sentezlenir veya aktive olur (Latchman, 1997).

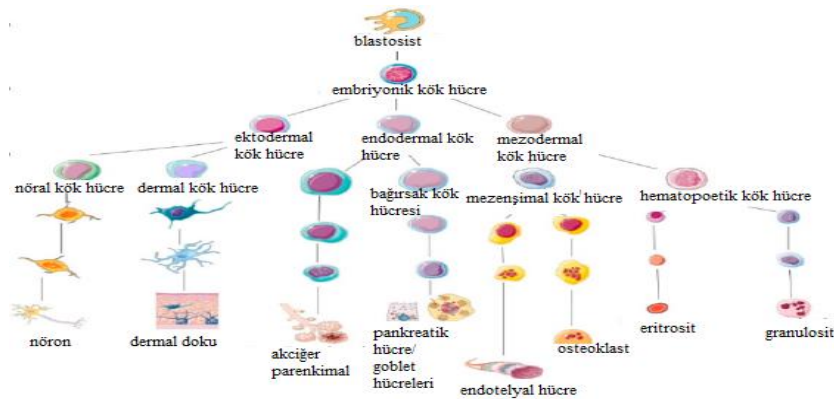
2.10.2. Transkripsiyon Faktörü ve Kanser

Transkripsiyon faktörlerinin bazıları hücrenin büyümesini inhibe ederken, bazıları hücre büyümesini uyararak çeşitli proteinlerin etkisiyle kontrol edilir. Kanseri, bu nedenle büyüme teşvik edici faktörleri kodlayan özgül genlerin anormal aktivasyonundan kaynaklanabilir (Bourne ve ark, 1992). Bazı onkogenler ve antionkogenler, özgül genlerin transkripsiyonunu düzenleyen farklı transkripsiyon faktörlerini kodlarlar. Transkripsiyon

faktörlerini kodlayan onkogenlerin neden olduğu kanserlerde normalden daha yüksek seviyelerde genler eksprese edildiğinde bazı proteinlerin ifadesi artar. Bu nedenle de mutasyonlar ortaya çıkar. İnsanlarda, bu gibi mutasyonlarda onkogenik transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerin, kromozomal yeniden düzenlemelerde yer aldıkları ortaya çıkmıştır (Rabbitts, 1994). İnsan kanserlerinin çoğunun p53 geninde mutasyonlar içerdiği düşünülmektedir (Berns, 1994).

2.11. Kök Hücre

Kök hücreler, kendini yenileyebilir ve farklı hücre türlerine farklılaşabilirler. İn vivo veya in vitro olarak uygun şartlar sağlandığında farklı hücre tipine dönüşebilirler (Collins ve ark, 2001). İlk insan embriyonik kök hücre soyu, 1998' de insan blastosistlerinden türetilmiştir (Thomson ve ark, 1998). İki haploit eşey hücresinin birleşmesiyle oluşan zigotun birbirini izleyen bölünmeleriyle blastokist denilen yapı oluşur. Bu aşamadaki hücreler bütün organizmayı oluşturmak üzere çoğalıp farklılaşırlar (Sadler, 2005). İnsanda 4-6 günlük bir blastokistin iç hücre kitlesinde (ICM) yer alan bu hücreler embriyonik kök hücrelerdir. Bunlar, tüm germ tabakalarını ve onlardan köken alacak sistemleri oluşturabilme yeteneğindedirler (Lodish ve ark, 2004). Embriyonik gelişimin ilerleyen dönemlerinde hücreler, uterus duvarına implante olana kadar pluripotent; implantasyondan sonra ise multipotent özellik kazanırlar (Lanza ve ark, 2009). Kök hücreler endodermal, ektodermal ve mezodermal gruplandırılabilir. Bunlar çeşitli somatik hücrelere olgunlaşabilirler (Şekil 28).

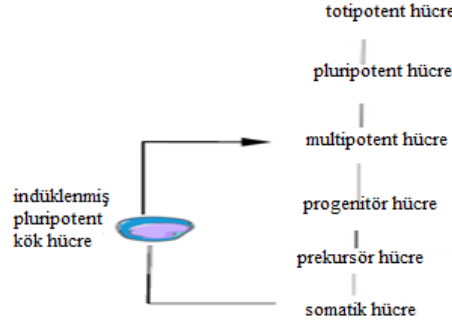


Şekil 28. Blastosistin farklılaştığı dokular (Thurairajah ve ark, 2017).

Bir hücrenin kök hücre olarak nitelendirilebilmesi için bazı temel özelliklere sahip olması gereklidir:

1. Uzun süre bölünebilme-kendini yenileyebilme: Kök hücreler bölünmeler sırasında bir yandan öncü hücreye farklılaşacak olan hücreyi üretirler. Bu olay hücre bölünmesi sonucu oluşur. Hücrelerin bölünme kapasitesine hücrelerin ömrünü belirleyen faktörlerden birisi kromozom uçlarında bulunan telomerlerdir. Kromozomların uçlarının parçalanarak diğer kromozomlara kaynaşmasını engeller böylece kromozomların yapısal bütünlüğünü korur. Telomerler ne kadar uzun olursa telomeraz enzimi o kadar aktiftir. Telomerlerin uzun kalmasını sağlayan telomeraz enzimidir. Kök hücreler çok yoğun telomeraz enzim aktivitesinden dolayı çok sayıda bölünürler (Brink ve ark, 2008).

2. Farklı hücrelere dönüşebilme: Farklılaşma, çok hücreli organizmaları oluşturmak üzere bir araya gelmiş hücrelerin, özgün bir yapı kazanmak için geçirdikleri bir dizi değişimdir. Bir bireyi oluşturabilecek kapasiteye sahip olan bu hücreler, sınırsız farklılaşma yeteneğine sahiptir. Bu değişim, hücre dışı matriks proteinleri, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi çeşitli moleküllerin yer aldığı karmaşık bir süreçtir. Bir hücre farklılaşmaya başlamadan önce yeterli sayıya ulaşır ardından farklılaşma ile ilgili olanlar devreye girer. Bu süreçte genellikle hücre bölünme döngüsünden çıkar. Farklılaşmayı uyaran ve devam ettiren etkenlerin ortadan kalkması durumunda hücre tekrar bölünme döngüsüne girer (Kansu, 2005; Akar ve ark, 2009). Kök hücreler aynı zamanda embriyonik gelişimi ve doku onarımı için gereken yeni hücre gereksinimlerinin karşılanması için simetrik hücre bölünmesi de gerçekleşir. Doku işlevlerinin hasarlı olduğu durumda kök hücreler kısa zamanda öncü hücrelere dönüşerek onarımı sağlar. Döllenen yumurta tek bir hücre olmakla birlikte, vücut sistemlerini meydana getirecek bütün hücreler bu tek hücreden çoğalırlar. Döllenenin 5. gününden itibaren ve birkaç hücre bölünmesinden sonra totipotent hücreler farklılaşmaya başlayarak blastosist denilen içi boş bir küreye dönüşürler. Blastosistte iki tip hücre vardır, biri dış tabaka, diğeri ise iç tabakadır. Blastosistin dış tabakasından, yavrunun beslenmesi ve solunumunu sağlayacak plasenta ve koruyucu koryon kesesi gelişir. Blastosistin iç hücre tabakasından göz, kalp, beyin, kaslar, kemikler gibi doku ve organlar gelişir. Bunun için endoderm ve ektodermin bir arada çalışması gerekir. Tek başına endodermden hiçbir canlı gelişemez. Blastosistin iç tabakasındaki hücre kümesi pluripotenttir. Blastosistin iç hücre tabakasından köken alan pluripotent kök hücrelerine embriyonik kök hücreler de denilmektedir (Gimble ve ark, 2003; Barry ve ark, 2004; Aasen ve ark, 2010).



Şekil 29. Kök hücre Hiyerarşisi (Thurairajah ve ark, 2017).

2.11.1. Kök Hücre Tipleri

Kök hücreler farklılaşabilme yeteneklerine ve kaynağına göre olmak üzere iki ana grupta incelenir. Farklılaşma yeteneklerine göre temel olarak totipotent, pluripotent ve multipotent kök hücre olarak üçe ayrılır. Bu kök hücreler sırasıyla embriyodan fetüsten ve erişkinlerden elde edilebilir (Tarnowski ve ark, 2006; Kuijk ve ark, 2011).

Kaynağına göre kök hücreler embriyonik ve embriyonik olmayan kök hücreler olmak üzere ikiye ayrılır.

2.11.1.1. Embriyonik kök hücreler

Pluripotent özellik organizmadaki üç germ tabakasından köken alan bütün hücreleri oluşturabilme özelliği olup ve EKH' ler bu özelliğe sahiptir. Embriyonik kök hücreler pluripotent olmalarının yanında sınırsız çoğalma ve kendi kendilerini yenileyebilme özellikleri ile birçok hastalığın tedavisinde kullanılabilmektedirler (Thomson ve ark, 1998).

Embriyonun blastosist evresindeki iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler endoderm, ektoderm ve mezodermi temsil eden hücre tiplerine farklılaşabilir ve hepatositler, sinir hücreleri, kalp kası hücreleri gibi farklılaşmasını tamamlamış hücre tiplerini oluşturabilirler. Bu hücreler in vitro ortamda sınırsız ve farklılaşmadan çoğalma kapasitesine sahiptir ve pluripotenttirler. Embriyonik kök hücreler, döllenmeden birkaç gün sonraki blastokist aşamasından izole edilmektedirler.

2.11.1.1.1. Totipotent kök hücre

Döllenme meydana geldiğinde oluşan zigot denilen hücre tek başına tüm organizmayı meydana getirecek genetik bilgiye sahiptir. Vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilme özelliğine sahip olan embriyonun ilk hücrelerine totipotent hücre denir. Totipotent hücreler bir bireyi oluşturabilecek kapasite ve farklılaşma yeteneğindedirler (Sağsöz ve ark, 2008). Döllenmeden sonraki ilk 4 gün içinde zigotun birkaç defa bölünmesi ile oluşan hücreler blastosisti oluşturur. Blastosisti oluşturan bu hücreler birbirinin aynısıdır, her biri totipotent hücredir.

2.11.1.1.2. Pluripotent kök hücreler

Pluripotent özellik üç embriyonik tabakayı temsil eden hücre tiplerine farklılaşabilme özelliği olarak tanımlanabilir. Totipotent hücre özelliği taşıyan blastosistlerin içindeki hücreler anne karnında ilk 4 gün içinde herhangi bir nedenle birbirinden ayrılırsa bu hücrelerin her biri kendi başına büyür. Totipotent hücreler döllenmeden 4.5 gün sonra blastosist evresine geliştiğinde pluripotent hücreler oluşur. Pluripotent hücreler totipotent hücreler gibi bir organizmayı oluşturacak güce sahip değildir. Fakat bu hücreler, uygun koşullar sağlandığında organizmanın tüm hücre tiplerine dönüşebilme özelliğine sahiptir. Pluripotent hücreler, organizmada birçok dokunun oluşmasına kaynaklık etmesine rağmen, yeni bir birey oluşturamazlar (Kansu, 2005).

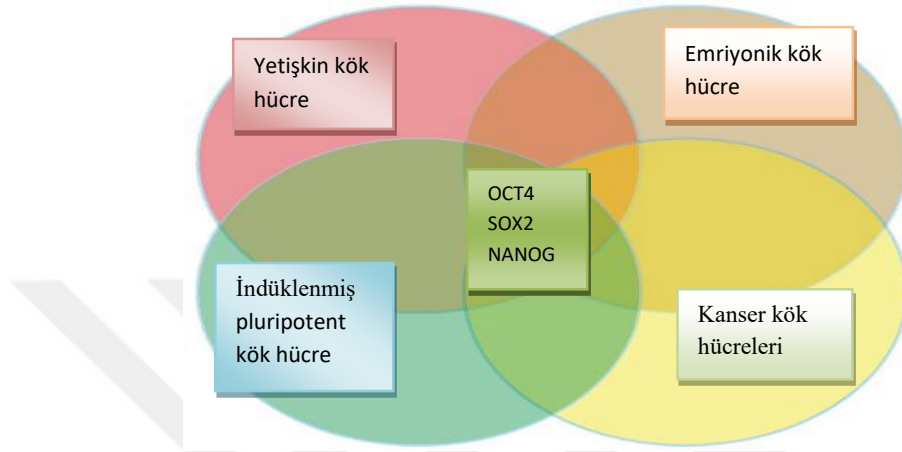
Bir pluripotent kök hücre tüm vücut hücrelerinin köken aldığı üç germ tabakasına dönüşebilen hücrelerdir.



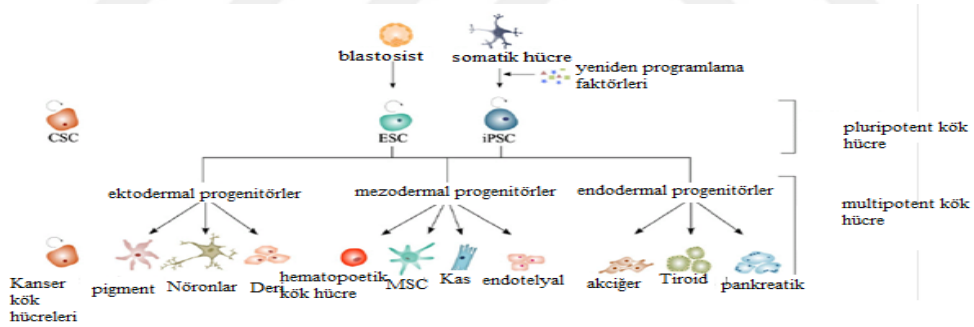
Şekil 30. Pluripotent hücreden gelişen doku ve organlar.

Pluripotent kök hücreler, 3 germ tabakasına endoderm, mezoderm ve ektoderme farklılaşabilirler (Şekil 30). EKH' leri pluripotent ve farklılaşmamış hücrelerin belirteçlerinden olan CD9, CD24 ve OCT4, Nanog eksprese ederler. İn vitro ve in vivo

embriyonik kök hücrelerin pluripotent özelliği Nanog, SOX2 ve OCT4 transkripsiyon faktörlerinin eşzamanlı ekspresyonlarına dayanır fakat in vivo embriyonik kök hücrelerin pluripotent özelliği bu hücrelerin kendi kendilerini yenileyememeleri nedeniyle gelişimin ilerleyen aşamalarında kaybolmaktadır (Nichols ve ark, 2009). SOX2, OCT4 gibi pluripotent özelliğin sağlanması için gereklidir.



Şekil 31. Dört tip kök hücrede SOX2, Nanog ve OCT4'ün ilişkisi.



Şekil 32. Pluripotent Kök hücrelerin farklılaşma Potansiyeli (Constanze ve ark, 2015).

2.11.1.1.3. İndüklenmiş pluripotent kök hücre

İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (İPKH) yaklaşık 60 yıl önce Philadelphia’ dan Briggs ve King ile Cambridge’ den Gurdon isimli araştırmacıların, kurbağa yavrusu barsak hücre çekirdeklerini, çekirdeği çıkarılmış kurbağa yumurtalarına transplante etmeleri ile başlamıştır (Gurdon ve ark, 1958). Somatik hücre nükleer transferi denilen bu deney 1990’ lı yıllarda memeli türlerinde de denenmiş ve koyun Dolly’ nin klonlanmasını sağlamıştır (Campbell ve ark, 1996). 2006 yılında ise, Takahashi ve Yamanaka embriyonel

kök hücrelerin pluripotensi ve kendini yenileme özelliğini sağlayan 24 faktör üzerinde çalışma yapmışlardır. OCT4, SOX2, Klf4 ve c-myc kombinasyonunun retrovirüs aracılığı ile eksprese edilmesinin fare fibroblast hücrelerini yeniden programlamak için yeterli olduğunu göstermişlerdir (Takahashi ve ark, 2006). İndüklenmiş pluripotent kök hücre (İPKH), tanım olarak pluripotent özellik kazanmış somatik hücrelere denir. İPKH' ler oluşturulurken somatik hücreye pluripotent özellik sağlayan genler aktarılır.

2.11.1.1.4. Multipotent kök hücre

Multipotent kök hücreler genelde kendileriyle aynı embriyonik tabakayı temsil eden, sınırlı sayıda hücre tipine farklılaşabilme potansiyeline sahiptirler ve gelişimin ilk evresinde oluşup yalnızca özelleşmiş hücrelere farklılaşabilirler (Kuijk ve ark, 2011). Pluripotent hücrelerden daha sınırlı sayıda hücre tipine dönüşebilen ve tek bir yönde farklılaşmak üzere programlanmış hücrelerdir. Aşama aşama farklılaşmalar geçiren pluripotent hücreler, daha özel hücreler haline gelirler. Örneğin; kan hücrelerini oluşturacak kök hücreleri, oksijen taşıyarak solunumda gerekli olan alyuvarlar, akyuvarlar ve trombositler gibi birbirinden farklı özelliklere sahip üç ana grupta farklılaşırlar. Deri kök hücreleri çeşitli tipteki deri hücrelerini, kas kök hücreleri de farklı tipteki kas dokularını meydana getirirler. Bu özelliklere sahip kök hücrelerine multipotent kök hücreler denir (Sağsöz ve ark, 2008).

2.11.1.2. Embriyonik olmayan kök hücreler

Dokulardaki ölen veya hasar görmüş olan hücreleri yenileyebilme özelliğine sahiptir. Kendilerini yenileme ve farklılaşma yeteneklerine sahip bu hücreler, yerleşim ve farklılaşma özelliklerine göre çeşitli alt sınıflarda hematopoetik kök hücreler, mezenkimal kök hücreler olarak sınıflandırılmaktadır. Somatik kök hücre denilen erişkin kök hücrelerinin esas görevleri, bulundukları dokuyu tamir etmek ve dokunun devamlılığını sağlamaktır (Reya ve ark, 2001).

Hematopoez, organizmanın kan hücrelerini oluşturma sürecidir. Hematopoetik kök hücreler (HKH), makrofajlar, monositler, dentritik hücreler, eritrositler, lenfositler ve trombositler gibi tüm olgun kan hücrelerine farklılaşabilirler. Yetişkin kök hücre

tiplerinden biri olan ve bütün kan hücrelerine dönüşme yeteneğindeki hematopoetik kök hücrelerin gelişim ve farklılaşmaları da bu süreçte gerçekleşmektedir (Erden, 2014). Embriyonik dönemde oluşan HKH' ler, kemik iliği gelişip kök hücre fonksiyonları için gereken mikroçevreyi sağlayana kadar bu bölgeler arasında göç ederler. Doğumun gerçekleşmesiyle HKH' ler kemik iliğinde yerleşik olarak görevlerini yaşam boyu sürdürürler (Erden, 2014). Gebelik boyunca anneyle fetus arasındaki bağlantıyı sağlayarak bebeğin besin ile oksijen gereksinimini karşılayan göbek kordonunda bu hücreler oldukça zengindir ve günümüzde çeşitli hastalıkların tedavisinde gerektiğinde kullanılabilir (Lanza ve ark, 2009).

2.11.1.3. Organlardaki kök hücreler

2.11.1.3.1. Adiposit kök hücre

Yağ dokusundan elde edilen pluripotent kök hücreler de kemik iliğinden elde edilen kök hücreler kadar farklılaşabilme yeteneğine sahiptir. Uygun koşullarda elde edilmiş olan adiposit kök hücre doku ve organlardaki küçük hasarları gidermede görevli olup in vitro koşullarda adipojenik, kondrojenik, myojenik ve osteojenik hücrelere dönüşebilmektedir. Adipositler gibi mezodermal türevli dokuları ayırt edebilen hücreler, kondrositler ve osteoblastlar mezenşimal kök hücreler olarak adlandırılırlar. Yetişkin kök hücre tipi olan mezenkimal kök hücreler, çeşitli dokulardan elde edilebilmekte kültür ortamında gerekli koşullar sağlandığında hızla çoğaltılabilmektedirler. MKH' ler ilk defa 1966 yılında Fridenstein ve Petrakova tarafından tanımlanmışlardır. Fridenstein, yaptığı kemik iliği kültüründe morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin bulunduğunu ve bu hücrelerin kemik ve yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğinde olduğunu göstermiştir (Barry ve ark, 2004). Pek çok araştırmacı, MKH' lerin, nöronlar, epitelyal hücreler ve mezenşimal orijinli hücrelerde farklılaşabilen multipotent yetişkin progenitör hücrelerden farklı olarak kabul edildiğini belirtmektedir (Jiang ve ark, 2012). Yüzeye yapışma, stromal karakterde yüzey antijenlerine (CD71, CD90, CD29, CD44 gibi.) sahip olma ve multipotent farklılaşma potansiyeli, MKH' lerin tanımlanmasında kullanılan başlıca özelliklerdir (Pittenger ve ark, 1999). Çeşitli dokularda destek hücresi olarak bulunan MKH' ler, çok sayıda sitokin (interlökin 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15, v.b.), enzim ve hücre dışı matriks proteini sentezlemektedir.

2.11.1.3.2. Nöronal kök hücre

Nöronal kök hücreler merkezi sinir sisteminin gelişiminde önemli role sahiptirler ancak erişkinlerde belli bölgelerde bulunur. Nöronal kök hücreler multipotent yapıdadır. Sinir hücrelerinden nöron, astrosit, oligodentrositlerin tüm alt tipleri sinir sistemi hücre tiplerine farklılaşabilmektedir.

2.11.1.3.3. Epidermal kök hücre

Epidermal kök hücreler, kıl folikülü ve epidermis içinde yer almaktadır. Bu hücreler multipotent olup kolay elde edilebilen hücrelerdir. Epidermal devamlılığı sağlarlar, doku yaralanması sonrası dokunun onarımına katkıda bulunurlar. Organizmanın yaşamı boyunca kök hücrelerden köken alan farklılaşmamış epitel hücreler sindirim sisteminde hücre yenilenmesini hızlı bir şekilde sağlarlar.

2.11.1.3.4. Dental pulpa kök hücresi

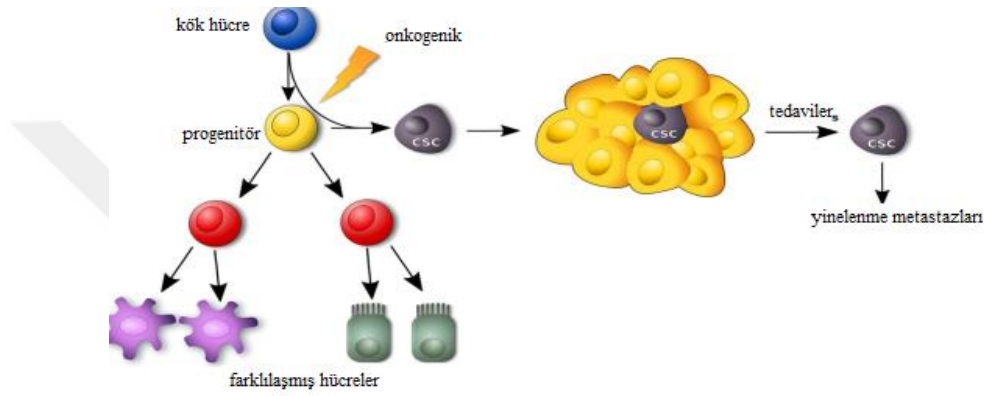
Diş pulpası kök hücreleri proliferasyon gösterebilen multipotent özellikteki mezenkimal kök hücrelerdir. Diş pulpası çeşitli hücre tiplerine dönüşebilmektedir. Diş pulpası, dişin iç kısmında bulunan yumuşak canlı dokudur. Kök hücreler bu canlı dokunun içinde bulunur ve diş ile çene arasındaki hücrelerin bağlantısını ve farklılaşmasını sağlarlar (Batouli ve ark, 2003).

2.11.1.3.5. Kanser kök hücreleri

Kanser kök hücreleri tümör dokusunun içerisinde yer almaktadırlar. Yüksek telomeraz aktivitesine sahip oldukları için çok hızlı bir şekilde çoğalabilirler (Spillane ve ark, 2007). KKH' ler hem kendini yenileme hem de tümörün korunmasını sağlayan heterojen hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahip olan ve bu nedenle normal kök hücrelerin özelliklerini paylaşan tümör hücreleridir (Şekil 33) (Marte, 2013). Bazı solid kanser türlerinde de hücre kitlesi içinde kök hücre özelliklerini barındıran belli sayıda

KKH bulunmaktadır. Bunlar kendini yenileme ve çoğalma özellikleri sayesinde çoğalarak tümör kitlesinin yeniden ortaya çıkmasına ve büyümesine neden olmaktadır. KKH' ler, epigenetik mutasyonların meydana geldiği normal kök hücrelerden üretilir (Reya ve ark, 2001; Spillane ve ark, 2007; Akar ve ark, 2009).

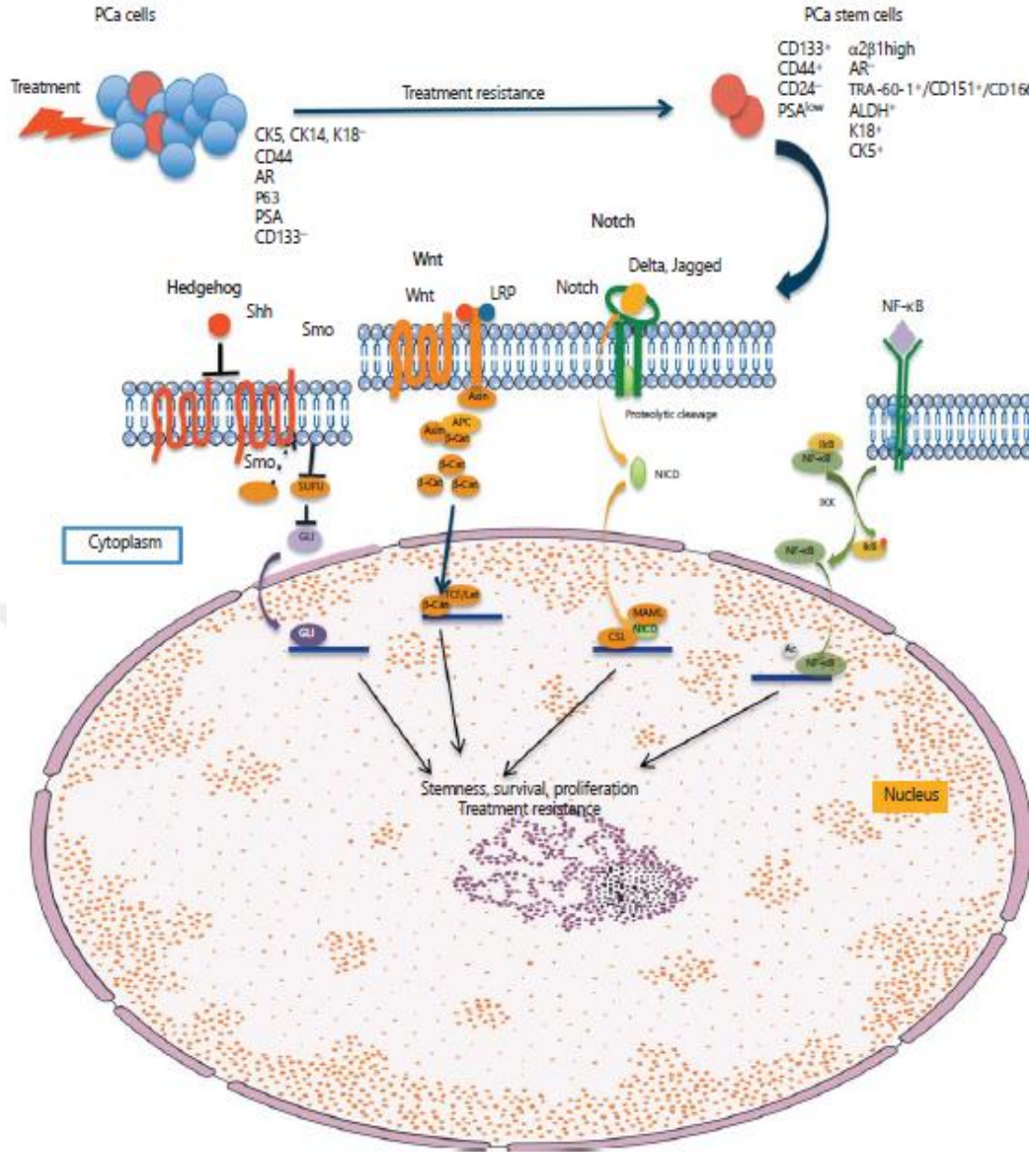
Kanser kök hücreleri, normal kök hücreler ile kendini yenileme için kullanılan sinyal yolları, OCT4 ve SOX2 gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu, anjiogenik faktörler salgılayarak anjiogenezi uyarmak, metastaz ve belirli bir bölgeye yerleşme ile ilgili ortak yüzey reseptörlerine sahip olmak gibi benzerlikler içerir (Erden, 2014).



Şekil 33. Kanser kök hücresi (CSC) modeli. (Papaccio ve ark, 2017).

Kanser kök hücreleri, özgül yüzey belirteçlerinin ekspresyonu ile de gösterilebilir. Kök hücre belirteçlerini kullanarak kök hücre tipini belirlemek günümüzde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisi olmuştur. Hücrelerin yüzeyinde yer alan, hücrede sinyal yolları üzerinde veya hücre yapışma molekülleri olarak rol oynayan belirteçlerden birçoğu CD (cluster of differentiation) denilen başlık altında toplanmış ve hücre türüne göre özgün ve yaygın olarak bulunabilmektedirler. Bununla ilgili ilk araştırmalar yüzey moleküllerini kullanarak lösemik kök hücrelerini belirlemeye yönelik yapılmıştır (Bonnet ve ark, 1997). Kök hücreler tarafından eksprese edilen özgül yüzey moleküllerinin (CD133, CD44 gibi) tanımlanması, tümör dokusu içinde bulunan kanser kök hücrelerinin diğer tümör hücrelerinden ayırt edilmesinde işlev görür. CD44 meme kanseri, mide kanseri, prostat kanseri ve kolorektal maligniteler dahil olmak üzere birçok insan kanserinde kanser kök hücresi yüzey belirteci olarak kabul edilmiştir. Aynı zamanda tüm kanser hücreleri aynı yüzey belirteçlerini de sentezleyebilmektedir. Başka bir önemli faktör bağışıklık sistemi yetersiz olan hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda tümörde, yalnızca belli grup hücrelerin tümör büyümesini sağladığını fakat diğer hücrelerin sağlamadığını

göstermektedir. Bu da kanser kök hücrelerinin yenileme ve farklılaşma iki ana görevi olduğunu göstermektedir (Al-Hajj ve ark, 2004). CD24, CD133 ve CD34 gibi KKH' leri çeşitli kanser türlerinde zenginleştirmek için kullanılır. Bu yüzey belirteçlerini eksprese eden hücreler flow sitometri yöntemiyle izole edilerek bağışıklık baskılayıcı farelere transplante edildiğinde, diğer hücelere oranla yüksek tümörojenik kapasiteye sahip olduğu bulunmuştur (Zhang ve ark, 2010; Chen ve ark, 2013). CD44 kanser kök hücrelerinin hücre yüzeyi belirteci olarak çalışmaktadır. CD44, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerine aracılık etmedeki önemli işlevleri ve özellikle kanser yayılmasında malign süreçle olan ilişkisi nedeniyle büyük ilgi görmüştür (Naor ve ark, 2002; Naor ve ark, 2008). Son zamanlarda, CD44 ekspresyonunun, tümör başlatılması ve ilerlemesi için artan potansiyel ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Epitelial tümörlerde CD44 ve CD133 kanser kök hücre yüzey belirteçleridir (Al Hajj ve ark, 2003; Dalerba ve ark, 2007; Clay ve ark, 2010). CD133 (Prominin-1) hematopoetik kök hücrelerin hücre yüzey belirteci ve prostat, kolon ve over tümörlerinde kanser kök hücrelerinin yüzey belirteci olduğu bildirilmiştir. Baş-boyun kanserlerinde izole edilen CD44 pozitif tümör hücrelerinin yüksek tümörojenik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. CD44 gen transkripsiyonu β -catenin ve Wnt sinyal yolağı aracılığıyla aktivasyonun bir parçası olarak hücre-hücre ve hücre-matriks bağlantıları tümör gelişiminde yer alır (Noto ve ark, 2013). CD133 prominin olarak bilinen, bir transmembran glikoproteinidir. Hematopoetik ve nöral dokular başta olmak üzere birçok organda kök hücre özelliği gösteren hücrelerde ekspresyonu saptanmıştır. Özellikle kolorektal kanserlerde kanser kök hücre yüzey belirteci olarak kabul edilmektedir. Kolorektal kanserler dışında, akciğer ve pankreatik kanserlerde yüksek CD133 ekspresyonunun, hastaların sağ kalım oranlarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. CD133 prostat kanserinde hücre yüzey belirteci bakımından pozitifdir. İnsan prostat kanseri, akciğer kanseri ve diğer bazı kanser hücre çizgilerinden izole edilen KKH' lerin ileri çalışmaları, SOX2' nin Nanog, OCT4 ve yüzey marker proteini CD44 gibi diğer embriyonik belirteçlerle fazla ifade edildiğini göstermiştir (Gu ve ark, 2007; Kasper, 2008) (Şekil 34). PC3 hücrelerinin CD133 oldukları yüksek seviyede hem CD133 hem de CD44 ifade ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte en yüksek seviyede CD133-CD44 ifade eden hücreler kök hücre çoğalmasını uyaran şartlar altında prostat kanser kök hücreleri açısından zenginleşmiştir. Tümör başlatma klon oluşturma kapasiteleri artmıştır. Bu hücreler potansiyel KKH' lerce zengin olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 34. Prostat kanseri (PCa) hücreleri ve PCa kök hücreleri ile ilişkili yollar (Leao ve ark, 2017).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Malzemeler

Kullanılan Madde	Firma
PC3 hücre hattı	ATCC–CRL-1435
RPMI-1640	Sigma
DMSO	Sigma
FBS	Gibco
%25 Trypsin-EDTA (1X)	Gibco
Penicilin-Streptomycin (10.000 units)	Sigma
DPBS	Sigma
Kemilüminesans Reaktif	Santa Cruz

3.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Firma
Laminar Kabin	HERA safe
CO ₂ İnkübatör	Nüve EC 160
ELISA	Thermo Labsystems Multiskan Spectrum
SDS – PAGE	Bio-Rad (Tetra Cell)
Western Blot	Bio-Rad (Transblot Turbo)
Mikroskop	Olympus BX51
Orbital Shaker	İsolab
Rotator	İsolab
Santrifüj	Hettich / Ependorf
Etüv	MRC
Elektroporatör	Bio-Rad
Flow Sitometri	Invitrogen Attive Flow cytometry,America

3.3. Hücre Kültürü

Çalışmalarda prostat kanser hücre hattı olan PC3 hücre hattı kullanıldı. PC3 hücresi ATCC (CRL-1435) den ticari olarak temin edildi.



Resim 1. Tezde kullanılan hücre kültürü kabini ve malzemeleri

3.3.1. Hücrelerin Büyütülüp Çoğaltılması

PC3 hücreleri 25 cm²' lik flasklara ekildi. Hücre kültürü ortamı olarak % 10 FBS, Penicilin-Streptomycin (100 ünite), L-Glutamine ve NaHCO₃ içeren RPMI-1640 besiyeri kullanıldı. Hücreler 37 °C' de, % 95 nem ve % 5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılıp çoğaltıldı (Resim 1).

3.3.2. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler büyütülüp çoğaltıldığında farklı ortama geçirmek için steril koşullarda pasajlandı (Resim 1). Pasajlama işleminde önce hücre besiyeri çekildi, DPBS ile yıkandı. Sonra hücreleri flasktan kaldırmak için Tripsin-EDTA çözeltisi eklendi ve % 5 CO₂ içeren etüvde hücreleri kaldırmak üzere bekletildi. Tripsin-EDTA' nın aktivitesini durdurmak için FBS içeren medium konuldu. Hücreler falkon tüpe toplanıp 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz atılıp çöken pellet medyunda süspande edildi ve yapılacak işleme göre hücre kültür platelerine ekim yapıldı.

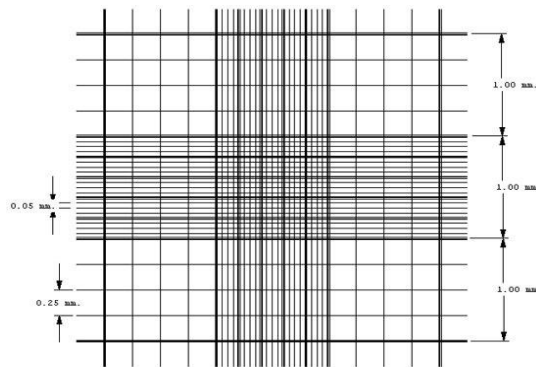
3.3.3. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Hücreler uzun zamanlı pasajlandıklarında morfolojik, büyüme, fonksiyon olarak değişime uğramaktadırlar. Dondurulan hücreler ise daha uzun süre özelliklerinde değişim olmadan saklanabilmektedirler. Çalışma süresince, hücreler belirli pasajlarla donduruldu. Dondurulma sırasında hücreleri korumak için dondurma çözeltisi kullanıldı. Hücreleri pasajlamak üzere yapılan tüm işlemler yapıldıktan sonra son aşamada hücre kültür kabına aktarılmadan % 10' luk DMSO' lu FBS eklenerek -80 °C' de saklandı. Çözdürülecek olan hücreler -80 °C' den çıkarıldı ve çözülmesi beklendi. Ardından çözünen hücreler hücre kültür kabına alınarak üzerine RPMI-1640 besiyerine eklendi, 37 °C inkübatöre yerleştirildi.

3.3.4. Hücre Sayımı

Hücre sayımı hücre yoğunluğunu belirlemek üzere yapılır ve hücre sayımı belirlenirken Thoma lamı üzerinde bulunan sayım bölgelerinden faydalanılır. Sayım bölgesinin toplam alanı 1 mm² dir. Lamel yapıştırıldığında sayım bölgesinin yüksekliği de 0.1 mm' dir. Sayım işlemini kolaylaştırmak amacıyla her bir sayım bölgesi de kendi içerisinde karelere bölünmüştür.

Thoma lamı yönteminin esası; mikroskop altında 0,1 mm³ hacimde sayım yapılarak hesaplama yardımıyla numunenin bir mL' sinde bulunan hücre sayısını belirlemektir (Şekil 35).



Şekil 35. Thoma lamında sayım yapılan karelerin toplam görüş alanı.

Yapılan çalışmada 25 cm² flask ve 6 kuyucuk plateler kullanıldı. Platelere ekim yapılmadan önce her kuyucuğa belli sayıda hücre ekebilmek için hücreyi pasajlandıktan sonra Tripan Mavisi ile boyanıp Thoma Lamında (Iso Lab) hücre sayımı yapıldı. Tripan mavisi hücrelerin canlılığını belirlemede kullanılan negatif yüklü bir boyadır.

- Sayım için; 10 µL hücre süspansiyonu, 15 µL PBS, 25 µL Tripan Mavisi karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyondan sonra Thoma Lamına 10 µL yüklenerek ışık mikroskopunda sayım yapıldı. Bu durumda ölü hücreler tripan mavisi ile boyanırken, canlı hücrelerde boyanma gözlemlenmedi. Yalnızca boyanmamış hücreler sayılarak canlı hücre sayımı gerçekleştirildi. Thoma Lamındaki 16 kareli olan 4 bölgede ayrı ayrı sayım yapılarak bu 4 bölgenin ortalaması alındı. Seyreltme faktörü de dikkate alınarak mL başına düşen hücre sayısı hesaplanarak her bir kuyucuğa ekilecek olan hücre miktarı belirlendi.

3.4. pIRF5 ve pSOX2 Plazmitlerinin Çoğaltılması ve İzolasyonu

- Projede kullanılan ekspresyon plazmidleri Rutgers Kanser Araştırma Merkezinden Dr. Betsy Barnes tarafından temin edilmiş ve daha önceki araştırmalarda kullanılmıştır (Cevik O ve ark, 2017).
- pIRF5 ve pSOX2 plazmidleri *E.coli* DH5α suşuna transforme edilirken elektroporasyon tekniği ile gerçekleştirildi. Plazmid DNA içermeyen *E.coli* DH5α suşu ön hazırlıklar yapılarak logaritmik üreme fazına getirildi. Çünkü bu fazda bakterilerin kompetentliği en yüksek düzeydedir. Uygun miktarda negatif yüklü plazmid DNA ve pozitif yüklü bakteri ile bir araya getirilerek plazmidlerin hücre zarına tutunmaları sağlandı ve çok kısa süre elektrik akımına tabi tutularak hücre zarının yapısında küçük porlar oluşturuldu. Bu porlardan plazmidlerin hücre içine girmesi sağlandı.
- Plazmid içeren bakterilerin seçilimi antibiyotikle yapılarak ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere gliserol içerisinde -80 °C' da uzun süreli olarak saklandı.

3.4.1. Elektroporasyon

Elektroporasyonda aşağıdaki işlem basamakları izlendi. Öncelikle LB broth ve LB agar hazırlandı.

LB Broth hazırlanmasında izlenen prosedür

- 5g NaCl
- 5g Tripton
- 2.5g Maya Ekstraktı

500ml dH₂O içerisinde çözülürerek pH 7.5 olacak şekilde NaOH ile ayarlandıktan sonra, şişe ile birlikte otoklavlandı ve +4 °C’ da saklandı.

LB Agar hazırlanmasında izlenen prosedür

- 5g NaCl
- 5g Tripton
- 2.5g Maya Ekstraktı
- 7.5g Agar

500 ml dH₂O içerisinde çözüldükten sonra otoklavlandı ve soğuması beklendikten sonra uygun antibiyotik (Ampisilin için 100 µg / ml veya kanamisin için 50 µg / ml) konsantrasyonu eklenerek petrilere döküldü. Katılaştıktan sonra strech film ile sarılarak +4 °C’ da saklandı.

3.4.1.1. Bakteri kültürlerinin, araçlarının ve reaktiflerinin hazırlanması

Steril olarak borosilikat cam test tüplerine 1-5 ml otoklavlanmış LB broth' u konuldu daha sonra küçük bir bakteri (*E. coli* DH5a) alikotu ile inoküle edildi. İnoküle edilmiş test tüpleri 37 °C sıcaklığa ayarlanmış inkübatöre yerleştirilerek, çalkalayıcı üzerinde yüksek hızda açılıp gece boyu inkübe edildi. LB-agar antibiyotikli hazırlandı ve petrilere döküldü, +4 °C’ de saklandı.

3.4.1.2. Elektrocompetent bakterilerin büyümesi

Her bir LB agar petrisine bakteri kültürünün 100 µl' sini yayma yapılarak dağıtıldı. Petri 4-6 saat 37 °C' de ince bir bakteri üremesi ayırt edinceye kadar inkübe edildi. Hücreler aktif olarak büyürken en competent fazda bulunmaktadır.

3.4.1.3. Elektrocompetent bakteriyel hücrelerin hazırlanması

- Bakteri, agar yüzeyini delmemeye çalışarak steril bir öze ile toplandı. Bunun için tek bir transformasyon için 2 mm çapında bir bakteri kitlesi yeterli olmaktadır.
- 1 ml buz soğukluğunda steril ddH₂O (*E. coli* için) içinde bakteri kütlesini tekrar süspanse edildi ve hiçbir kümeleşme görülmeğe kadar iyice karıştırılıp, buz üzerinde tutuldu.
- Süspanse edilen bakteriler +4 °C' de 5000 xg' de 5 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatantı atıldı, aynı hacimde soğuk steril ddH₂O içinde bakteriyel pelleti yeniden süspansiyon haline getirildi ve toplam üç yıkama için iki kez daha önce yapıldığı gibi santrifüj adımını tekrarlandı.
- Süpernatantı çıkarıldı, tekrar süspansiyon haline getirildi ve 40 µl soğuk steril ddH₂O içinde bakteriyel pellet iyice gevşetilip buz üzerinde tutuldu.

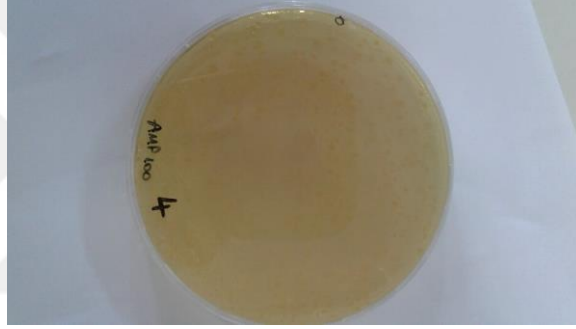
3.4.1.4. Elektrocompetent bakterilerin transformasyonu

- 40 µl bakteriyel süspansiyona 1 µg kadar plazmid DNA ilave edildikten sonra bu karışımı önceden soğutulmuş, steril 0.2 cm' lik boş elektroporator küvetine aktarıldı (Resim 2).
- Küvet elektroporasyon kuyusuna yerleştirildi ve 1,8 kV, 25 µF' de elektroporasyon yapıldı. Zaman sabiti ~ 5.0 msn olmalıdır ve hiç bir ark oluşmamalıdır.
- Elektroporator'den alınan bakteri 1 ml LB Broth içine yeniden süspansiyon haline getirildi.
- Antibiyotik seçimi olmadan 30 dakika süreyle 37 °C' de inkübe ederek hücrelerin iyileşmesine izin verildi.

- Bakterileri önceden hazırlanmış antibiyotikli LB agar petrisine 37 °C' de gece boyu inkübe edildi.



Resim 2. Elektroporasyonda kullanılan elektroporator (Bio-Rad).

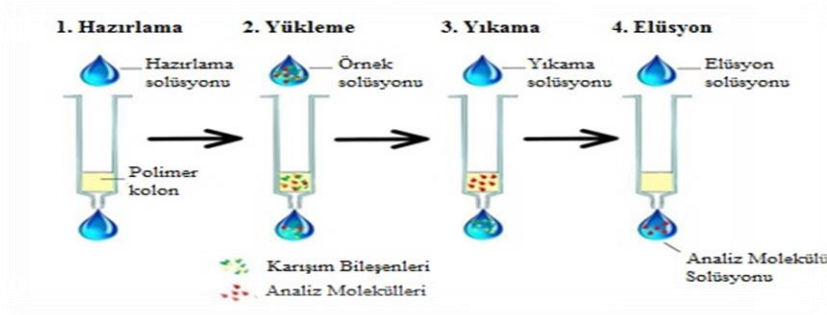


Resim 3. Elektroporasyonu yapılan E.coli katı besi yerinde seçilimi ve sıvı besi yerinde çoğaltılması.

Elektroporasyondan sonra petri üzerindeki koloniler seçildi (Resim 3). Seçilen koloniler sıvı besiyerinde çoğaltılıp plazmid izolasyonu için kullanıldı.

3.4.2. Plazmid İzolasyonu

pIRF5 ve pSOX2 plazmidi içeren dondurulmuş stok bakteri kültürü oda ısısında çözündürüldü. Bakteri kabini içerisinde alev açık olarak 8 ml LB Medyum içerisine antibiyotik, pIRF5 veya pSOX2 plazmidi içeren stok bakteri ayrı ayrı eklenerek gece boyu 37 °C' da çalkalamalı etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı. Çoğatılan bakteriler plazmid izolasyonunda QIAGEN Plazmid Mini Kiti (cat. nos. 12123) ile kullanıldı (Şekil 36).



Şekil 36. Plazmid izolasyon basamakları.

Kit içerisindeki izolasyon protokolüne göre;

- Gece boyu inkübasyona bırakılan bakteriler 6000 xg' de 15 dk santrifüj edildi. Üst faz döküldü.
- Bakteri pellet 0.3 ml P1 buffer içerisinde vortekslenerek çözüldü.
- Üzerine 0.3 ml P2 buffer ilave edildi ve karışması için hafifçe 4-6 defa alt üst edildi. Oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.
- 0.3 ml P3 buffer ilave edilerek hafifçe karıştırıldı ve buz üzerinde 5 dakika inkübasyona bırakıldı. P3 buffer eklendikten sonra oluşan mavi renk yavaş yavaş beyaza dönmeye başladı.
- Beyaza dönen ependorflar +4 °C' de soğutmalı santrifüjde 14.000 xg' de 10 dakika santrifüj edildi.
- Qiagen kolonu içerisine 1 ml QBT solusyonu eklenerek kolondan geçmesi beklendi.
- Elde edilen süpernatantlar kolona yüklenerek yerçekimi etkisiyle kolondan akması beklendi.
- Kolon 2 x 2 ml olacak şekilde QC buffer (yıkama solüsyonu) ile yıkandı ve kolondan yerçekimi ile akması beklendi.
- Kolona bağlanan DNA temiz bir 2 ml' lik ependorfa 0.8 ml QF buffer ile ayrıldı, QF buffer önceden 65 °C' de ısıtılarak kullanıldı.
- DNA ependorfa alınan karışımı üzerine oda sıcaklığındaki propanol eklenerek DNA çöktürmesi yapıldı. 15.000 xg' de 30 dakika +4 °C' de santifüj edildi. Supernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Santrifüjden çıkan ependorflar izopropanolden kurtarmak için dökülüp peçete ile kurulandı. Pellet ependorfun dibinde kaldı.
- DNA pellet 1 ml oda ısısındaki % 70' lik ethanol ile yıkandı ve 15.000 xg' de 10 dk santrifüj edildi. Supernatant dikkatlice döküldü.

- Pellet 5 dakika etanol uana kadar kurutuldu. Ardından yeterli miktarda uygun tamponda özöldü (TE buffer, pH 8.0).
- Plazmid DNA örneğinin bir kısmı miktar ve saflık kontrolü yapmak amacıyla ayrı bir ependorfa alınarak kalan kısım ilerki deneylerde kullanılmak üzere -20 °C’ da saklandı.

3.4.3. Plazmidlerin Saflık ve Miktar Tayini

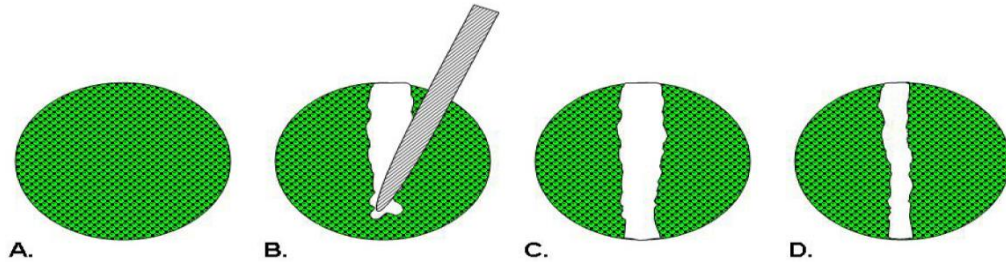
İzole edilen plazmidler nanodropta ölçümü yapıldı. Plazmidlerin kontrolü agaroz jel elektroforezi yapılarak gerçekleştirildi. % 0, 03 ethidium bromür % 1 agaroz jel dökölerek örnekler 6x DNA Loading buffer ile kuyucuklara yüklendi ve 100 V akımda yürütöldü. Bantlar SyneGene görüntöleme cihazında görüntölendi.

3.5. IRF5 ve SOX2 İçin Transfeksiyonu

pIRF5 ve pSOX2 ekspresyon plazmiti kullanılarak 6 kuyucuk plate için 1 µg DNA ile transfeksiyon yapıldı. IRF5 ve SOX2 protein overekspresyonu gerçekleştirildi. Transfeksiyonda plazmid özel bir transfeksiyon reaktifi içerisindeki lipozomla (Lipofectamine 2000) kaplanarak hücre içine girişı sağılandı. Bunun için kullanılan ticari kitin protokolüne uygun yapıldı. Transfeksiyonun gerçekleştiğı 8-12 saat sonra mikroskoptan görüntü alınarak hücre canlılıkları kontrol edildi ve 24 saat inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon sonrasında hücreler IP ve western blot deneyleri için kullanıldı.

3.6. IRF5 ve SOX2 Overekspresyonunun Migrasyon Üzerine Etkisi

Scratch testi, hız, süreklilik ve polarite gibi temel hücre göçü parametrelerini ölçmek için yaygın olarak kullanılan basit ve tekrarlanabilen bir testtir. Hücreler konfluent olmak için büyürlerken pipet ucu ile ince bir çizgi çekilerek boşluk açılır. Boşluk kenarındaki hücreler polarize olarak hücre hücre iletişiminden ötürü boşluğa göç eder (Şekil 37).



(A) Konfluent hücre hattı. (B) Steril bir pipet yardımı ile hücre hattında bir yara oluşturulması. (C) Çizilerek oluşturulan yara. (D) Yaranın açılmasından 24 saat sonra yaranın kapanma miktarı

Şekil 37. Scratch Assay (Keren IH and Renee LH, 2011)

pIRF5 ve pSOX2 ile transfeksiyon sonrasında IRF5 ve SOX2 proteinlerinin overekspresyonun hücre migrasyonuna olan etkisi araştırılmıştır. Transfeksiyondan sonra hücreler 37 °C’ de, % 95 nem ve % 5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılıp çoğaltıldı. Hücreler % 50 konfluent olunca steril bir ortamda pipet ucu ile Şekil 36’ da gösterildiği gibi kuyucukların ortasından baştan başa çizildi. 0 ve 24 saat görüntüleri alınarak transfeksiyonun migrasyon ve proliferasyon üzerine olan etkisi değerlendirildi.

3.7. BCA Protein Tayini

Bicinchoninicasit (BCA) protein tayin kiti (Santa Cruz BCA Protein Assay Kit, sc-202389) konsantrasyonu bilinmeyen örneklerdeki protein miktarını belirlemek için kullanılır. Prensip olarak oda sıcaklığında sistein, sistin, triptofan ve tirozin kalıntıları Cu⁺² iyonlarını Cu⁺¹ e indirgerler. Daha yüksek sıcaklıklarda (37 °C ila 60 °C), proteindeki peptid bağları da bu indirgemeyi gerçekleştirir. Her Cu⁺¹ iyonu, 2 BCA molekülü ile kompleks oluşturur. Kompleks 562 nm’ de absorbans veren mor renk oluşturur. Bilinmeyen örnekteki absorbans miktarı standart ile karşılaştırılır ve örnekteki toplam protein miktarı hesaplanır.

Hücre lizis solüsyonu ile toplanan örnekler BCA protein tayin kitine uygun şekilde 96 kuyucuklu elisa plakasına 2 tekrarlı olarak yüklendi. Üzerine hazırlanan BCA solüsyonu eklenerek 37 °C’ de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 562 nm’ de ölçüm alındı. Alınan absorbans değerleri Microsoft Excel programına aktarılarak toplam protein miktarları hesaplandı.

Hazırlanan çözeltiler:

- BCA solüsyonu: Reaktif A ve Reaktif B, 1:50 oranında hazırlandı.
- BCA standart solüsyonu: 2 mg / ml stok solüsyon, PBS ile 1000 µg / ml, 500 µg / ml, 250 µg / ml, 125 µg / ml, 62,5 µg / ml ve 31,25 µg / ml olacak şekilde seri dilüsyon yapıldı.
- 96 kuyucuklu elisa plakasına 25 µl örnek veya 25 µl standartlar yüklendi. Yükleme yapılan kuyuların üzerine 200 µl BSA solüsyonu eklendi.
- 37 °C’ da 30 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında Thermo Labsystems – Multiskan Spectrum plaka okuyucuda 562 nm’ de ölçüm alındı (Resim 4).



Resim 4. BCA Protein tayini. Multiskan Spectrum ve elisa plate yükleme.

3.8. Hücrelerde Yapılan Western Blot Çalışmaları

Hücreler toplandıktan sonra patlatma tampon kullanılarak buz içerisinde bekletildi ve patlamaları sağlandı. 12.000 xg’ de 4 °C’ de 10 dakika santrifüj edilerek üst fazda Western Blot çalışmaları yapıldı.

3.8.1. SDS PAGE/Western Blot

Proteinlerin birbirlerinden ayrılmasında SDS-PAGE yaygınlaşarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde SDS anyonik bir deterjan olup, proteinleri bir jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrışmasını sağlar. Proteinler içerdiklere aminoasitlere bağlı olarak genellikle artı veya eksi yüke sahiptirler. Her bir protein molekülü çok sayıda (-) yüklü deterjan molekülü bağlar ve proteinlerin (-) yük ile yüklenmesini sağlar. Voltaj uygulandığında (+) elektrota doğru ilerlemesine neden olur. SDS’ nin proteinlerin

hidrofobik alanlarına bağlanması ile birden fazla alt bölüme sahip proteinlerin birbirinden ayrılır. Polimerleşme reaksiyonunda akrilamid molekülleri yanyana bağlanarak düz zincirler oluşturur, bis-akrilamis molekülleri ise akrilamid molekülleri arasında çapraz bağlanmalar oluşturularak jelleşmeyi başlatır. Polimerleşme derecesi sıcaklık, pH, APS, TEMED miktarına göre farklılık gösterir. Numuneye 2-merkaptoetanol eklenmesinin sebebi proteinlerin yapısında bulunan disülfid bağlarını kırmaktır. Böylece her bir polipeptid ayrı ayrı analiz edilir. SDS-PAGE de ayırım polipeptidin molekül ağırlığıyla sağlanır. Elektroforez süresinde negatif yüklü SDS-protein kompleksleri porlu akrilamid jel içinde göç eder. Düşük derişimde hazırlanan jellerin gözenekleri daha büyük olup, daha büyük molekül ağırlıklı biyomoleküllerin ayrılmasında kullanılır. Küçük proteinler büyük proteinlere göre porlardan daha çabuk ve kolay geçerler. Böylece proteinler jel içinde göç ederken büyüklüklerine göre bantlara ayrılır. Jelde ayrılan proteinler bir membrana aktarılarak blotlanır. Membran ve jel sandviç yapılarak semi-dry elektroforetik transfer, düşük voltajda hızlı transfer yapılır. Blotlamadan sonra hedef proteini tanımlamak için antikor kullanılır. Blotlamadan sonra membran ilgili proteine karşı primer antikorlarla solüsyonunda inkübe edilir. İkinci antikor, birinci antikora spesifik olarak bağlanır. Substrat eklendiğinde enzim bu substratla reaksiyona girer. Böylece ilgili proteini içeren bant işaretlenmiş olur.

3.8.2. Western Blot Aşamasında Hazırlanan Çözeltiler:

- 4X yığınlama jeli çözeltisi: 0.5 M Tris, % 0.4 SDS, pH: 6.8
- 4X Ayırma jeli çözeltisi: 1.5 M Tris, % 0.4 SDS, pH: 8.8
- % 30 Akrilamid-bis çözeltisi
- % 10 Amonyum Persülfat çözeltisi (APS)
- % 10 SDS çözeltisi
- TEMED
- 2X Örnek yükleme tamponu: % 4 SDS, % 20 gliserol, % 10 β -merkaptoetanol, %0.004 bromfenol mavisi ve 0.125 M TrisHCl, (pH 6.8)
- Elektroforez yürütme çözeltisi: 5 m M Tris, 38.4 mM Glisin, % 1 SDS
- Transfer çözeltisi: 5 mM Tris, 38.4 mM Glisin, %20 Metanol
- Bloklama çözeltisi: % 2' lik BSA çözeltisi

- TBST: 20 mM Tris, 154 mM NaCl, % 0.1 Tween 20
- Primer antikor (1:1000): GAPDH (sc-25778), IRF5 (sc-390364), OCT4 (sc-9081), SOX2 (sc-17320), NANOG (sc-33759)
- Sekonder antikor (1:3000): (HRP konjugatlı sc-2030(R), sc-2020(G), sc-516102(M))
- Kemilüminesans Reaktif: Santa Cruz (sc-2048)

Tablo 4. SDS-poliakrilamid jelin yoğunluğuna göre hazırlanışı.

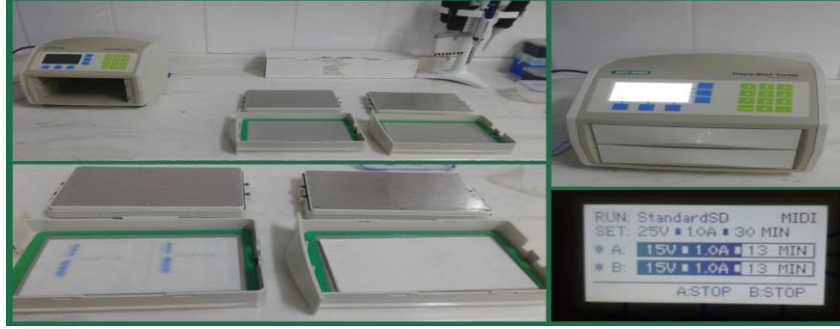
Madde	% 4' lük Yığınlama jeli	% 12' lik Ayırma jeli	%15' lik Ayırma jeli
4X yığınlama çözeltisi	1.25 ml	-	-
4X Ayırma çözeltisi	-	2.5 ml	2.5 ml
% 30 Akrilamid-bis	0.65 ml	4 ml	5 ml
%10 SDS	50 µL	100 µL	100 µL
APS	25 µL	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	10 µL	10 µL
Distile su	3.05 ml	3.4 ml	2.4 ml

- Jeller hazırlanıp camlar arasında polimerleşmesi sağlandıktan sonra tanka yerleştirildi (Tablo 5).
- İçerdikleri protein miktarları tespit edilen örnekler, 1:1 oranında hazırlanan örnek yükleme tampon ile 5 dakika 95 °C kaynatıldı. Her kuyucuğa 25 µg / mL oranında protein içeren numuneler yüklendi. Bir kuyuya 5 µl standart (Intron, 24052) yüklendi. Elektroferezde numuneler ilk önce 100 V 1 saat yürütüldü (Resim 5).



Resim 5. SDS-PAGE jel dökümü.

- Elektroforez sonrasında jeldeki proteinlerin membrana geçmesi için yarı kuru sistemle immuno blotlama yapıldı. PVDF membran blotlama kağıdına yerleştirildi. Membran üzerine jel dikkatlice yerleştirilerek blotlama işlemi 25 Volt ve 1 Amper 30 dakika gerçekleştirildi (Resim 6).



Resim 6. Jeldeki proteinlerin PVDF membrana transferi.

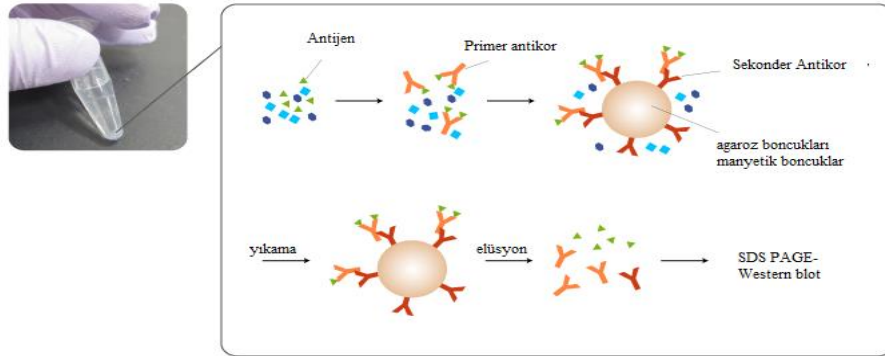
- Proteinlerin PVDF membrane transferinden sonra membran 2 saat süre ile oda ısında % 2' lik BSA ile bloklandı. 2 saat sonra primer antikor ile +4 °C' de gece boyu karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBST ile 3 kez 10' ar dakika yıkandı.
- Membran, sekonder antikorla oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBST ile 3 kez 10' ar dakika yıkandı.
- Kemilüminesans substrat içeren çözelti ile (Santa Cruz Immuno Cruz™ Western Blotting Luminol Reagent: sc-2048) ile 1 dakika karanlıkta inkübe edildi.
- Bantlar SyneGene görüntüleme sistemi kullanılarak analiz edildi. GAPDH referans protein olarak kullanıldı. Bantların dansitometrik analizi İmageJ (NIH, USA) programında yapıldı.

3.9. İmmünopresipitasyon (IP) Deneyleri

İmmünopresipitasyon deneyleri in-vivo protein-protein etkileşimlerinin analizinde kullanılır. Agaroz yapıda olan boncuklar üzerine bulunan protein A / G içeren IgG spesifik antikor bulunan bir yapıdadır. Hücre lizatının içerisine hedeflenen proteinin antikoru eklenir ve agaroz boncuk ile muamele edildiği zaman IgG ile bağlanması sağlanır. Santrifüjlendiği zaman agarozun yoğunluğu sebebiyle dibe çöken pelletle hedeflenen

proteini ilk ilişkili proteinler gelir. İmmünopresipite olmuş proteinler LCMS ile analiz edilebilir veya birbirleriyle etkileşen proteinlerin kimliğini teyit için Western blotla da analiz edilir (Şekil 38).

- Patlatma solüsyonu ile toplanan hücreler 12.000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Üst fazdan 60 µl input örnekleri için ayrılarak 1:3 oranında hazırlanan 4x örnek yükleme tampon ile 5 dakika 95 °C kaynatıldı. Örnekler western blot deneylerinde kullanılmak için -20 °C' de saklandı.
- IP denemesi için süpernatant örneklerinden ayrı bir ependorfa alındı.
- İçerisine 10 µl uygun primer antikor (IRF5 veya SOX2) konularak ependorfların ağzı parafilm ile kapatıldı.+4 °C' de rotator üzerinde 6 saat inkübasyona bırakıldı.
- 6 saat sonunda primer antikor ile inkübasyona bırakılan örneklerin üzerine 20 µl protein A / G agarose eklenerek +4 °C' de rotator üzerinde 48 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda örnekler 3000 rpm 10 dakika santrifüj edildi.
- Pellet 3 defa 500 µl RIPA buffer ile yıkandı (3000 rpm 10 dakika santrifüj).
- Yıkamalar sonunda kalan pellet 1:1 oranında hazırlanan 2x örnek yükleme tampon ile 5 dakika 95 °C' da kaynatıldı. Tüm örnekler western blot deneylerinde kullanıldı.



Şekil 38. İmmünopresipitasyon ile protein saflaştırma basamakları
(<http://ruo.mbl.co.jp/bio/g/support/method/immunoprecipitation.html>)

3.10. CD133/CD44 Bağlanma Deneyleri

IRF5 ve SOX2 proteinlerinin overekspresyonun CD133 ve CD44 yüzey belirteçleri üzerindeki değişiklikleri flow sitometre ile ölçülmüştür. Flow sitometri akan bir sıvı içerisindeki hücrelerin özelliklerinin incelenmesidir. Bir akış kanalı boyunca belirli bir hızda akan bir sıvının içerisinde bulunan hücrelerin farklı özelliklerini aynı anda belirleyen sistemdir. Flow sitometri sisteminin bileşenleri akış (sıvı) sistemi, ışık kaynağı, filtreler-sinyal dedektörleri, bilgisayar-yazılım, ayırma mekanizmasıdır. Dedektör filtreler hücreden gelen ışık saçılımı, floresans emisyon filtre ve dedektörlerde dijital sinyale dönüştür ve antikor aracılığıyla antijeni göstermek için kullanılan renk maddelerine florokrom madde (floresan antikor) denir. Bunun kullanılmasının amacı direkt hedefin tespiti ile biyolojik ve biyokimyasal özellikleri saptamaktır. Değişik dalga boylarındaki floresan ölçümler florokromla işaretli hücre yüzey reseptörleri, sitokin gibi moleküller hakkında bilgi verir. Floresan yoğunluğu salınan enerjinin miktarı hücrede bulunan bağlanma bölgelerinin miktarı ile doğru orantılıdır. Hücrenin iç yapısı, hücrenin büyüklüğü ve hücrede incelemek istediğimiz antijene spesifik bağlanan floresan bağlı antikordan gelen floresan ışımaya miktarı ölçülmektedir. FITC (Fluorescein Isothiocyanate), PE (Phycoerythrin), PI (Propidium İodide), ECD (Energy Coupled Dye) gibi çeşitli boya vardır. Bu boyalar farklı absorbanlarda farklı dalga boyları farklı renk verirler. Tek floresan boya ile işaretli antikor kullanılmasıyla hücre yüzey belirteci saptanır. Bu yöntem ile sitokinlerin tespiti zor ölçülür. Çünkü florokrom boyalı antikorların hücre içerisine girmesi zordur. Bu nedenle hücreler florokrom boya eklenmeden önce; seri dilüsyonda fikse edilip morfolojik zarara uğramadan, hücre zarının geçirgenliği artırılır, daha sonra boya eklenir. Flow sitometrinin avantajları çok sayıda hücre analizi, kısa sürede analiz ve her hücrede 8-10 parametrenin saptanabilmesini sağlar.

- pIRF5 ve pSOX2 ile transfeksiyon sonrasında hücreler 37 °C' de, % 95 nem ve % 5 CO₂ içeren ortamda 36 saat inkübasyona bırakılıp çoğaltıldı.
- Hücreler inkübasyon sonrasında tripsin-EDTA kullanılarak kaldırıldı ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Hücre pelleti % 2' lik paraformaldehid ile 3 saat 4 °C' de fikse edildikten sonra hücre süspansiyon solüsyonu ile süspanse edildi. Süspanse edilen hücrelerde 5µL CD133-FITC veya 5 µL CD44-FITC antikorları (ThermoFisher, USA) konularak 1 saat inkübe edildi.

- İnkübasyon sonrasında bağlanmayan antikorları ayırmak için hücreler 1000 rpm’ de 5 dakika santrifüj edilerek PBS ile yıkandı.
- Pellet PBS ile süspanse edilerek flowsitometride (Invitrogen Attune Flowcytometry, America) bağlanma düzeyleri ölçüldü. IRF5 ve SOX2 proteinin CD133 ve CD44 düzeyleri üzerine olan etkisi değerlendirildi.

3.11. İstatistiksel Analiz

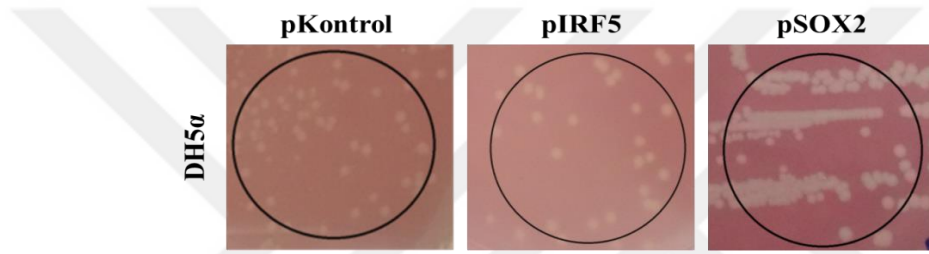
Bu tez çalışmasında İstatistiksel analiz yönteminin seçimi ve uygunluğunun tespitinde normal dağılımlar araştırılmış ve SPSS 15.0 analiz programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farkların karşılaştırılması için One Way Anova analizi yapılmış ve alt gruplar arasındaki farkları görmek için posthoc testlerinden Tukey testinden yararlanılmıştır. Gruplar arası farklılık anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$ olduğundan dolayı).

4. BULGULAR

4.1. Plazmidlerin oğaltılması ve Klonların Seçimi

Elektroporasyon ile transformasyonu yapılan bakteriler LB Agarda büyütüldü ve koloniler seçilerek ayrı ayrı petrilere üretildi. İzolasyon için kolonilerden alınan bakteri kültürleri LB medyumda üretilerek plazmid izolasyonunda kullanıldı.

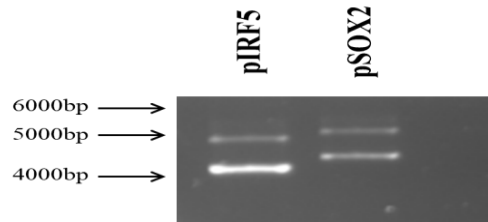
Antibiyotik direnç geni içeren plazmidlerin DH5a *E.coli* hücrelerine transformasyonu sonrasında, antibiyotikli agarlarda büyüdüğü ve çoğaldığı görülmüştür. Çoğalan bakterilerden tek koloni Resim 7’ de yer alan alanlardan seçilmiştir.



Resim 7. DH5α Bakterileri Kompetent hücre kolonileri.

4.2. Plazmit İzolasyonu Sonrasında Agaroz Jel Elektroforezi

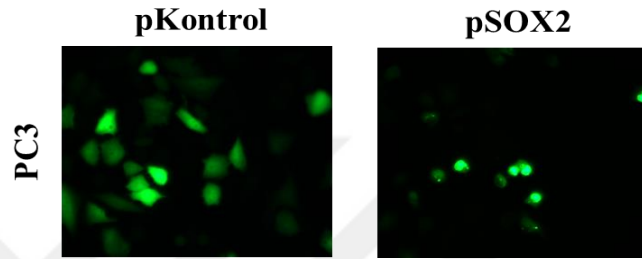
İzole edilen plazmidlerin Nanodrop ölçümleri alınarak miktarı ve saflığı belirlendi. Buna ek olarak Agaroz jel elektroforezi yapıldı. İzole edilen plazmidler kullanılan DNA markeri ile % 1’ lik Agaroz jelde yerleri belirlendi. Görüntü iki bant şeklinde görüldü. Üst bant nicking plazmid DNA, alt bant süpersarmal plazmid DNA olarak beklenen sonuçlar elde edildi (Şekil 39).



Şekil 39. Agaroz jel elektroforezinde plazmidlerin ayrıştırılması.

4.3. Plazmitlerin Protein İfadesi Kontrolü

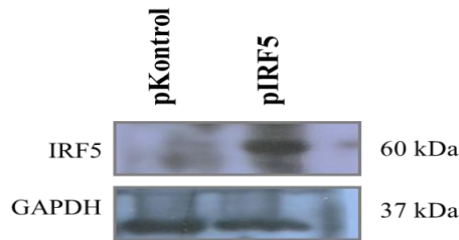
pKontrol-GFP ve pSOX2-GFP plazmidlerinin protein ifadeleri floresan mikroskopta kontrol edildi. Kontrol plazmitinin GFP proteininin overekspresyonu hücrenin her yerinde lokalize olduğu görüldü. pSOX2 GFP ile yapılan overekspresyonda ise nükleus çevresinde lokalize olduğu görüldü. SOX2 proteini nükleer bir protein olup, ekspresyon sonrası nükleus çevresinde ekspresyon yapması proteinin ifadesinin doğru yerde gerçekleştiğini göstermektedir (Resim 8).



Resim 8. Plazmit transfeksiyonunun PC3 hücrelerinde ekspresyonu.

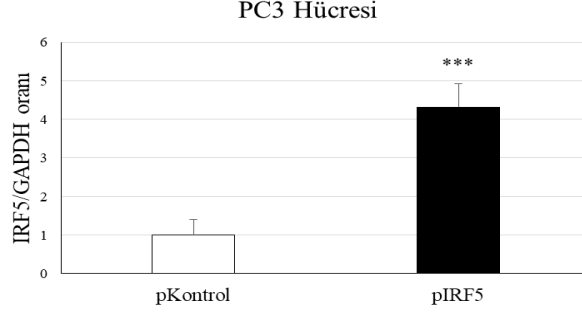
4.4. Overekspresyon Yapılan Proteinlerin Western Blot Analizleri

PC3 hücrelerinde yapılan western blot analizlerinde IRF5 proteinin overekspresyonu spesifik antikor kullanılarak gösterildi. Kontrol grubu olarak IRF5 gen bölgesi içermeyen plazmid ile transfeksiyon yapılarak hücrede endojen IRF5 miktarı kontrol edildi (Şekil 40).



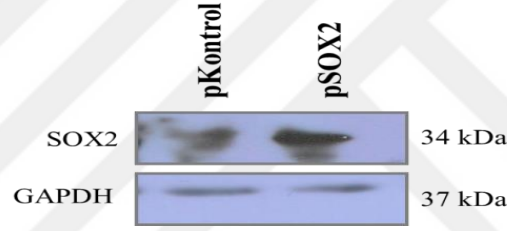
Şekil 40. pIRF5 ekspresyon vektöründe IRF5 protein ekspresyon western blot ile kontrolü.

pIRF5 ile overekspresyon yapılan hücrelerde kontrol grubuna oranla IRF5 proteinin yaklaşık 4.3 kat fazla miktarda sentezlendiği görüldü. IRF5 overekspresyonu PC3 hücrelerinde başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve kontrol grubuna göre artışı anlamlı bulunmuştur ($p < *** 0.001$) (Şekil 41).



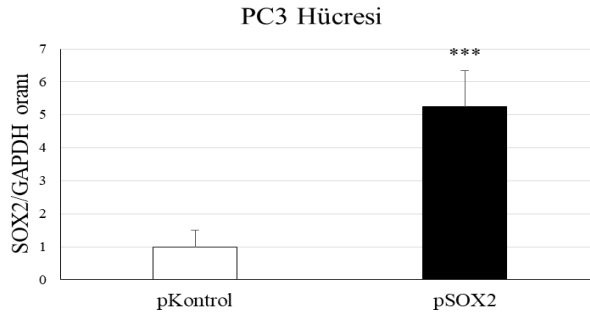
Şekil 41. pIRF5 ekspresyon vektöründe IRF5 protein ekspresyon düzeyleri.

Western Blot analizlerinde SOX2 proteinin overekspresyonunun PC3 hücrelerinde gerçekleşip gerçekleşmediği gösterilmiştir. Kontrol grubuna göre daha yüksek oranda SOX2 protein ekspresyon bandı sağlandı. SOX2 protein 34 kDa ağırlığında olup western blot bantlarında da doğruluğu tespit edilmiştir. Referans protein olarak GAPDH kullanıldı (Şekil 42).



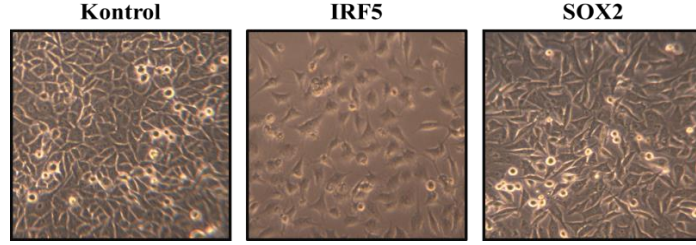
Şekil 42. pSOX2 ekspresyon vektöründe SOX2 protein ekspresyon western blot ile kontrolü.

pSOX2 ile overekspresyon yapılan hücrelerde kontrol grubuna oranla SOX2 proteinin yaklaşık 5.1 kat fazla miktarda sentezlendiği görüldü. SOX2 proteini overekspresyonu PC3 hücrelerinde gerçekleştirilmiş ve kontrol grubuna göre artış anlamlı bulunmuştur (Şekil 43) ($p < ***0.001$).



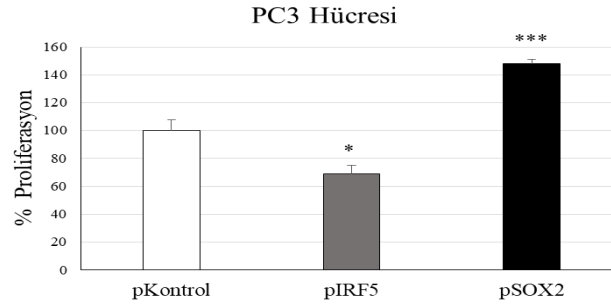
Şekil 43. pSOX2 ekspresyon vektöründe SOX2 protein ekspresyon düzeyleri.

Transfeksiyon sonrası PC3 hücrelerinin morfolojilerini değerlendirmek için mikroskop altında hücresel değişiklikler ve proliferasyon incelenmiştir. IRF5 proteininin hücre proliferasyonunu negatif yönde etkilediği buna karşılık SOX2 proteinin proliferasyonu pozitif yönde etkilediği gözlemlendi (Resim 9).



Resim 9. pIRF5 ve pSOX2 ekspresyon vektörlerinin transfeksiyon sonrası hücre morfolojileri

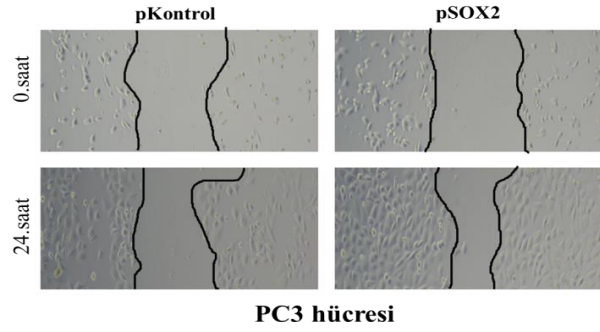
İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde kontrol grubunun proliferasyonu % 100 olarak alındığında pIRF5 ile transfeksiyon yapılan hücrelerde proliferasyon yaklaşık olarak % 75, pSOX2 ile transfeksiyon yapılan hücrelerde ise yaklaşık olarak % 130 olarak bulunmuştur (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında) (Şekil 44).



Şekil 44. pIRF5 ve pSOX2 vektörlerinin hücre proliferasyon grafiği

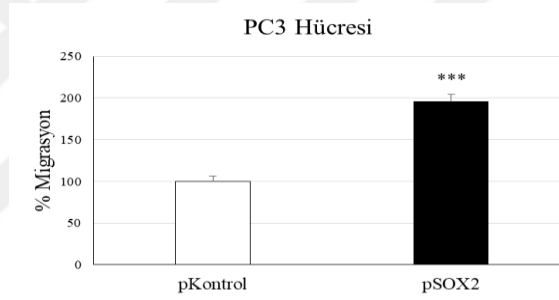
4.5. SOX2'nin Hücre Migrasyonu Üzerine Etkisi

Migrasyon denemesi için scratch yöntemi kullanılarak elde edilen verilerde kontrol grubuna kıyasla pSOX2 vektör plazmidini ile overekspresyon sağlanan hücrelerde; plate üzerine açılan boşluğun daha fazla kapandığı gözlemlendi. Bu sonuç SOX2 proteininin migrasyonu hızlandırdığını göstermektedir (Resim 10).



Resim 10. pSOX2 ekspresyon vektörünün PC3 hücrelerinde migrasyon plate görüntüsü

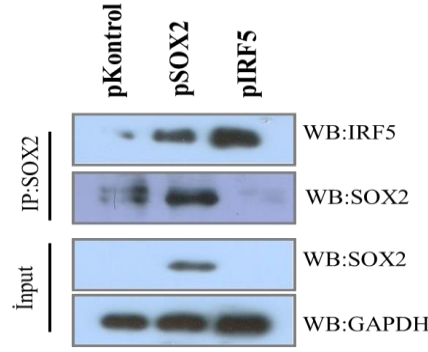
İstatistiksel olarak pSOX2 ekspresyon yapılan PC3 hücrelerinde, kontrol grubuna oranla migrasyonun yaklaşık % 80 arttırdığı bulunmuştur. Bu sonuçlar SOX2 proteinin PC3 hücrelerinde proliferasyonu pozitif yönde etkilediğini göstermektedir (***) $p < 0.001$ kontrol grubuna göre) (Şekil 45).



Şekil 45. pSOX2 ekspresyon vektörünün PC3 hücrelerinde migrasyon grafiği.

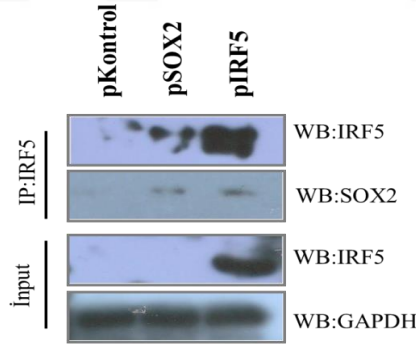
4.6. IRF5 İle SOX2 Protein Etkileşimleri Sonuçları

SOX2 ve IRF5 overekspresyon yapılan PC3 hücrelerinde SOX2 ile IP yapılan örneklerde hem IRF5 hemde SOX2 yoğun bir şekilde görülmektedir. Aynı örneklerin inputlarında SOX2 kontrolü yapıldığında IRF5 overekspresyon yapılan hücrelerde kontrol hücrelerine göre SOX2 protein ekspresyonu daha az olduğu görülmektedir. IRF5 overeksprese olduğu zaman SOX2 düzeyleri azalmış olabilir. IRF5 ve SOX2 proteinlerinin birbirleri ile ilişkide olduğu bantlarda görülmektedir. GAPDH endojen protein kontrolü olarak kullanılmış ve protein miktarlarının her bir kuyuda eşit oldukları gösterilmiştir (Şekil 46).



Şekil 46. SOX2 ile IP yapılan örneklerde SOX2 ve IRF5 protein ilişkisi

IRF5 ile yapılan IP örneklerinde SOX2 ve IRF5 overekspresyonu yapılan hücreler karşılaştırıldığı zaman SOX2 bantlarının her iki blottada olduğu görülmektedir. Kontrol hücrelerinde de bu bantlar görülür ve IRF5 overekspresyon yapılanlarda bantlarında daha yoğun olduğu görülmektedir. Aynı şekilde örneklerin IRF5 bantları değerlendirildiği zaman kontrol grubuna göre bantlar daha yoğundur. Inputlarda IRF5 overekspresyon düzeyleri kontrol edildiği zaman yalnızca pIRF5 plazmidi ile overekspresyon yapılan örneklerde bant görülmektedir. GAPDH endojen protein olarak kullanılmış ve her bir kuyuda örneklerin eşit yüklendiği görülmektedir (Şekil 47).

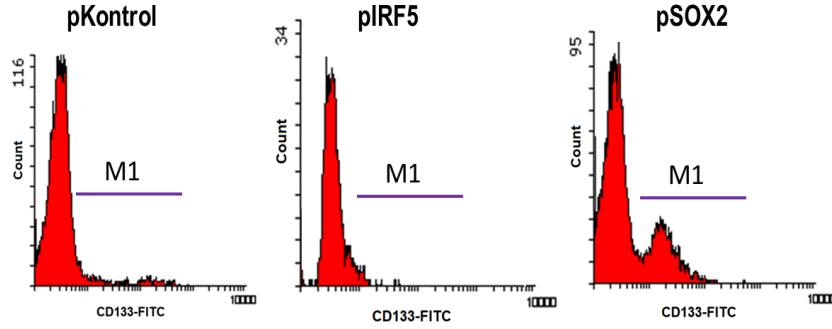


Şekil 47. IRF5 ile IP yapılan örneklerde SOX2 ve IRF5 protein ilişkisi.

İmmünopresipitasyon sonuçları bütünü ile değerlendirildiği zaman IRF5 ve SOX2 proteinleri birbirleri ile etkileşerek transkripsiyonda önemli rol oynar. İki proteinin birbirleri ile etkileşimde olması ve farklı bölgelerden bağlanmalar yaparak çeşitli fonksiyonları yerine getirmesi konusunda ileri analizlere ihtiyaç vardır.

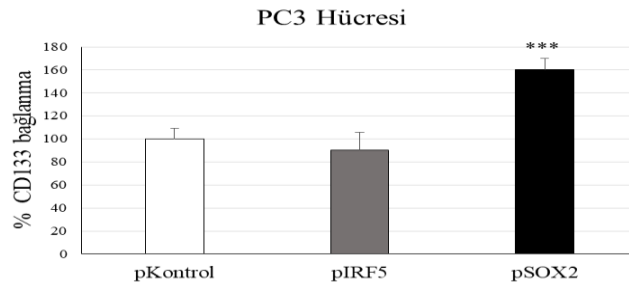
SOX2 ve IRF5 etkinliği olan hücrelerin seçimi yöntem kısmında anlatıldığı şekilde gerçekleştirilip ardından CD133 antijeni için CD133-FITC işaretli antikora işaretlendi. CD133 olan seçilmiş hücrelerden, bu işaretli antikorlar aracılığıyla CD133-

FITC ile pKontrol, pIRF ve pSOX2 hücreler seçilerek okundu. Kontrol grubuna kıyasla SOX2'nin proliferasyonundaki artış daha fazla CD133 bağlanması gösterirken, pIRF5 bağlanmasını azalttığı gözlemlenmiştir (Şekil 48).



Şekil 48. pIRF5 ve pSOX2 yapılan örneklerde CD133 bağlanma grafikler

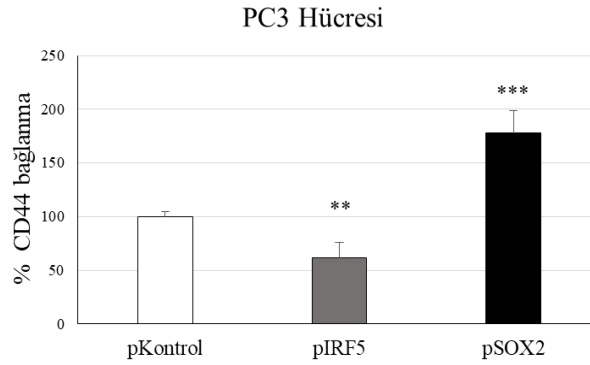
CD133 ekspresyonu PC3 hücrelerinde değerlendirildiğinde kontrol grubunun bağlanması % 100 olarak alındığında pIRF5 ile transfeksiyon yapılan hücrelerde bağlanma yaklaşık olarak % 90, pSOX2 ile transfeksiyon yapılan hücrelerde ise yaklaşık olarak % 150 olarak bulunmuştur (Şekil 49) ($p < ***0.001$). Bu bağlanma PC3 hücrelerinde SOX2 aşırı ifadesi CD133 yüzey antiijenlerine de yüksek bağlanma göstermesi SOX2'nin proliferasyonu arttırmış olduğunu göstermektedir.



Şekil 49. pIRF5 ve pSOX2 yapılan örneklerde CD133 bağlanma yüzdesi

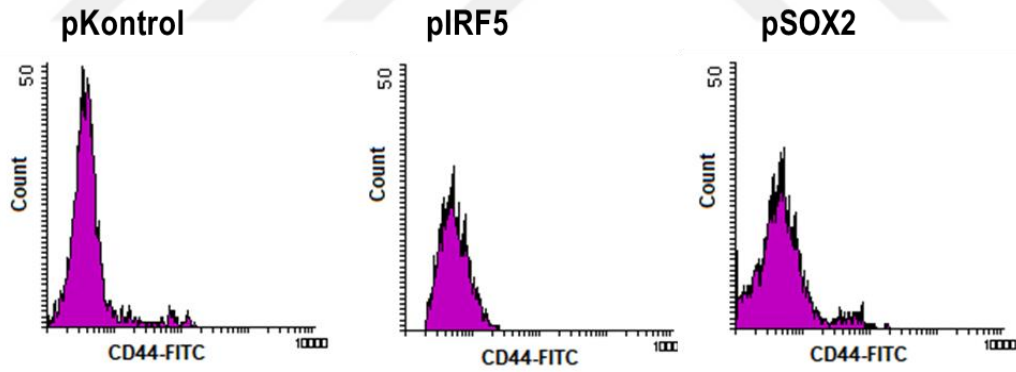
CD44 ekspresyonu PC3 hücrelerinde değerlendirildiğinde kontrol grubunun bağlanması % 100 olarak kabul edildiğinde pIRF5 ile transfeksiyon yapılan hücrelerde bağlanma yaklaşık olarak % 60, pSOX2 ile transfeksiyon yapılan hücrelerde ise yaklaşık olarak % 170 olarak bulunmuştur ($***p < 0.001$) (Şekil 50). CD44 hücre yapışma molekülü yine SOX2'nin transkripsiyonda fazla bağlanma göstermesi PC3 hücrelerinde

proliferasyonu arttırdığı yönündedir.



Şekil 50. pIRF5 ve pSOX2 yapılan örneklerde CD44 bağlanma yüzdesi

SOX2 ve IRF5 etkinliği olan hücrelerin seçimi yöntem kısmında anlatıldığı şekilde gerçekleştirilip ardından CD44 antijeni için CD44-FITC işaretli antikorla işaretlendi. CD44 olan seçilmiş hücrelerden, bu işaretli antikorlar aracılığıyla CD44-FITC ile pKontrol, pIRF ve pSOX2 hücreler seçilerek okundu. Kontrol grubuna kıyasla SOX2'nin proliferasyonundaki artış daha fazla CD44 bağlanması gösterirken, pIRF5 bağlanmasını azalttığı gözlemlenmiştir (Şekil 51)



Şekil 51. pIRF5 ve pSOX2 yapılan örneklerde CD44 bağlanma grafikleri

5. TARTIŞMA

Prostat kanseri, ileri yaşlarda görülmesine rağmen dünyada erkeklerde kansere bağlı ölümlerin ikinci büyük nedeni olarak kabul edilmiştir. Prostat kanserinde rol oynayan birçok mekanizma hala aydınlatılamamış olmakla birlikte yeni sinyal yollarının keşfi ile yeni biyobelirteçlerin belirlenmesinden yeni terapötiklerin geliştirilmesine kadar yapılan çalışmaların sayısı her geçen gün hızla artmaktadır. Prostat kanserinde moleküler ve genetik değişikliklerin kanserin ayırt edici özellikleri olduğu bilinmektedir (Albertson, 2006). Moleküler mekanizmaların ve genetik değişikliklerin tanımlanması, tümör biyolojisini anlamak için gereklidir.

Kök hücreler kendini yenileme, farklılaşma, proliferasyon ve apoptozda önemli bir rol oynamaktadır. Kök hücre faktörleri kanser hücrelerinin farklılaşmasına neden olmakta bazı onkogenlerin, apoptotik proteinlerin ya da tümör baskılayıcı genlerin kontrollerini sağlamaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar kök hücre faktörlerinin ilişkili olduğu sinyal yollarının aydınlatılması gerekliliğini doğurmuş ve yeni gen tedavilerin geliştirilmesi konusunda bu bilgilerin kullanılabileceğini göstermiştir.

Kanser kök hücreler kanserin başlatılmasında, ilerlemesinde ve mevcut tedavilere karşı dirençte önemli bir rol oynayabilir. Kanser kök hücrelerin ayrımlarının yapılmasında çeşitli yüzey antijenleri kullanılmaktadır. Bu yüzey antijenleri kanser hücrelerinde ekspresyon yapmakla birlikte kök hücre potansiyeli ve çeşitli faktörlere bağlı olarak ekspresyon düzeyleri değişmektedir (Sabet ve ark, 2014). CD44 ve CD133 kanser kök hücre yüzey antijenlerinden biri olup çeşitli kanserlerde ekspresyon düzeyleri farklılık göstermekle birlikte western blot, immünofloresans ve flow sitometri gibi teknikler kullanılarak gösterilmektedir (Wang ve ark, 2012). Prostat kanser kök hücrelerine bakıldığı zaman ilk olarak 1989 yılında keşfedilmiştir (Isaacs ve ark, 1989). Prostat dokusunun heterojen bir yapı sergilemesi sebebiyle literatürde androjene bağımlı ve bağımsız bir farklılaşma gösterdiği bildirilmiştir (Tsujimura ve ark, 2002; Skvortsov ve ark, 2018). Prostat kanser kök hücrelerinin kemoterapik ilaçlara ve radyoterapik uygulamalara karşı direnç geliştirme potansiyelinin yüksek olması sebebiyle klinikte önemli bir sorun oluşturmaktadır (Wang ve ark, 2012). Prostat kanser kök hücreleri hem mikro çevreleri hem de çeşitli reseptörleri içermeleri sebebiyle prostat kanser hücrelerinin fenotiplerini de değiştirebilmektedirler (Qin ve ark, 2012). Normal prostat kök hücrelerinin yüzey antijeni olarak Lin-Sca-1, CD133, CD44, CD117 içerdiği ve aldehid dehidrogenaz aktivitesinde

yüksek olduğu bildirilmiştir (Leong ve ark, 2008, Burger ve ark, 2009). Bununla birlikte prostat kanser kök hücrelerinin ise CD133 ve CD44 yüzey antijeninin metastaz görülen biyopsi örneklerinde daha fazla ekspresyonunun olduğu ile ilgili bulgular literatürde yer kazanmıştır (Collins ve ark, 2005). Yapılan bir başka araştırmada 144 prostat kanser hastasının immünohistokimyasal boyama yapılmış dokuları incelendiği zaman gleason skoru düşük hastaların tümör boyutlarının büyük olduğu ve CD44 pozitif ve CD133 pozitif olduğu tespit edilmiştir. PSA düzeylerine bakıldığı zaman CD44 ve CD133 pozitifliği ile ilişkili tam olarak tespit edilememiş ama metastaz ile ilişkisinin olduğu ileri sürülmüştür (Kalantari ve ark, 2017). LNCaP hücreleri kullanılarak CD44 pozitif ve CD24 negatif prostat kanser hücreleri ile NOD / SCID farelerde tümör oluşturulduğunda tümöröjenitenin arttığı tespit edilmiştir. DU145 hücreleri kullanılarak CD44 pozitif ve CD133 pozitif hücrelerde telomeraz aktivitesinin yüksek olduğu ve fenotipik olarak prostat özelliklerinin değiştiğini tespit etmişlerdir (Miki ve ark, 2007). Prostat kanser kök hücrelerinin CD133 ve CD44 ekspresyonlarının yanı sıra Nanog, SOX2 ve OCT4 protein ekspresyonlarında gerçekleştirdikleri ve bu hücrelerin yeni biyomarker geliştirilmesi ve terapötikler için hedef olabileceği bildirilmiştir. PC3 hücrelerinin epitelyal mezankimal geçiş hücreleri olduğu (EMT) ve fenotiplerinin her ne kadar epitel hücrelerine benzese de kök hücre faktörlerini aşırı ifade etmeleri sebebiyle prostat kanser kök hücreleri gibi davrandıkları ileri sürülmüştür (Jiang ve ark, 2010). Ayrıca prostat kanser kök hücrelerinin Wnt sinyal yolağı, Hedgehog sinyal yolağı, Notch sinyal yolağı, NF-kB sinyal yolağı, ABC transporterlar, miRNA' lar ve tümör mikroçevre ile ilişkili olduğu ve kök hücre faktörleri tarafından kontrol edildiği ile ilgili olarak son yıllarda yapılan araştırmaların sayısı da artmaktadır (Leao ve ark, 2017). Bu tez çalışmasında PC3 hücrelerinde SOX2 ekspresyonları arttığı zaman CD44 ve CD133 pozitifliğinin arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca IRF5 ekspresyon düzeyleri PC3 hücrelerinde arttığı zaman CD133 ekspresyon düzeylerinin değişmediği CD44 düzeylerinin kontrol grubuna göre azaldığı görülmektedir. Metastaz yeteneği yüksek olan tümörlerde arttığı bildirilen CD44 düzeylerinin IRF5 ekspresyonu ile prostat kanseri hücrelerinde düşmesi klinikte uygulanacak olan terapiler açısından önem teşkil edecektir. SOX2, bir kök hücre faktörü olarak bilinen bir transkripsiyon faktörü olup prostat kanseri dahil, şimdiye kadar incelenen çoğu insan kanser türünde aşırı ifade edildiği gösterilmiştir (Maurizi ve ark, 2018). SOX2' nin bazı epitelyal kanserlerde onkogen olarak davrandığı bulunmuştur. SOX2, yumurtalık, akciğer, deri, beyin, meme, prostat ve pankreas kanserleri dahil olmak üzere en az 25 farklı kanserdeki büyüme, tümöröjenisite, ilaç direnci ve metastazda rol oynamaktadır (Jeter ve

ark, 2009). Ayrıca SOX2' nin ubiquitinasyon, fosforilasyon ve asetilasyon gibi posttraslasyonel modifikasyonlarda da görev aldığı bildirilmektedir (Baltus ve ark 2009; Van Hoof ve ark, 2009). Prostat kanserinde kök hücre faktörlerinin ekspresyon profillerinin belirlenmesi konusunda yapılan bir araştırmada prostat kanser hasta dokularında Nanog, OCT3/4 ve SOX2 düzeylerinin normal dokulardakine göre ekspresyonlarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. PC3 ve DU145 prostat kanser hücrelerinde OCT3/4 ve SOX2 düzeylerinin hücre proliferasyonunu arttırdığını ve ayrıca immun defekt olan farelerde de SOX2'nin tümörojenezin indüklediği tespit edilmiştir (Bae ve ark, 2010).

Lin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada SOX2 proteininin prostat kanseri hücrelerinin çoğunda eksprese edildiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmada LNCaP androjene bağımlı ve DU145 ile PC3 androjenden bağımsız prostat kanser hücrelerinde SOX2 düzeyleri hem mRNA hem de protein ekspresyonları karşılaştırılmıştır. Araştırmada PC3 hücrelerinin farklı metastatik yeteneğe sahip olan türleri olan PC3M, PC3M- 1E8 ve PC3M- 2B4 hücreleri de kullanılmış SOX2' nin metastaz üzerindeki rolüde araştırılmıştır. SOX2 düzeylerinin hem gen hem de proteinin seviyelerinin, androjenden bağımsız insan prostat kanseri hücrelerinde daha yüksek olduğu ve SOX2' nin metastatik yeteneği yüksek olan androjenden bağımsız prostat kanserinin ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını gösterilmiştir. mRNA ve SOX2 protein seviyeleri, yüksek metastatik insan prostat kanserli hücre soyu DU145, PC-3M-1E8, PC-3, kötü metastatik hücre hattı ile karşılaştırıldığında, önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. SOX2 ekspresyonları shRNA ile susturulduğu zaman androjenden bağımsız kanser hücrelerinin apoptoza gittiği tespit edilmiştir (Lin ve ark, 2012). EGFR ve ilişkili sinyal yolları, çeşitli tümörlerde tümör hücresi proliferasyonunun kilit düzenleyicileridir (Gusterson, 1992). EGFR, prostat kanserinin yaklaşık % 30' unda fazla sentezlenir (Shah ve ark, 2006). EGFR, TGF- α dahil olmak üzere yedi olası ligandan biri ile aktive edilebilir (Harris ve ark, 2003; Seth ve ark, 1999). Önceki çalışmalar, hastalık daha ileri aşamalara geldiğinde, TGF- α ' nın EGFR için baskın ligand olduğunu göstermiştir (Seth ve ark, 1999; DeHaan ve ark, 2009). TGF- α / EGFR otokrin döngüsü, PCa invazyonu ve progresyonu (Mimeault ve ark, 2007) ve EGFR'nin nöral prekürsör hücrelerde SOX2 ekspresyonunu düzenleyebileceğini göstermişlerdir (Hu ve ark, 2010). SOX2'nin TGF α ile indüklendiğini ve hücrelerin EGFR / PI3K / AKT sinyal yolağındaki proteinlerle ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Lin ve ark, 2012). Bu tez çalışmasında benzer bir şekilde PC3 hücrelerinde plazmitler ile SOX2 overekspresyon yapıldığı zaman hücre migrasyonunun arttığı tespit edilmiş ve hücrelerin

metastazik yeteneklerinin SOX2 tarafından kontrol edilebildiği gösterilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda SOX2' nin aşırı ekspresyonunun onkogenik olduğunu gösterilmiş ayrıca akciğer meme ve kanserleri hücre popülasyonunun büyümesini önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (Chen ve ark, 2008). Glioblastoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise SOX2 susturulması, hücre proliferasyonunun inhibe edilmesine ve tümöröjenitenin kaybolmasına neden olduğu da gösterilmiştir (Garros ve ark, 2016). Sağlıklı hücrelerde SOX2 ekspresyonunun düşük olduğu bildirilmekle birlikte T hücrelerinde ifadesinin artırılarak glioblastoma tümörlerinin tedavisinde SOX2' nin hedef alınarak immunoterapide kullanılabileceği de yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Schmitz ve ark, 2007). Osteosarkoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada CRISPR / CAS teknolojisi kullanılarak SOX2 delesyon yapılan hücrelerde canlılığın azaldığı ve proliferasyonun yavaşladığı tespit edilmiştir. Osteosarkoma yapılan fare modelinde SOX2 knockout edildiğinde tümöröjenitenin ve kanser kök hücre fenotipinin baskılandığı aynı çalışmada tespit edilmiştir (Maurizi ve ark, 2018). Klinik araştırmalarda skuamöz akciğer kanser hücreleri ve özofagus kanser türlerinde SOX2 düzeylerinin taranması yapıldığı zaman SOX2 düzeylerinin artışının kanser prognozunda önemli olduğu ve hasta sağ kalımı ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (Wilbertz ve ark, 2011). Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlarda (HNSCC) yapılan bir çalışmada embriyonik protein olan SOX2' nin ekspresyonu belirlenmek üzere HNSCC' li hasta dokuları analiz edilmiştir. Çalışmada SOX2, Bcl-2 Ki-67 ve p16 protein ekspresyonları incelendiği zaman metastaz düzeyi yüksek olan tümör dokularında SOX2 protein ekspresyonunun yüksek olduğu tespit edilmiştir (Schröck ve ark, 2014). Prostat kanseri ve SOX2 konusunda yapılan çalışmalarda insan prostat epitel hücrelerinde embriyonik kök hücre belirteçleri olan Nanog, OCT4 ve SOX2 düzeylerinin yüksek olduğu görülmüştür. Sağlıklı epitel hücrelerinden hTERT kullanılarak prostat kanser kök hücreleri geliştirilmiştir. Araştırmada hem progenitör hücre belirteçleri CD144, CD133 Nestin, C-kit ekspresyonunun hemde OCT4, Nanog, SOX2 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Gu ve ark, 2007). Prostat kanser hücrelerinde SOX2 ve kök hücre gelişiminde temel rol oynayan hedgehog sinyal yolağı arasındaki ilişkinin araştırılması konusunda yapılan bir çalışmada PC3 ve DU145 hücreleri kullanılarak si-RNA ile SOX2'nin susturulması sonucu hücrelerin metastatik davranışında, proliferasyonunda ve migrasyonda azalmanın olduğu tespit edilmiştir. DU145 hücrelerinin, PC3' e kıyasla daha düşük SOX2 geni ve protein ifadesine sahip olduğu bildirilmiştir. SOX2 androjenden bağımsız prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azaltıp kanser dışı kök hücre popülasyonunda apoptozu indüklemiştir.

Hedgehog sinyal yolunun bloke edilmesi ile prostat kanseri hücrelerinin tümörjenitesini büyük ölçüde engellediği göstermişlerdir. Hedgehog sinyal yolağında immunopresipitasyon deneyleri yapılarak bu yolda ilişkili olan GLI1 ve GLI2 transkripsiyon faktörleri ile etkileşimde olduğu ve prostat kanserinde metastazdaki rolünün bununla kontrol edildiği ileri sürülmektedir (Kar ve ark, 2017). Yapılan bu çalışma prostat kanserinde, SOX2' nin tümörojenik özellikler için gerekli olduğunu ve bu transkripsiyon faktörünü hedef almanın uygun bir tedavi seçeneği olduğunu kuvvetli bir şekilde göstermektedir.

İnterferonlar 1970' lerde yapılan araştırmalar sonucunda bu maddelerin sadece viral enfeksiyonu önlemekle kalmayıp, aynı zamanda bazı kanserlerin büyümesini de baskılayabildiği ortaya konulmuştur. Özellikle, tavuk embriolarından korioid parçalarını kullanmış, bunları ısı ile inaktive edilmiş influenza virüsü ile enfekte etmişler ve bu hücrelerin, daha sonra virüs olmayan bir virüs ile enfekte olduğunda aynı tipteki diğer fragmanları koruyabilen bir protein üretebildiğini gözlemlemişlerdir. Bu nedenle, interferon isminin hücreler üzerinde viral bir girişime sahip olma kapasitesinden kaynaklanabilmektedir (Isaacs ve ark, 1957). Yakın zamanda yapılan çalışmalar, virüs enfeksiyonlarında interferonların enfeksiyonlara karşı aktif rol oynadıklarını göstermiştir. Virüsle enfekte olan hücrelerden salınan interferonlar, enfekte olmamış hücrelerin reseptörlerine bağlanarak bu hücreleri uyarır ve virüse karşı direnç oluşumunu sağlamaktadır (Ryff ve ark, 2007). IRF5, otoimmün hastalık dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda yer almak için bir düzenleyici olarak tanımlanmıştır (Richez ve ark, 2010). Önceki çalışmalar, p53 aracılı apoptozda IRF5' in rolünü öne sürmüştür (Mori ve ark, 2002). Bazı çalışmalar da IRF5' in p53' ten farklı bir yol üzerinde hareket ettiğini ortaya koymuştur (Barnes ve ark, 2003; Hu ve ark, 2005; Yanai ve ark, 2007). Lin Guo ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise IRF5' in kondrositler üzerindeki fizyolojik rolü ve osteoartrit (OA) veya romatoartrit (RA) patolojik gelişimi daha önce bildirilmiştir. Kondrositler multifaktöriyel bir hastalık olan osteoartritin patolojik gelişiminde rol oynamaktadırlar (Komori ve ark, 2016). MMP' ler en önemli katabolik faktörlerdir. IRF5 insan kondrositleri ve insan kondrosarkom hücre çizgisi SW1353 hücrelerinde eksprese edilirler (Van Hove ve ark, 2012). IRF5, promotörünü hedefleyerek MMP-3' ün transkripsiyonunu düzenler (Sugiyama ve ark, 2007) IRF5 'in MMP-3 ekspresyonuna etkileri NFkB' nin aracılık eder. IRF5, otoimmün hastalık dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda yer almak için bir düzenleyici olarak tanımlanmıştır. IRF5' in kondrositler üzerindeki fizyolojik rolü ve OA veya RA' nın patolojik gelişimi daha önceki çalışmalarda

da bildirilmiştir. Bu çalışmada, IRF5' in, MMP-3' ün promotör bölgesine bağlanarak transkripsiyonunu düzenlediği bulunmuştur. MMP-3' ün OA ve RA' nın patogenezindeki önemli rolleri göz önüne alındığında, elde edilen sonuçlar IRF5 'in OA ve RA' da rol oynayabileceğini açıklamaktadır. IRF5' in susturulmasının, NFkB lusiferaz aktivitesinde TNF- α artışı artırdığını bulmuşlardır. NFkB, normal fizyolojik koşullar altında sitoplazmada tecrit edilen önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Hücrelerin TNF-a gibi enflamatuvar sitokinlere maruz kalması, NF-kB' nin sitoplazmadan nükleer translokasyonunu sağlayan ve gen transkripsiyonunu başlatan fosforilasyona neden olur. Özetle, IRF5' in insan kondrositlerinde promotörüne bilerek MMP-3' ün transkripsiyonunu düzenlediğini bulmuşlardır. Bu çalışma sonucundaki bulgular IRF5' in OA ve RA tedavisi için yeni bir farmakolojik hedef olabileceğini göstermektedir. IFNa ekspresyonunun sürülmesine ek olarak, IRF5, OA ve RA'nın patolojik gelişiminde rol oynayan IL-6, TNF-a ve IL-17 ekspresyonunu yukarı regüle eder (Krausgruber ve ark, 2011). Hücrelerin TNF-a gibi enflamatuvar sitokinlere maruz kalması, NFkB' nin sitoplazmadan nükleer translokasyonunu sağlayan ve gen transkripsiyonunu başlatan fosforilasyona ve I κ Ba'nın bozunmasına neden olur. NFkB ve IRF5 aktivasyonunun, bu genlerin promotör bölgesine yakın bir yerde bağlanarak IFN- β ve IL-6' nın ekspresyonunu koordine olarak düzenlediği bildirilmiştir. Lin Guo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar sonucunda MMP3' ün ekspresyonunu düzenleyen NFkB ve IRF5 arasında yeni bir sinyal bağlantısı olduğunu bulunmuştur. IRF5 bir transkripsiyon faktörü olmasının yanı sıra son yıllarda tümör süpressör rolünün olduğu ile ilgili çalışmalarda hızla artmaktadır. Tümör baskılayıcı özelliğini p21, Bak, Bax, ve kaspaz8' i indüklemesi ile gerçekleştirdiği ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Mori ve ark, 2002; Barnes ve ark, 2004). IRF5' in tip1 interferonları kontrol ettiği bilinmektedir. IRF5 ve SOX2 konusunda literatürde yapılmış bir araştırma bulunmamaktadır. İnterferonlar ve SOX2 arasındaki ilişki konusunda yapılan çalışmalara bakıldığında zaman IRF7' nin kök hücre faktörlerinin düzenlenmesinde rol oynadığı ve antiviral cevapta önemli olduğu gösterilmektedir (Eggenberger ve ark, 2019). Ayrıca yapılan bir başka çalışmada ise akciğer kanser hücrelerinde IFN alfa ve IFN gama ekspresyonunu değiştiren inteferon indükleyici trans membran proteininin SOX2 tarafından baskılandığı ve kötü prognoza sebep olduğu bildirilmiştir (Yang ve ark, 2019).

Biz çalışmamızda PC3 prostat kanser hücrelerinde SOX2 over ekspresyon yapılan örneklerde migrasyon düzeylerinin arttığını saptadık. Kontrol gruplarına göre daha hızlı bölünen, hızlı yayılan ve hücrelerdeki morfolojik değişikliklerde SOX2 protein ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin hücrenin büyüme eğilimini artırdığını bulduk. Prostat

kanserinde SOX2' nin CD44 ve CD133 ile ekspresyonlarının birlikte artışı IRF5 over ekspresyonu yapıldığı zaman azalmış ve hücrelerin prolirerasyonları azalarak migrasyon yeteneklerinin düştüğü bu tez çalışmasında gösterilmiştir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu tez çalışmasında androjenden bağımsız prostat kanser hücrelerinde bir kök hücre faktörü SOX2 proteininin aşırı ifade edilmesi hücrelerde bir transkripsiyon faktörü olan IRF5 proteini ile etkileşim yaptığı immunopresipitasyon deneyleri ile tespit edilmiştir. IRF5 overekspresyon yapılan örneklerde kök hücre farklılaşmasının bir belirteci olan CD133 ve CD44 yüzey antijenlerinin ekspresyonunda azalmaya neden olmuştur. Prostat kanserinde IRF5 proteininin SOX2 proteininin ekspresyonu üzerinde değişiklik yapıp yapmadığı konusunda daha ileri analizlere gereksinim duyulmaktadır. Kanser kök hücrelerin farklılaşmasında ve kanser hücrelerinin metastazındaki rolleri sebebiyle SOX2 proteininin kontrol edilmesi konusunda IRF5 yeni bir terapötik aday olabilir ve sinyal yollarının aydınlatılması ile klinik uygulamalar için yeni gen terapilerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

KAYNAKLAR

Aasen T, Belmonte JCI. Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nature Protocols* 2010, 5(2), 371-382.

Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes development* 2000, 14(19), 2410-2434.

Abby S, Konrad H. The Sox Family of Transcription Factors: Versatile Regulators of Stem and Progenitor Cell Fat. *Cell Stem Cell* 2013, 12(1), 15-30.

Adachi K, Suemori H, Yasuda Sh, Nakatsuji N, Kawase E. Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes to Cells* 2010, 15(5), 455-469.

Addo BK, Wang S, Chung W. Identification of differentially methylated genes in normal prostate tissues from african american and caucasian men. *Clinical Cancer Research* 2010, 16, 3539-3547.

Akar AR, Arat M, Beksac M, Can A, Camurdanoğlu BZ, Cetinkaya DU, et al. *Türkiye Bilimler Akademisi Raporları* 2009, 20, Ankara, 113s.

Akaza H, Kanetake H, Tsukamoto T. Efficacy and safety of dutasteride on PCa risk reduction in asian men. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2011, 41(3), 417-423.

Albertson DG. Gene amplification in cancer. *Trends Genetics* 2006, 22, 447-455.

Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004, 23(43), 7274-82.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, 100(7), 3983-3988.

Almeida GM de Oliveira DB, Magalhaes CL, Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG. Antiviral activity of type I interferons and interleukins 29 and 28a (type III interferons) against Apeu virüs. *Antiviral Research* 2008, 80, 302-308.

Ank N, West H, Bartholdy C, Eriksson K. Lambda Interferon (IFN- λ), a Type III IFN, Is Induced by Viruses and IFNs and Displays Potent Antiviral Activity against Select Virus Infections In Vivo. *Journal of Virology* 2006, 80(9), 4501-4509.

Arab L, Su J, Steck SE. Adherence to world cancer research fund American Institute for Cancer Research Lifestyle Recommendations Reduces Prostate Cancer Aggressiveness Among African and Caucasian Americans. *Nutrition and Cancer* 2013, 65(5), 633-643.

Avilion A, Nicolis SK, Pevny LH. Multipotent cell lineages in early Mouse development depend on SOX2 function. *Genes Development* 2003, 17(1), 126-140.

Babu MM, Luscombe NM, Aravind L, Gerstein M, Teichmann SA. Structure and evolution of transcriptional regulatory networks. *Currient Opinion in Structural Biology* 2004, 14(3), 283-291.

Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN γ receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annual Review of Immunology* 1997, 15, 563-591.

Bae KM, Su Z, Frye C, McClellan S, Allan RW, Andrejewski JT, et al. Expression of pluripotent stem cell reprogramming factors by prostate tumor initiating cells. *Journal of Urology* 2010, 183, 2045-2053.

Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *Journal of Clinical Oncology* 2003, 21(2), 383-391.

Baltus GA, Kowalski MP, Zhai H, Tutter AV, Quinn D, Wall D, Kadam S. Acetylation of sox2 induces its nuclear export in embryonic stem cells. *Stem Cells* 2009, 27(9), 2175-84.

Ban T, Sato GR, Nishiyama A, Akiyama A, Takasuna M, Umehara M, et al. Lyn kinase suppresses the transcriptional activity of IRF5 in the TLR-MyD88 pathway to restrain the development of autoimmunity. *Immunity* 2016, 45(2), 319-32.

Barnes BJ, Kellum MJ, Field AE, Pitha PM. Multiple regulatory domains of IRF-5 control activation, cellular localization, and induction of chemokines that mediate recruitment of T lymphocytes. *Molecular and Cellular Biology* 2002, 22(16), 5721-5740.

Barnes BJ, Kellum MJ, Pinder KE, Frisancho JA, Pitha PM. Interferon regulatory factor 5, a novel mediator of cell cycle arrest and cell death. *Cancer Research* 2003, 63(19), 6424-6431.

Barnes BJ, Richards J, Mancl M, Hanash S, Beretta L, Pitha PM. Global and distinct targets of IRF-5 and IRF-7 during innate response to viral infection. *Journal of Biological Chemistry* 2004, 279, 45194-207.

Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal Stem Cells: Clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology* 2004, 36(4), 568-584.

Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH, Yu S, Perner S, Verhaak RG, et al. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nature Genetics* 2009, 41(11), 1238-1242.

Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsiu TW, Fisher LW, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *Journal of Dental Research* 2003, 82(12), 976-981.

Bernard D, Pourtier-Manzanedo A, Gil J, Beach DH. Myc confers androgen-independent prostate cancer cell growth. *Journal of Clinical Investigation* 2003, 112(11), 1724-1731.

Berns A. Is p53 the only real tumour suppressor gene. *Current Biology* 1994, 4(2), 137-139.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine* 1997, 3(7), 730-737.

Bourne HR, Varmus HE. Oncogenes and cell proliferation. *Current Opinion in Genetics Development* 1992, 2(1), 103-162.

Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Developmental Biology* 2000, 227(2), 239-255.

Bowman T, Garcia R, Turkson J. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000, 19(21), 2474-2488.

Brink TC, Sudheer S, Janke D, Jagodzinska J, Jung M, Adjaye J. The Origins of Human Embryonic Stem Cells: A Biological Conundrum. *Cells Tissues Organs* 2008, 188(1-2), 9-22.

Brivanlou AH, Darnell JE. Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 2002, 295(5556), 813-818.

Brodin G, Dijke P, Funa K, Heldin CH, Landström M. Increased smad expression and activation are associated with apoptosis in normal and malignant prostate after castration. *Cancer Research* 1999, 59, 2731-2738.

Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Lopes SM, et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 2007, 448(7150), 191-195.

Buecker C, Srinivasan R, Wu Z, Calo E, Acampora D, Faial T, et al. Reorganization of enhancer patterns in transition from naive to primed pluripotency. *Cell Stem Cell* 2014, 14(6), 838-853.

Burger PE, Gupta R, Xiong X, Ontiveros CS, Salm SN, Moscatelli D, et al. High aldehyde dehydrogenase activity: a novel functional marker of murine prostate stem/progenitor cells. *Stem Cells* 2009, 27(9), 2220-2228.

Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996, 380(6569), 64-66.

Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3 - kinase /AKT pathway. *Proceedings of the National Academy of Science* 1999, 96(8), 4240-4245.

Cavaleri F, Schöler H. Molecular Bases of Pluripotency essentials of Stem Cell Biology. *Academic Press Books* 2009, 39-60.

Cevik O, Li D, Baljinnyam E, Manvar D, Pimenta EM, Waris G, et al. Interferon regulatory factor 5 (IRF5) suppresses hepatitis C virus (HCV) replication and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *The Journal of Biological Chemistry* 2017, 292, 21676-21689. doi: 10.1074 /jbc.M117.792721

Chang CS, Kokontis J, Liao ST. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* 1988, 240(4850), 324-326.

Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2004, 5(5), 392-401.

Chen Y, Shi L, Zhang L, Li R, Liang J, Yu W, et al. The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *Journal of Biological Chemistry* 2008, 283(26), 17969-17978.

Chen YW, Chen KH, Huang PI, Chen YC, Chiou GY, Lo WL. Cucurbitacin I suppressed stem-like property and enhanced radiation-induced apoptosis in head and neck squamous carcinoma derived CD44(+)ALDH1(+) cells. *Molecular Cancer Therapeutic* 2010, 9(11), 2879-2892.

Cherrie D. Thompson, Bharati Matta, Barnes BJ. Therapeutic Targeting of IRFs: Pathway Dependence or Structure Based. *Frontiers in Immunology* 2018, 9, 2622.

Ciesielski CJ, Andreaskos E, Foxwell BM, Feldmann M. TNFalpha-induced macrophage chemokine secretion is more dependent on NF-kappaB expression than lipopolysaccharides-induced macrophage chemokine secretion. *European Journal of Immunology* 2002, 32(7), 2037-2045.

Clay MR, Tabor M, Owen JH, Carey TE, Bradford CR, Wolf GT. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Nec* 2010, 32(9), 1195-1201.

Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Research* 2005, 65(23), 10946-10951.

Collins AT, Habib FK, Maitland NJ, Neal DE. Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha (2) beta (1)-integrin expression. *Journal of Cell Science* 2001, 114, 3865-3872.

Constanze K, Dorothee S, Patrick B, Edda T. The role of purinergic receptors in stem cell differentiation. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 2015, 13, 75-84.

Culig Z, Hoffmann J, Erdel M, Eder IE, Hobisch A, Hittmair A, et al. Switch from antagonist to agonist of the androgen receptor bicalutamide is associated with prostate tumour progression in a new model system. *British Journal of Cancer* 1999, 81, 242-251.

Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007, 104(24), 10158-10163.

Dang CV. MYC on the path to cancer. *Cell* 2012, 149, 22-35

Darson MF, Pacelli A, Roche P, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Young CY, et al. Human glandular kallikrein 2 (hK2) expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a novel prostate cancer marker. *Urology* 1997, 49, 857-862.

DeAndrea M, Ravera R, Gioia D, Gariglio M, Landolfo S. The Interferon System: an overview. *European Journal of Paediatric Neurology* 2002, 6.

DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances* 2016, 2(5), e1600200.

DeHaan AM, Wolters NM, Keller ET, Ignatoski KM. EGFR ligand switch in late stage prostate cancer contributes to changes in cell signaling and bone remodeling. *Prostate* 2009, 69, 528-537.

Devesa SS, Bray F, Vizcaino AP D, Parkin DM. International lung cancer trends by histologic type: male: female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *International Journal of Cancer* 2005, 117, 294-299.

Diamandis EP, Yu H. Nonprostatic sources of prostatespecific antigen. *Urologic Clinics of North America* 1997, 24, 275-282.

Edmondson DG, Olson EN. Helix-Loop-Helix Proteins as Regulators of Muscle-specific Transcription. *The Journal of Biological Chemistry* 1993, 268(2), 755-758.

Eggenberger J, Blanco-Melo D, Panis M, Brennand KJ, tenOever BR. Type I interferon response impairs differentiation potential of pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2019, 116(4), 1384-1393.

Ekmekçi A. Tıbbi Biyoloji ve Genetik, Ankara, 2018.

Erden S. Kök hücreler ve klinikte Kullanımları. *Journal of New Results in Engineering and Nature Science* 2014, 3, 1-8.

Fantes J, Ragge NK, Lynch SA. Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nature Genetics* 2003, 33(4), 461-463.

Fenouil R, Cauchy P, Koch F, Descostes N, Cabeza JZ, Innocenti C, et al. CpG islands and GC content dictate nucleosome depletion in a transcription-independent manner at mammalian promoters. *Genome Research* 2012, 22(12), 2399-2408.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in globocan. *International Journal of Cancer* 2015, 136(5), 359-386.

Fraisse EE, Su Z. Cabazitaxel-a next-generation taxane for the treatment of patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2014, 41(7), 817-822.

Gao L, Schwartzman J, Angela G, Lisac R, Kleinschmidt R, Wilmot B, et al. Androgen Receptor Promotes Ligand-Independent Prostate Cancer Progression through c-Myc Upregulation. *Plos One* 2013, 8(5), e63563.

Garros RL, Garcia I, Carrasco-Garcia E, Lantero A, Paula Aldaz, Moreno-Cugnon L, et al. Targeting SOX2 as a Therapeutic Strategy in Glioblastoma. *Frontiers Oncology* 2016, 6, 222.

Gennigens C, Caux CM, Droz JP. Insulin-like growth factor (IGF) family and prostate cancer. *Critical Reviews Oncology Hematology* 2006, 58, 124-145.

Gimble JM, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: Isolation, characterization and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003, 5(5), 362-369.

Greber B, Wu G, Bernemann C, Joo JY, Han DW, Ko K, et al. Conserved and divergent roles of FGF signaling in mouse epiblast stem cells and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2010, 6, 215-226.

Grzybowska EA. Human intronless genes: functional groups, associated diseases, evolution, and mRNA processing in absence of splicing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012, 424(1), 1-6.

Gu G, Yuan J, Wills M, Kasper S. Prostate cancer cells with stem cell characteristics reconstitute the original human tumor in vivo. *Cancer Research* 2007, 67, 4807-15.

Guo G, Smith A. A genome-wide screen in EpiSCs identifies Nr5a nuclear receptors as potent inducers of ground state pluripotency. *Development* 2010, 137, 3185-3192.

Gurdon JB, Elsdale TR, Fischberg M. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 1958, 182, 64-65.

Gusterson BA. Identification and interpretation of epidermal growth factor and c-erbB-2 overexpression. *European Journal of Cancer* 1992, 28, 263–267.

Han X, Fang X, Lou X, Hua D, Ding W, Foltz G, et al. Silencing SOX2 induced mesenchymal-epithelial transition and its expression predicts liver and lymph node metastasis of CRC patients. *Plos One* 2012, 7(8), e41335.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2000, 144(5), 646-674.

Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. *Experimental Cell Research* 2003, 284, 2–13.

Hayward SW, Rosen MA, Cunha GR. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *British Journal of Urology* 1997, 79, 18-26.

Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: An overview. *Endocrin Reviews* 2002, 23, 175-200.

Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrin Reviews* 2004, 25(2), 276-308.

Hellerstedt BA, Pienta KJ. The current state of hormonal therapy for prostate cancer. *CA Cancer Journal for Clinicians* 2002, 52(3), 154-179.

Higgs R, Jefferies CA. Targeting IRFs by ubiquitination: regulating antiviral responses, Molecular and Cellular Therapeutics and RSCI Research Institute. *Biochemical Society Transactions* 2008, 36, 453-458

Hori S, Butter E, McLoughlin J. Prostate cancer and diet: food for thought. *BJU International* 2011, 107, 1348-1359.

Hu G, Mancl ME, Barnes BJ. Signaling through IFN regulatory factor-5 sensitizes p53-deficient tumors to DNA damage-induced apoptosis and cell death. *Cancer Research* 2005, 65, 7403-7412.

Hu Q, Zhang L, Wen J, Wang S, Li M, Feng R, et al. The EGF receptor-sox2-EGF receptor feedback loop positively regulates the self-renewal of neural precursor cells. *Stem Cells* 2010, 28(2), 279-286.

Huang Y, Osorno R, Tsakiridis A, Wilson V. In vivo differentiation potential of epiblast stem cells revealed by chimeric embryo formation. *Cell Reports* 2012, 2, 1571-1578.

Imanishi J. Basis and Clinical Applications of Interferon. *JMAJ* 2004, 47(1), 7-12.

Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society* 1957, 147, 258-267.

Isaacs JT, Coffey DS. Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Supplements* 1989, 33-50.

Izaguirre A, Barnes BJ, Amrute S, Yeow WS, Megjugorac N, Dai J, et al. Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology* 2003, 74, 1125-1138.

Janeway CA. Approaching the asymptote Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1989, 54, 1-13.

Jayadevappa R, Chhatre S, Johnson JC, Malkowicz SB. Association between ethnicity and prostate cancer outcomes across hospital and surgeon volume groups. *Health Policy* 2011, 99, 97-106.

Jeong JH, Wang Z, Guimaraes AS, Ouyang X, Figueiredo JL, Ding Z, et al. BRAF activation initiates but does not maintain invasive prostate adenocarcinoma. *Plos one* 2008, 3, 3949.

Jeter CR, Badeaux M, Choy G, Chandra D, Patrawala L, Liu C, et al. Functional evidence that the self-renewal gene Nanog regulates human tumor development. *Stem Cells* 2009, 27, 993-1005.

Jiang M, Strand DW, Fernandez S. Functional remodeling of benign human prostatic tissues in vivo by spontaneously immortalized progenitor and intermediate cells. *Stem Cells* 2010, 28, 344-356.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2012, 418, 41-49.

Jonasch E, Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *The Oncologist* 2001, 6, 34-55.

Kaaks R, Stattin P. Obesity, endogenous hormone metabolism, and prostate cancer risk: a conundrum of highs and lows. *Cancer Prevention Research* 2010, 3, 259-262.

Kalantari E, Asgari M, Nikpanah S, Salarieh N, Asadi Lari MH, Madjd Z. Co-Expression of Putative Cancer Stem Cell Markers CD44 and CD133 in Prostate Carcinomas. *Pathology Oncology Research* 2017, 23(4), 793-802.

Kamachi Y, Kondoh H. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development* 2013, 140, 4129-4144.

Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H. SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends in Genetics* 2000, 16(4), 182-187.

Kansu E. Kök Hücre Biyolojisi ve Plastisitesinde Güncel Kavramlar. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2005, 36, 191-197.

Kar S, Sengupta D, Deb M, Pradhan N, Patra SK. SOX2 function and Hedgehog signaling pathway are co-conspirators in promoting androgen independent prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease* 2017, 1863(1), 253-265.

Karin M. Too many transcription factors: positive and negative interactions. *Nature New Biology* 1990, 2(2), 126-131.

Kasper S. Exploring the origins of the normal prostate and prostate cancer stem cell. *Stem Cell Review* 2008, 4, 193-201.

Keramari M, Razavi J, Ingman KA. Sox2 is essential for formation of trophectoderm in the preimplantation embryo. *Plos one* 2010, 5, e13952.

Kokontis J, Takakura K, Hay N, Liao S. Increased androgen receptor activity and altered c-myc expression in prostate cancer cells after long-term androgen deprivation. *Cancer Research* 1994, 54, 1566-1573.

Kopp JL, Ormsbee BD, Desler M, Rizzino A. Small increases in the level of sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Express* 2008, 26(4), 903-911 0951.

Krausgruber T, Blazek K, Smallie T. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nature Immunology* 2011, 12 (3), 231-238.

Krongrad A, Wilson CM, Wilson JD, Allman DR, McPhaul MJ. Androgen increases androgen receptor protein while decreasing receptor mRNA in LNCaP cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1991, 76, 79-88.

Kuijk EW, Chuva S, Lopes SM, Geijsen N. The different shades of mammalian pluripotent stem cells. *Human Reproduction Update* 2011, 17, 254-271.

Kumagai J, Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Ogushi T, Horie Inoue K, et al. Cytochrome P450 2B6 is a growth inhibitory and prognostic factor for prostate cancer. *Prostate* 2007, 67(10), 1029-1037.

Kumar A, Mikolajczyk SD, Goel AS, Millar LS, Saedi MS. Expression of pro form of prostate specific antigen by malignant cells and its conversion to mature, active form by human kallikrein 2. *Cancer Research* 1997, 57, 3111-3114.

Lanza R, Klimanskaya I. Essential Stem Cell Methods. *Academic Press Elsevier* 2009, USA, 608.

Latchman David S. Transcription factors: an overview. *International Journal Biochemistry Cell Biology* 1997, 29(12), 1305-1312.

Leao R, Domingos C, Figueiredo A, Hamilton R, Tabori U, Castelo-Branco P. Cancer Stem Cells in Prostate Cancer: Implications for Targeted Therapy. *Urologia Internationalis* 2017, 99, 125-136.

Leong KG, Wang BE, Johnson L, Gao WQ. Generation of a prostate from a single adult stem cell. *Nature* 2008, 456(7223), 804-808.

Levitt RJ, Zhao Y, Blouin MJ, Pollak M. The hedgehog pathway inhibitor cyclopamine increases levels of p27, and decreases both expression of IGF-II and activation of Akt in PC-3 prostate cancer cells. *Cancer Letters* 2007, 255, 300-306.

Li L, Yu H, Schumacher F, Casey G, Witte JS. Relation of serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding protein-3 to risk of prostate cancer. *Cancer Causes Control* 2008, 14(8), 721-726.

Lin F, Lin P, Zhao D, Chen Y, Xiao L, Qin W, et al. Sox2 targets cyclin E, p27 and survivin to regulate androgen-independent human prostate cancer cell proliferation and apoptosis. *Cell Proliferation* 2012, 45, 207-216.

Lin R, Mamane Y, Hiscott J. Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains. *Molecular and Cellular Biology* 1999, 19, 2465-2474.

Litvinov IV, De Marzo AM, Isaacs JT. Is the Achilles' heel for prostate cancer therapy a gain of function in androgen receptor signaling. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 2003, 88(7), 2972-2982.

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger CA, Scott MP, et al. *Molecular Cell Biology* 2004, W. H. Freeman and Company, New York, 1050p.

Lophatananon A, Archer J, Easton D. Dietary fat and early-onset prostate cancer risk. *British Journal of Nutrition* 2010, 103, 1375-1380.

Lowther WJ, Moore PA, Carter KC, Pitha PM. Cloning and functional analysis of the human IRF-3 promoter. *Journal of DNA and Cell Biology* 1999, 18, 685-692.

Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: Meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annual Review Cell and Developmental Biology* 2011, 27, 441-464.

Mancl ME, Hu G, Pitha PM. Two discrete promoters regulate the alternatively spliced human interferon regulatory factor-5 isoforms. Multiple isoforms with distinct cell type-specific expression, localization, regulation, and function. *The Journal of Biological Chemistry* 2005, 280(22), 21078-21090.

Marte B. Tumour heterogeneity. *Nature* 2013, 501, 327.

Maruyama M, Ichisaka T, Nakagawa M, Yamanaka S. Differential roles for Sox15 and Sox2 in transcriptional control in mouse embryonic stem cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2005, 280, 24371-24379.

Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biology* 2007, 9, 625-635.

Matsuoka J, Yashiro M, Sakurai K. Role of the stemness factors sox2, oct3/4, and nanog in gastric carcinoma. *Journal of Surgical Research* 2012, 174(1), 130-135.

Matta B, Song S, Li D, Barnes BJ. Interferon regulator factor signaling in autoimmune disease. *Cytokine* 2017, 98,15-26.

Maurizi G, Verma N, Gadi A, Mansukhani A, Basilico C. Sox2 is required for tumor development and cancer cell proliferation in osteosarcoma. *Oncogene* 2018, 37(33), 4626-4632.

Miki J, Furusato B, Li H, Gu Y, Takahashi H, Egawa S, et al. Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. *Cancer Research* 2007, 67(7), 3153-3161.

Mikolajczyk SD, Marker KM, Millar LS. A truncated precursor form of prostate-specific antigen is a more specific serum marker of prostate cancer. *Cancer Research* 2001, 61, 6958-6963.

Mimeault M, Venkatraman G, Johansson SL, Moore E, Henichart JP, Depreux P, et al. Novel combination therapy against metastatic and androgen-independent prostate cancer by using gefitinib, tamoxifen and etoposide. *International Journal of Cancer* 2007, 120(1), 160-169.

Mitsui K, Takuzawa Y, Itoh H. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003, 113, 631-642.

Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y, Maruyama M, Harada H, Sudo Y, et al. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell* 1988, 54, 903-913.

Mori T, Anazawa Y, Iizumi M, Fukuda S, Nakamura Y, Arakawa H. Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. *Oncogene* 2002, 21(18), 2914-2918.

Murphy DJ, Junttila MR, Pouyet L, Karnezis A, Shchors K, Bui DA, et al. Distinct thresholds govern Myc's biological output in vivo. *Cancer Cell* 2008, 14(6), 447-457.

Naor D, Nedvetzki S, Golan I. CD44 in cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2002, 39, 527-579.

Naor D, Wallach-Dayana SB, Zahalka MA. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Seminars in Cancer Biology* 2008, 18, 260-267.

Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 2009, 4, 487-492.

Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998, 95, 379-391.

Nikolov DB, Burley SK. RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997, 94(1), 15-22.

Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct 3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cell. *Nature Genetics* 2000, 24, 372-376.

- Noto Z, Yoshida D, Okabe M, Koike C, Fathy M, Tsuno H, et al.** CD44 and SSEA-4 positive cells in a oral cancer cell line. *Oral oncology* 2013, 49(8), 787-795.
- O'Dea E, Hoffmann A.** The regulatory logic of the NF-kappaB signaling system. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2010, 2(1), p. a000216.
- Okumura NN, Saito M, Niwa H, Ishikawa F.** OCT-3/4 and SOX2 Regulate OCT-3/4 Gene in Embryonic Stem Cells. *The Journal Of Biological Chemistry* 2005, 280, 5307-5317.
- Pakula H, Xiang D, Li Z.** Tale of Two Signals: AR and WNT in Development and Tumorigenesis of Prostate and Mammary Gland. *Cancer* 2017, 9, 14.
- Papaccio F, Paino F, Regad T, Papaccio G, Desiderio V, Tirino V.** Concise Review: Cancer Cells, Cancer stem Cells and Mesenchymal Stem Cells: Influence in Cancer Development. *Stem Cells Translational Medicine*. 2017, 6, 2115-2125.
- Parisi S, Passaro F, Aloia L.** Klf5 is involved in self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Journal of Cell Science* 2008, 121, 2629-2634.
- Parkin DM, Bray F, Devesa SS.** Cancer burden in the year 2000. The global picture. *European Journal of Cancer* 2001, 37(8), 4-66.
- Pestka S, Krause CD, Walter MR.** Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews* 2004, 202, 8-32.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al.** Multilineage potential of adult mesenchymal stem cells. *Science* 1999, 284, 143-147
- Platanias LC.** Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology* 2005, 5, 375-386
- Qin J, Liu X, Laffin B.** The PSA prostate cancer cell population harbors self renewing long term tumor propagating cells that resist castration. *Cell Stem Cell* 2012, 10, 556-569.
- Rabbitts TH.** Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994, 372, 143-149.

Raimondi S, Mabrouk JB, Shatenstein B, Maisonneuve P, Ghadarian P. Diet and prostate cancer risk specific focus on dairyproducts and dietary calcium a case control study. *Prostate* 2010, 70, 1054-1065.

Ramirez-Carrozzi VR, Braas D, Bhatt DM, Cheng CS, Hong C, Doty KR, et al. A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling. *Cell* 2009, 138(1), 114-128.

Ramji DP, Vitelli A, Tronche F, Cortese R, Ciliberto G. The two C/EBP isoforms, IL-6DBP/ NF-IL6 and C/EBP/NF-IL6B are induced by IL-6 to promote acute phase gene transcription via different mechanisms. *Nucleic Acids Research* 1993, 21(2), 289-294.

Reményi A, Lins K, Nissen LJ, Reinbold R, Schöler HR, Wilmanns M. Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes Development* 2003, 15, 17(16), 2048-2059.

Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnology* 2000, 18, 399-404.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weismann IL. Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature* 2001, 414(6859), 105-111.

Richez C, Barnetche T, Miceli-Richard C, Blanco P, Moreau JF, Rifkin I, et al. Role for interferon regulatory factors in autoimmunity. *Joint Bone Spine* 2010, 77(6), 525-531.

Rizos CH, Papassava M, Golias CH, Charalabopoulos K. Alcohol consumption and prostate cancer a mini review. *Experimental Oncology* 2010, 32(2), 66-70.

Roeder RG. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochemical Sciences* 1996, 21(9), 327-335.

Rohrmann S, Linseisen J, Key TJ. Alcohol consumption and the risk for prostate cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention* 2008, 17(5), 1282-1287.

Rossant J, Tam PP. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the Mouse. *Development* 2009, 136(5), 701-713.

Ryff JC, Bordens RW, Pestka S. Interferons and Interleukins Book, Third Edition, Chapter 11. *Pharmaceutical Biotechnology* 2007.

Sabet MN, Rakhshan A, Erfani E, Madjd Z. Co-expression of putative cancer stem cell markers, CD133 and Nestin, in skin tumors. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2014, 15(19), 8161-8169.

Saccani S, Pantano S, Natoli G. Two waves of nuclear factor kappaB recruitment to target promoters. *The Journal of Experimental Medicine* 2001, 193, 1351-1359.

Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji, (Çev. A. C. Başaklar), *Palme Yayınları* 2005, 303, Ankara, 507s.

Sağsöz H, Ketani A. Kök hücreler. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2008, 1 (2), 29-33.

Sato M, Taniguchi T, Tanaka N. The interferon system and interferon regulatory factor transcription factors – studies from gene knockout mice. *Cytokine Growth Factor Reviews* 2001, 12(2-3), 133-142.

Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, 103(5), 1412-1417.

Schepers GE, Teasdale RD, Koopman P. Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human SOX transcription factor gene families. *Developmental Cell* 2002, 3(2), 167-170.

Schindler C, Darnell JE. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the Jak- Stat pathway. *Annual Review of Biochemistry* 1995, 64, 621-651.

Schmitz M, Temme A, Senner V, Ebner R, Schwind S, Stevanovic S, et al. Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy. *British Journal of Cancer* 2007, 96(8), 1293-301.

Schnitzler CE, Simmons DK, Pang K, Martindale MQ, Baxeavanis AD. Expression of multiple Sox genes through embryonic development in the ctenophore Mnemiopsis leidyi is spatially restricted to zones of cell proliferation. *Evodevo* 2014, 5(1), 15.

Schröck A, Bode M, Göke FJ, Bareiss PM, Schairer R, Wang H, et al. Expression and role of the embryonic protein SOX2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2014, (7) , 1636-1642.

Seth D, Shaw K, Jazayeri J, Leedman PJ. Complex posttranscriptional regulation of EGF-receptor expression by EGF and TGF- α in human prostate cancer cells. *British Journal Cancer* 1999, 80(5-6), 657-669.

Shah RB, Ghosh D, Elder JT. Epidermal growth factor receptor (ErbB1) expression in prostate cancer progression: correlation with androgen independence. *Prostate* 2006, 15, 66(13), 1437-1444.

Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Development* 2010, 15, 24(18), 1967-2000.

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990, 19, 346(6281), 240-244.

Skvortsov S, Skvortsova II, Tang DG, Dubrovskaya A. Concise Review: Prostate Cancer Stem Cells: Current Understanding. *Stem Cells* 2018, 36(10), 1457-1474.

Sokoll LJ, Chan DW. Prostate-specific antigen. Its discovery and biochemical characteristics. *Urologic Clinics of North America* 1997, 24, 253-259.

Spillane JB, Henderson, MA. Cancer stem cells: a review. *ANZ Journal of Surgery* 2007, 77, 464-468.

Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *New England Journal of Medicine* 1987, 317, 909-916.

Stanton GJ, Weige DA. Interferon review. *Invest radiology* 1987, 22, 259-273.

Steven S. Doerstling, Ciara H. O'Flanagan, Stephen D. Hursting. Obesity and Cancer Metabolism: A Perspective on interacting Tumor–intrinsic and extrinsic Factors. *Oncology* 2017, 7, 216.

Stolt C, Wegner M. SoxE function in vertebrate nervous system development. *The International of Biochemistry Cell Biology* 2010, 42(3), 437-440.

Strand DW, Hayward SW. Modeling stromal-epithelial interactions in disease progression. *Discovery Medicine* 2010, 9, 504-511.

Sugimura Y, Cunha GR, Bigsby RM. Androgenic induction of DNA synthesis in prostatic glands induced in the urothelium of testicular feminized (Tfm/Y) mice. *Prostate* 1986, 9(3), 217-225.

Sugiyama E. Role of matrix metalloproteinase-3 in joint destruction in rheumatoid arthritis, *Clinical Calcium* 2007, 17(4), 528-534.

Szliszka E, Krol W. Polyphenols isolated from propolis augment TRAIL-induced apoptosis in cancer cells. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* 2013.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006, 126(4), 663-676.

Takaoka A, Tamura T, Taniguchi T. Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis. *Cancer Science* 2008, 99(3), 467-478.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology* 2003, 21, 335-376.

Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T. The IRF family, transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annual Review of Immunology* 2008, 26, 535-584.

Tanaka N, Kawakami T, Taniguchi T. Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system. *Molecular and Cellular Biology* 1993, 13, 4531-4538.

Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual Review of Immunology* 2001, 19, 623-655.

Tarnowski M, Sieron AL. Adult stem cells and their ability to differentiate. *Medical Science Monitor* 2006, 12, 154-163.

Tatsuo K, Stephanie S, Shingo H, Chikara O, Jörg S, Chris L. Expression of a Y-located human proto-oncogene TSPY in a transgenic mouse model of prostate cancer. *Cell Bioscience* 2014, 4, 9.

Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 2007, 448, 196-199.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998, 282, 1145-1147.

Thurairajah K, Broadhead ML, Balogh ZJ. Trauma and Stem Cells: Biology and Potential Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Science* 2017, 18, 577.

Tomioka M, Nishimoto M, Miyagi S, Katayanagi T, Fukui N, Niwa H, et al. Identification of SOX2 regulatory region which is under the control of OCT3/4- SOX2 complex. *Nucleic acid research* 2002, 30(14) 3002-3213.

Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA et, al. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013, 2013,972913.

Tsujimura A, Koikawa Y, Salm S, Takao T, Coetzee S, Moscatelli D, et al. Proximal location of mouse prostate epithelial stem cells: a model of prostatic homeostasis. *The Journal of Cell Biology* 2002, 157(7), 1257-1265.

Van Hoof D, Munoz J, Braam SR, Pinkse MW, Linding R, Heck AJ, et al. Phosphorylation dynamics during early differentiation of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2009, 5(2), 214-226.

Van HI, Lemmens K, Van VS, Verslegers M, Moons L. Matrix metalloproteinase- 3 in the central nervous system: a look on the bright side. *Journal of Neurochemistry* 2012, 123(2), 203-216.

Vander Heiden MG, DeBerardinis RJ. Understanding the intersections between metabolism and cancer biology. *Cell* 2017, 168(4), 657-669.

Veldscholte J, Berrevoets CA, Brinkmann AO, Grootegoed JA, Mulder E. Anti-androgens and the mutated androgen receptor of LNCaP cells: differential effects on binding affinity, heat-shock protein interaction, and transcription activation. *Biochemistry* 1992, 31, 2393-2399.

Venkateswaran V, Klotz LH. Diet and prostate cancer: mechanisms of action and implications for chemoprevention. *Nature Reviews* 2010, 7(8), 442-453.

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

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 2013, 339(6127), 1546-1558.

Wang C, Xie J, Guo J, Manning HC, Gore JC, Guo N. Evaluation of CD44 and CD133 as cancer stem cell markers for colorectal cancer. *Oncology Reports* 2012, 28(4), 1301-1308.

Wang ZA, Mitrofanova A, Bergren SK, Abate-Shen C, Cardiff RD, Califano A, et al. Lineage analysis of basal epithelial cells reveals their unexpected plasticity and supports a cell-of-origin model for prostate cancer heterogeneity. *Nature Cell Biology* 2013, 15(3), 274-283.

Warnmark A, Treuter E, Wright AP, Gustafsson JA. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Molecular Endocrinology* 2003, 17(10), 1901-1909.

Weina K, Utikal J. SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. *Clinical and Translational Medicine* 2014, 3,19.

Whitmann EJ, Pomerantz M, Chen Y. Prostate cancer risk allele specific for African descent associates with pathologic stage at prostatectomy. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention* 2010, 19, 1-8.

Wilbertz T, Wagner P, Petersen K, Stiedl AC, Scheble VJ, Maier S, et al. SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer. *Modern Pathology* 2011, 24(7), 944-953.

Wolf AM, Wender RC, Etzioni RB. American Cancer Society guideline for the early detection of prostate cancer. *CA Cancer Journal for Clinicians* 2010, 60, 70-98.

Wu G, Schöler HR. Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell RegenLond* 2014, 3(1), 7.

Wu I, Modlin CS. Disparities in prostate cancer in African-American men: what primary care physicians can do. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 2012, 79, 313-320.

Xin L. Cells of origin for cancer: an updated view from prostate cancer. *Oncogene* 2013, 32, 3655-3663.

Yanai H, Chen HM, Inuzuka T, Kondo S, Mak TW, Takaoka A, et al. Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007, 104, 3402-3407.

Yang YG, Koh YW, Sari IN, Jun N, Lee S, Phi LTH, et al. Interferon-induced transmembrane protein 1-mediated EGFR/SOX2 signaling axis is essential for progression of non-small cell lung cancer. *International Journal of Cancer* 2019, 15, 144(8), 2020-2032.

Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Fukuda M, Nishida E, Fujita T. Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *European Molecular Biology Organization Journal* 1998, 17, 1087-1095.

Zhang L, Altuwaijri S, Deng F, Chen L, Lal P. NF-kappaB regulates androgen receptor expression and prostate cancer growth. *American Journal of Pathology* 2009, 175, 489-499.

Zhang P, Andrianakos R, Yang Y, Liu C, Lu W. Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 2010b, 285, 9180-9189.

Zhang Q, Shi S, Yen Y, Brown J, Ta JQ, Le AD. A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Letters* 2010, 289(2), 151-160.

Zhang W, Sui Y, Ni J, Yang T. Insights into the Nanog gene: A propeller for stemness in primitive stem cells. *International Journal of Biological Sciences* 2016, 12(11), 1372-1381.

Zhao GN, Jiang DS, Hongliang Li. Interferon regulatory factors: at the crossroads of immunity, metabolism, and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2015, 365-378.

Zhao S, Nichols J, Smith AG, Li M. SoxB transcription factors specify neuroectodermal lineage choice in ES cells. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2004, 27(3), 332-342.

Zhao XY, Ly LH, Peehl DM, Feldman D. 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 actions in LNCaP human prostate cancer cells are androgen-dependent. *Endocrinology* 1997, 138(8), 3290-3298.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : AKARÇAY, Merve
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : YENİMAHALLE / 24.08.1991
Telefon : 05071628919
E-mail : mrvakrcy@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce, Almanca

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Tıp)	2019
Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2013

Bilimsel Toplantıda Sunulan Bildiri:

Akarçay M, Çelik T. Melatonin Yoksa Meme Kanserine Davetiye Var. Ege Üniversitesi 5. Geleneksel Bilim ve Teknoloji Sempozyumu Kanser Genetiği, 2013.Poster Bildiri.