T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROSTAT HÜCRELERİNDE EFS'NİN ANDROJEN DÜZENLENMESİNİN ARAŞTIRILMASI

Hasine YEL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2016

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROSTAT HÜCRELERİNDE EFS'NİN ANDROJEN DÜZENLENMESİNİN ARAŞTIRILMASI

Hasine YEL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2016

Yrd. Doç. Dr. İsmail KOYUNCU danışmanlığında, Hasine YEL' in hazırladığı **"Prostat Hücrelerinde EFS' nin Androjen Düzenlenmesinin Araştırılması"** konulu bu çalışma 16/12/ 2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Yrd. Doç. Dr. İsmail KOYUNCU …….

Üye : Doç. Dr. Şahabettin SELEK …….

Üye : Yrd. Doç. Dr. Arif PARMAKSIZ …….

Bu Tezin Biyoloji Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım

Prof. Dr. Murat KISA
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma TÜBİTAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 113S290
Proje No: 114S108

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET … i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER DİZİNİ vi
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 3
2. 1. Prostatın Yapısı ve Anatomisi 3
2. 1. 2. Prostat kanserinin karakteristik özellikleri 5
2. 1. 3. Prostat kanseri patolojik lezyonları 8
2. 1. 4. Prostat lezyonlarında sıklıkla mutasyonları görülen genler 10
2. 1. 4. 1. Pten 10
2. 1. 4. 2. C-myc 11
2. 1. 4. 3. p53 11
2. 1. 4. 4. Nkx3.1 11
2. 1. 4. 5. Retinoblastoma 11
2. 2. Androjen Sinyali 12
2. 2. 1. Androjen 12
2. 2. 1. 2. Androjen reseptörü (AR) 13
2. 2. 1. 3. Androjen reseptörünün yapısı ve aktivasyonu 13
2. 3. 1. 4. Androjen reseptörü aktivasyonu ve mekanizması 15
2. 3. 1. 5. Androjen-bağımlı prostat kanseri 16
2. 3. 1. 6. Androjen-bağımsız prostat kanseri 17
2. 3. EFS (Embryonal Fyn-associated Substrate) 20
2. 3. 1. EFS'nin yapısı 20
2. 3. 2. EFS ve kanser 22
3 .MATERYAL ve YÖNTEM 23
3. 1. Hücre Kültürü 23
3. 1. 1. Materyal 23
3. 1. 2. Yöntem 24
3. 1. 2. 1. Hücrelerin bakımı 24
3. 1. 2. 2. Hücrelerin pasajlanması 24
3. 1. 2. 3. Hücrelerin dondurulması ve çözdürülmesi 25
3. 1. 2. 4. Hücre sayımı 25
3. 1. 2. 5. Serum yoksunluğu ve madde uygulamaları 26
3. 2. Hücre Poliferasyonunun Ölçülmesi 26
3. 2. 1. Materyal 26
3. 2. 1. 1. Yöntem 27
3. 3. Plazmid İzolasyonu 27
3. 3. 1. Materyal 27
3 .3. 2. Yöntem 28
3. 4. Transfeksiyon 28
3. 4. 1. Materyal 28
3. 4. 2. Yöntem 29
3. 4. 2. 1. EFS ve AR konstraktlarının transfeksiyonu 29
3. 4. 2. 2. Sirna transfeksiyonu 29
3. 5. İmmünofloresan 30
3. 5. 1. Materyal 30
3. 5. 2. Yöntem 31
3. 5. 2. 1. Hücrelerin hazırlanması 31

3. 5. 2. 2. Fiksasyon ve bloklama 31
3. 5. 2. 3. Primer antikor İşaretlemesi 31
3. 5. 2. 4. Sekonder antikor işaretlemesi 32
3. 5. 2. 5. DAPI ile boyama 32
3. 6. Western-Blot (İmmünoblotlama) 32
3. 6. 1. Materyal 33
3. 6. 2. Yöntem 35
3. 6. 2. 1. Hücrelerden protein izolasyonu 35
3. 6. 2. 2. Protein miktarının belirlenmesi 35
3. 6. 2. 3. Proteinlerin sds-page ile ayrılması 36
3. 6. 2. 4. Protein örneklerinin sds-page jelden membrana transferi 37
3. 6. 2. 5. PVDF membrana primer antikor işaretlemesi 37
3. 6. 2. 6. PVDF membrana sekonder antikor işaretlemesi 38
3. 6. 2. 7. Bantların görüntülenmesi 38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 39
4. 1. Androjenin EFS Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi 39
4. 2. EFS' nin Farklı Mekanizmalar Tarafından Kontrolünün Araştırılması 42
4.3. EFS'nin Androjen ile Seviyesel Artışının RNA yada Protein Düzeyinde Oluşunun Belirlenmesi 42
4. 4. Serum Yoksunluğunda EFS Seviyesinin Araştırılması 43
4. 5. EFS' nin AR Seviyesi ve Transaktivasyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması 44
4. 6. EFS Aracılıklı AR Seviyesinin Mekanizmasının Belirlenmesi 46
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 48
KAYNAKLAR 52
ÖZGEÇMİŞ 56

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PROSTAT HÜCRELERİNDE EFS'NİN ANDROJEN DÜZENLENMESİNİN ARAŞTIRILMASI

Hasine YEL

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. İsmail KOYUNCU
Yıl: 2016, Sayfa: 57

Bu tez çalışmasında prostat hücreleri kullanılarak androjenin (EFS/SIN) ekspresyonu üzerine olan etkisi ile beraber EFS ekspresyonunun da androjen reseptörü (AR)'nün transaktivasyonu'na olan etkileri hücre kültürü ve moleküler biyoloji yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır.Prostat kanseri, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde erkeklerde en sık tanı konulan kanserler arasında yer almaktadır. Prostat kanseri tümörleri genellikle androjen bağımlıdır ve bu durumda tedaviler testosteron seviyesini azaltmaya yönelik olmaktadır. Bu tedavi yaklaşımıyla genellikle bir süreliğine tümör çapında küçülme ve hastalarda dönemsel bir rahatlama sağlansa da tedavi sürecinin ardından (18-24 ay) çoğu hastada androjen bağımsız tümör gelişimi gözlenmektedir. Bu aşamadan sonra hastalar için herhangi bir tedavi seçeneği kalmamaktadır. Androjen normal prostat bezinin gelişimi ve prostat kanserinin gelişiminde önemli rol oynayan bir molekül olup etkisini (AR) aracılığıyla göstermektedir. Yapılan çalışmalar AR molekülünün çoğu androjen bağımsız tümörlerde de bulunduğu ve bu yüzden de androjenle uyarılabilen genlerin androjen bağımsız prostat kanseri gelişiminde rolleri olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesinin daha iyi anlaşılabilmesi için androjen ile uyarılabilen genlerin belirlenmesi çok önemlidir. EFS, Crk bağlantılı subsrat (CAS) ailesinin bir üyesidir ve CAS ailesinin üyelerinin karsinogenesiste çeşitli rolleri olduğu bilinmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda EFS'nin bir hücre içi sinyal molekülü olabileceği ve hormonlar ile uyarılabileceğine yönelik veriler bulunmaktadır. Biz araştırmamızda prostat kanseri hücrelerinde EFS'nin androjen ile uyarılan bir gen olduğunu ve EFS'nin AR sinyal mekanizmasında görev aldığını düşünmekteyiz. Bu hipotezimiz doğrultusunda yaptığımız çalışmamızda prostat kanseri hücrelerinde DHT (Dihidrotestosteron) varlığında prostat kanserinin bir biyobelirteci olan PSA (Prostat Spesifik Antijen)' nın seviyesindeki artışla orantılı olarak EFS geni seviyesinde ciddi bir artış gözlemlenmiştir. Androjen reseptörünün (AR) siRNA aracılıklı olarak susturulması durumunda EFS seviyesinde bir azalma gözlemledik ve bu verilerden yola çıkarak yaptığımız çalışmalarda hipotezimize doğru orantılı olarak EFS geninin androjenle uyarılan bir gen olduğunu göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELER: prostat kanseri, androjen, androjen reseptörü, efs/sın

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE ANDROGEN REGULATION OF EFS IN PROSTATE CELL

Hasine YEL

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. İsmail KOYUNCU
Year: 2016, Page: 57

In this thesis, by using the cells of the prostate androgens (EFS/SIN) with the effect of EFS on the expression of the androgen receptor expression (AR)'s Trans-activation effects were investigated using the methods of cell culture and Molecular Biology.Prostate cancer is among the most commonly diagnosed cancers among men in developed and developing countries. Tumors prostate cancer is often dependent of androgen, and in this case treatments are aimed at reducing the level of testosterone. With this treatment approach, usually the diameter of the tumor shrinking for a while or whether there was a periodic relaxation and the treatment process in most patients after in patients with androgen-independent tumor growth is observed. After this stage, there is no any treatment options for patients. The development of the normal prostate gland and is a molecule that plays an important role in the development of prostate cancer and the effect shows through the (AR). Most of the AR molecule studies of androgen-independent tumors resides in, and therefore can be stimulated with androgens in the development of androgen independent prostate cancer reveals that the roles of genes that can have. Therefore, to gain a better understanding of the development and progression of prostate cancer, the identification of genes that can be stimulated by androgens is very important.EFS Crk linked substrate (CAS) is a member of the family and carcinogenesis is well known that several family members of the CAS roles. In addition, the studies EFS might be an intracellular signaling molecule and hormones can be stimulated with data. In our research we believe EFS is a gene that is induced by androgen in prostate cancer cells AR took part in the EFS signal mechanism. This is in line with our hypothesis our preliminary studies in prostate cancer cells to DHT (dihydrotestosterone) which are biomarkers of the presence of prostate cancer in PSA (prostate specific antigen), in proportion to the increase in the level of a substantial increase in the level of the EFS gene has been observed. Androgen receptor (AR) mediated RNA silencing we have observed in the case of a decrease in the level of EFS and on the basis of these data our hypothesis was correct in the work we do in proportion of the gene suggests that a gene is androgen stimulated with EFS.

KEY WORDS: prostate cancer, androgen, androgen receptor, efs/sın

ÖNSÖZ

Tezimi sunmam konusunda gösterdiği büyük çaba ve yardımdan dolayı danışmanım Yrd. Doç. Dr. İsmail KOYUNCU' ya, yüksek lisans eğitimine başladığım ilk günden itibaren bilimsel çalışmalarıma yardım ederek tez çalışmamı yapmamda hiçbir yardımı esirgemeden yanımda olan hocama ve bu teze maddi destek sağlayan Tübitak'a,

Her anımda arkamda büyük desteklerini hissettiğim, iyi bir eğitim almam için her türlü fedakârlığı gösteren, beni asla yalnız bırakmayan annem Fidan YEL ve babam Nurettin YEL' e varlıklarıyla huzurun yanında bana birde neşe veren canım kardeşlerime, eğitim hayatına başladım andan itibaren maddi manevi her koşulda yanımda olarak desteklerini esirgemeyen teyzem Şerife ve dayım İbrahim başta olmak üzere teyze ve dayılarıma,

Laboratuvar ortamında birlikte çalıştığım ve deneylerde hiç kaçınmadan büyük sabırla her türlü yardımda bulunan Selda SERTKAYA' ya ve laboratuvarda soğuk espriler ile sıcak rüzgarlar estirmeye çalışan Özgür YÜKSEKDAĞ' a ve engin tecrübeleriyle her zaman yanımda olarak moralimi yüksek tutmamı sağlayan Emine DÜBÜLLÜ' ye ve onla tanışmama aracı olan Mariya AKMEŞE' ye teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Prostatın Yapısı 3
Şekil 2.2. Prostatın zonları 1; (a) Sentral zonu, (b) Fibromoscular zonu, (c) Transisyonel zonu, (d) Periferal zonu, (e) periprostatik sfinkterik zonları simgelemektedir 4
Şekil 2.3. 2015 Yılı ABD Kanser İnsidansı 6
Şekil 2.4. Prostat kanserine neden olduğu bilinen etkiler; (a) Enfeksiyon ajanlar, (b) Hormonal etkenler, (c) Fiziksel travmalar, (d) Ailesel kalıtım, (e) Beslenme alışkanlıkları 7
Şekil 2.5. Prostat Neoplazi Gelişiminin Hücresel ve Moleküler Modellemesi 9
Şekil 2.6. Androjenlerin Yapısı: DHT; Dihidrotestosteron, Testo; Testosteron 13
Şekil 2.7. Androjen reseptörünün Yapısı 14
Şekil 2.8. Androjen Sinyal Mekanizması 16
Şekil 2.9. Prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonu ve yaşayabilirliğinin regülasyonunda AR' nün hücre döngüsü bağımlı aktivitesi 17
Şekil 2.10. Androjen bağımlı prostat kanserinin androjen bağımsız prostt kanserine geçişini açıklayan mekanizmalar 18
Şekil 2.11. CASS aile proteinlerinin şematik alanı yapısı ve fosforilasyon bölgeleri karşılaştırma 21
Şekil 4.1. LNCaP hücrelerinde serum yoksunluğu uygulamasının ardından 0-2-6-12-24 saatlik DHT uygulamasının ardından elde edilen protein lizatlarından western-blot yöntemi kullanılarak EFS seviyesine bakıldı (0h hücrelere herhangi bir madde uygulanmamıştır) 40
Şekil 4.2. PNT1a hücrelerinde serum yoksunluğu uygulamasının ardından 0-2-6-12-24 saatlik DHT uygulamasının ardından elde edilen protein lizatlarından western-blot yöntemi kullanılarak EFS seviyesine bakıldı (0h hücrelere herhangi bir madde uygulanmamıştır) 40
Şekil 4.3. LNCaP hücrelerine serum yoksunluğu uygulamasının ardından hücrelere bicalatumide madde uygulaması yapıldı 2 saat ardından 24 saat DHT madde uygulaması yapıldı ve hücrelerden elde edilen protein lizatlarına western-blot yöntemi kullanılarak AR ve EFS seviyelerine bakıldı 41
Şekil 4.4. LNCaP hücrelerinde var olan AR' nün siRNA ile susturulmasının ardından 24 saatlik madde uygulaması yapıldı ve hücrelerden elde edilen protein lizatları western-blot yöntemi kullanılarak AR ve EFS seviyelerine bakıldı (kontrol hücrelerine hiçbir madde uygulanmadı) 41
Şekil 4.5. LNCaP hücrelerine serum yoksunluğu uygulamasının ardından PD59058 ve LY294002 madde uygulaması yapıldı 2 saat sonra hücrelere 24 saatlik DHT madde uygulaması yapıldı ve hücrelerden elde edilen protein lizatları western-blot yöntemi kullanılarak AR ve EFS seviyelerine bakıldı (kontrol hücrelerine hiçbir madde uygulanmadı) 42
Şekil 4.6. LNCaP hücrelerine serum yoksunluğu uygulamasının ardından Act-D ve CHX madde uygulamasının sonrasında DHT uygulanan hücrelere 24 saat DHT uygulaması yapıldı hücrelerden elde edilen protein lizatları western-blot yöntemi kullanılarak AR ve EFS seviyelerine bakıldı (kontrol hücrelerine hiçbir madde uygulanmadı) 43
Şekil 4.7. LNCaP hücrelerinden birine serum yoksunluğu uygulanırken diğer hücre normal FBS'li ortam ile beslendi ve ardından hücrelere 24 saat DHT madde uygulaması yapıldı hücrelerde AR ve EFS seviyelerinin serum yoksunluğu olan ve olmayan hücrelerdeki değişimine bakıldı 44
Şekil 4.8. LNCaP hücrelerinde var olan EFS siRNA aracılığı ile susturularak 24 saatlik DHT uygulaması yapıldı ardından hücrelerden protein lizatı elde edilerek western-blot yöntemi kullanılarak AR ve EFS seviyelerine bakıldı (kontrol hücrelerine hiçbir madde uygulanmadı) 45
Şekil 4.9. LNCaP hücrelerinde var olan EFS siRNA aracılıklı olarak susturuldu ve 24 saat DHT uygulaması yapıldı ve ardından hücreler Immunofloresan yöntemi kullanılarak incelendi (kontrol hücrelerine hiçbir madde uygulanmadı) 46
Şekil 4.10. LNCaP hücrelerinde var olan EFS siRNA aracılıklı olarak susturuldu ve hücrelere MG-132 uygulaması ve DHT uygulaması yapıldı ardından AR ve EFS seviyelerine bakıldı (kontrol hücrelerine hiçbir madde uygulanmadı) 47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. Ayırma jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları 36
Çizelge 3.2. Depolama jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları 37

SİMGELER DİZİNİ

AF-1	Nükleer aktivasyon fonksiyonu-1
AF-2	Nükleer aktivasyon fonksiyonu-2
Act-D	Actinomissin-D
AR	Androjen reseptörü
ARE	Androjen tepki elemanları
ATF	Transkripsiyon aktivasyon faktörü
BCL-2	Lenfoma B hücresi-2
BIC	Bicalutamide
BPH	Benin prostat hiperplazisi
BSA	Bowine serum albümine
CASS	Crk bağlantılı subsrate
CAG	Polygulutamine
CHX	Cycloheximide
CTD	Karboksi terminal domain
CT-FBS	Aktif karbon eklenmiş dana serumu
DAPI	DNA bağlama boyası
DBP	DNA bağlanma bölgesi
DHT	Dihidrotestesteron
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EFS	Embriyonal fyn-associated subsrate
EtOH	Ethanol
FAT	Fokal adhezyon hedefleyen bölge
FBS	Fötal dana serumu
GGC	Polyglisine
HSP70	Isı şok proteini-70
HSP90	Isı şok proteini-90
HGPIN	Yüksek dereceli prostat intraepitel neoplazi
KCI	Potasyum klorür
KH_2PO_4	Potasyum fosfatmono bazik
LBD	Ligand bağlanma domaini
LNCaP	İnsan prostat karsinomu lenf nodu metastaz hücresi
LGPIN	Düşük dereceli prostat intraepitel neoplazi
MG132	Proteozomal degredasyon yıkım inhibitörü
NaCI	Sodyum klorür
NaH_2PO_4	Sodyum fosfat monobazik
NES	Nükleer çıkış sinyali
NLS	Nükleer lokalizasyon sinyali
NR3C4	Nükleer reseptör ailesi 3'ün C grubunun 4. üyesi
NTD	N-terminal domaini

P53	Tümör protein
PAGE	Polyakrilamide jel
PBS	Fosfat yıkama tamponu
PCa	Prostat kanseri
PIA	Prostat intraepitel atrofi
PIN	Prostat intraepitel neoplazi
PİP3	Fosfatidilinozitol 3, 4, 5-trifosfataz
PKB	Protein kinaz B
PMSF	Fenilmetilsülfonil florid
pRB	Fosforetinoblastoma
PSA	Prostat spesifik antijen
PTEN	Fosfataz ve tensin homolog
PVDF	Polivinlidin fluroid
RB	Retinoblastoma
SD	Subsrate domaini
SDS	Sodyum dodesilsülfat
SER	Serince zengin bölge
SH2	Scr homolog 2
SH3	Scr homolog 3
SHBG	Cinsiyet hormonu bağlayıcı globülin
SIN	Scr sinyal etkileşimi
TAU-1	Transkripsiyonel aktivasyon birimi-1
TAU-5	Transkripsiyonel aktivasyon birimi-5
TBST	Membran yıkama solüsyonu
TESTO	Testosteron

1. GİRİŞ

Prostat kanseri, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde erkeklerde en sık tanı konulan kanserler arasında yer almaktadır. Prostat kanseri tümörleri genellikle androjen bağımlıdır ve bu durumda tedaviler testosteron seviyesini azaltmaya yönelik olmaktadır. Bu tedavi yaklaşımıyla genellikle bir süreliğine tümör çapında küçülme ve hastalarda dönemsel bir rahatlama sağlansa da tedavi sürecinin ardından (18-24 ay) çoğu hastada androjen bağımsız tümör gelişimi gözlenmektedir. Bu aşamadan sonra hastalar için herhangi bir tedavi seçeneği kalmamaktadır. Androjen normal prostat bezinin gelişimi ve prostat kanserinin gelişiminde önemli rol oynayan bir molekül olup etkisini AR (Androjen reseptörü) aracılığıyla göstermektedir. Yapılan çalışmalar AR molekülünün çoğu androjen bağımsız tümörlerde de bulunduğu ve bu yüzden de androjenle uyarılabilen genlerin androjen bağımsız prostat kanseri gelişiminde rolleri olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesinin daha iyi anlaşılabilmesi için androjen ile uyarılabilen genlerin belirlenmesi çok önemlidir.

Embriyonal Fyn-associated substrate (EFS/SIN) ilk olarak Ishino ve arkadaşları tarafından fare embriyonal cDNA kütüphanesi kullanılarak SH3 domaini ile etkileşebilen proteinleri ortaya çıkarmak için yapılan bir çalışmada belirlenmiştir. Bu çalışmadan kısa bir süre sonra Alexandropoulos ve arkadaşları tarafından yine fare embriyonal cDNA kütüphanesi kullanılarak SRC ile etkileşen belirlemek için yapılan bir çalışmada da gösterilmiştir. EFS, Crk bağlantılı subsrat (CAS) ailesinin bir üyesidir ve CAS ailesinin tüm üyelerinin karsinogenesiste çeşitli rolleri olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan, yapılan çalışmalar EFS'nin bir hücre içi sinyal molekülü olabileceğini önermektedir. Bu raporlar ile uyumlu bir şekilde EFS'nin hormonlar ile uyarılabileceğine yönelik çeşitli verilerde bulunmaktadır.

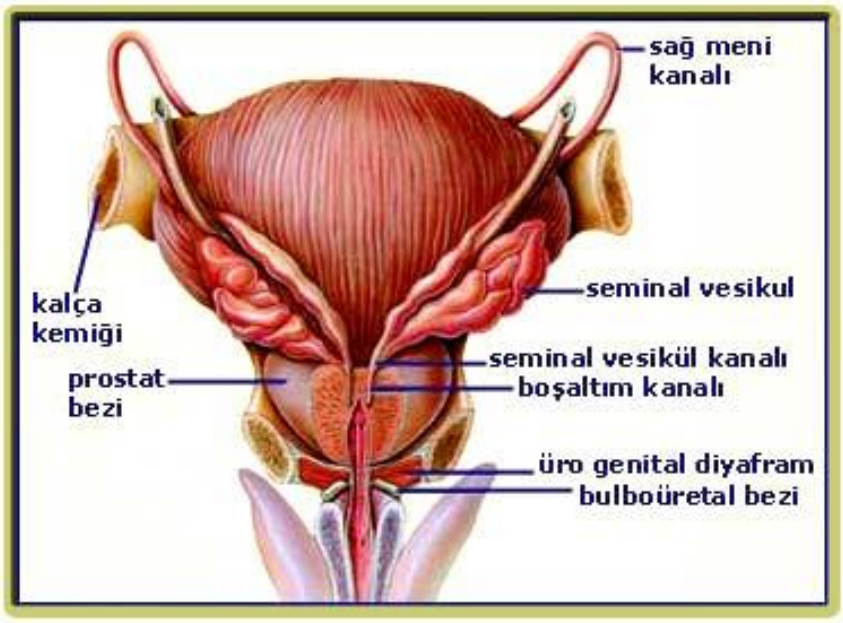
Bu tez çalışmasında prostat hücreleri kullanılarak androjenin EFS ekspresyonu üzerine olan etkisi ile beraber EFS ekspresyonunun da androjen reseptörü (AR)' nün transaktivasyonuna olan etkileri hücre kültürü ve moleküler biyoloji yöntemleri

kullanılarak araştırılmıştır. Bu tez çalışmasının sonunda elde edilecek veriler ile prostat kanserinin tanısına yardım edebilecek androjen ile uyarılabilen yeni bir gen tanımlanabilecek ve AR (androjen reseptörü) sinyal mekanizmasının kontrolünde görev alan yeni bir faktör ortaya çıkarılabilecektir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Prostatın Yapısı ve Anatomisi

Prostat, sadece erkeklerde bulunan 18 gram ağırlığında, 3 cm uzunluğunda ve 4cm genişliğinde olan bir salgı bezidir. Mesanenin altında yer alarak, üretrayı çevrelemektedir. Temel görevi sperm hareketliliğini sağlayan seminel sıvıyı üretmektir. Seminel sıvı; birçok protein ve minerallerden oluşan bir karışımdır ve spermler kadın üreme kanalına doğru yol alırken seminel sıvı koruyucu olarak görev yapmaktadır (Scardino, 2005).

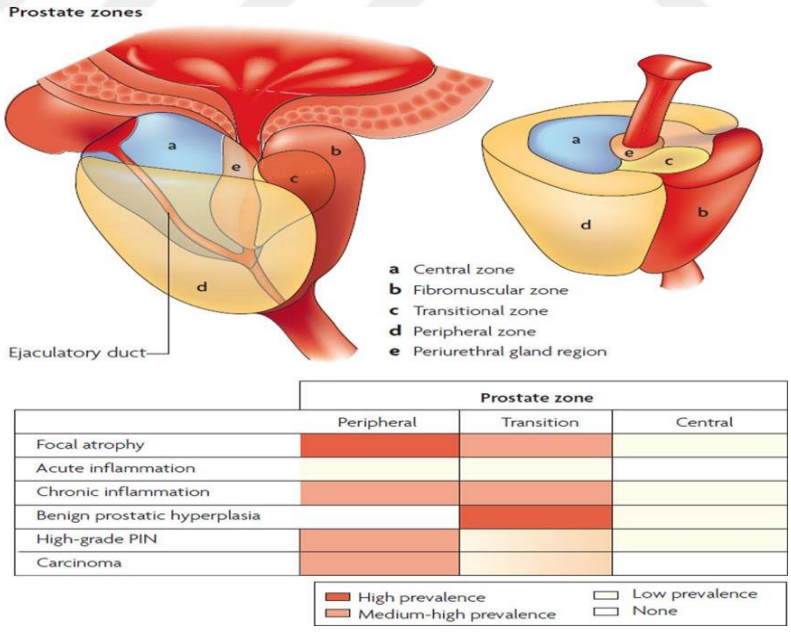


Şekil 2.1. Prostatın Yapısı (Scardino, 2005)

Gelişimi gebeliğin 10-12. haftasında başlayarak ömür boyu devam etmekte olan prostat bezinin gelişimi için androjen hayati öneme sahiptir. Kimyasal yolla androjenin uzaklaştırılması prostatın fonksiyonunun ve prostatın kütlesinin çoğunun kaybolması ile sonuçlanmaktadır (Prescott ve ark., 1998).

Normal prostat bezinde; lüminal salgı hücreleri, bazal hücreler ve nöroendokrinal hücreler olmak üzere 3 faklı hücre tipi bulunmaktadır. Lüminal salgı hücreler, androjen reseptörü (AR) ve "Prostat Spesifik Antijen" (PSA) ekspresyonu ile karakterizedir. Bazal hücreler, sitokeratin 5 ve 14, AR ve CD44 düşük seviyelerini içerir. Nöroendokrin hücreler ise, androjen bağımsızdır ve çeşitli peptit hormonların ifadesini sağlamaktadır (Konishi ve ark., 2005).

Salgı epitel hücreleri tarafından üretilen substrat özgüllüğüne sahip serin proteazı olan "Prostat Spesifik Antijen (PSA)" proteini prostat için kritik öneme sahiptir. PSA enzimatik aktivitesini semenin en önemli jel oluşturucu proteinlerine yani seminojelin 1 ve 2'ye karşı göstermektedir ve seminel sıvının koagülasyonunu önleyerek sperm hareketliliğini sağlamaktadır. Bezdeki en önemli hücre tipini temsil eden salgı epitel hücreleri büyüyebilmek için androjene bağımlıdırlar (Hallstrom, ve Laiho, 2008).İlk olarak 1968' de McNeal ve arkadaşları prostatın normal anatomisi ile ilgili yaptıkları çalışmada prostatı tanımlamak için "anatomik zon" kavramını ortaya atmışlardır (Şekil 2.2.) (Korkmaz ve ark., 2000).



Şekil 2.2. Prostatın zonları 1; (a) Sentral zonu, (b) Fibromoscular zonu, (c) Transisyonel zonu, (d) Periferal zonu, (e) periprostatik sfinkterik zonları simgelemektedir (De Marzo ve ark., 2007

Prostat içinde beş ana zon vardır: Periferal zon, Santral zon, Transisyonel zon, Anterior fibromüsküler stroma ve Preprostatik sfinkterik zondan oluşmaktadır. Bunlardan ilk üçü prostatın glandüler kısmına karşılık gelirken, anterior veya ventral fibromüsküler stroma ile preprostatik sfinkterik bölge, prostat dokusunun nonglandüler kısmını oluşturmaktadır.

Prostat bezinin %75' ini periferal zon oluşturur ve bezin çevresinde apeksten tabana doğru uzanan bir doku tabakası meydana getirmektedir. Central (merkezi) bölge prostat bezinin %25' ini oluşturmaktadır ve ejakülasyon kanalını çevrelemektedir. Geçiş bölgesi üretrayı saran iki küçük lobdan oluşur ve iyi huylu prostat büyümesinin köken aldığı bölgeyi temsil eder. Fibromusküler stroma ise kalın, glandular yapıda olmayan koruyucu bir kılıf olarak prostatın tüm ön yüzeyini oluşturmaktadır. Birçok prostat kanseri periferal bölgede oluşmaktadır (De Marzo ve ark., 2007; Hallstrom ve Laiho, 2008). Kanser erken tedavi edilemezse tümör kapsüle doğru yayılıp çevre dokulara sıçramaktadır. Kanserlerin çok az bir oranı da merkezi bölgede görülmektedir (Rini, 2011).

2.1.2. Prostat kanserinin karakteristik özellikleri

Prostat bezindeki hüre poliferasyonu ve hücrelerde ki apoptozis (hücre ölümü) arasında ki dengenin bozulması ve buna bağlı olarak organ hacminin malin büyümesi olarak tanımlanan prostat kanseri (PCa) olarak tanımlanmaktadır (Emil ve ark., 2004).

Dünyada en sık görülen kanser çeşitleri arasında yer alan prostat kanserinin (PCa), ileri yaş erkeklerde görülme sıklığı Amerika Birleşik Devletleri istatistiklerine göre ilk sıradadır (Şekil 2.3.) (Karine ve ark., 2006). Erkeklerde ileri yaşlarda sıklıkla görülen ve ölümle sonuçlanabilen kanser türleri arasında ise PCa 2. sırada yer almaktadır (Emil ve ark., 2004).



Estimated New Cases

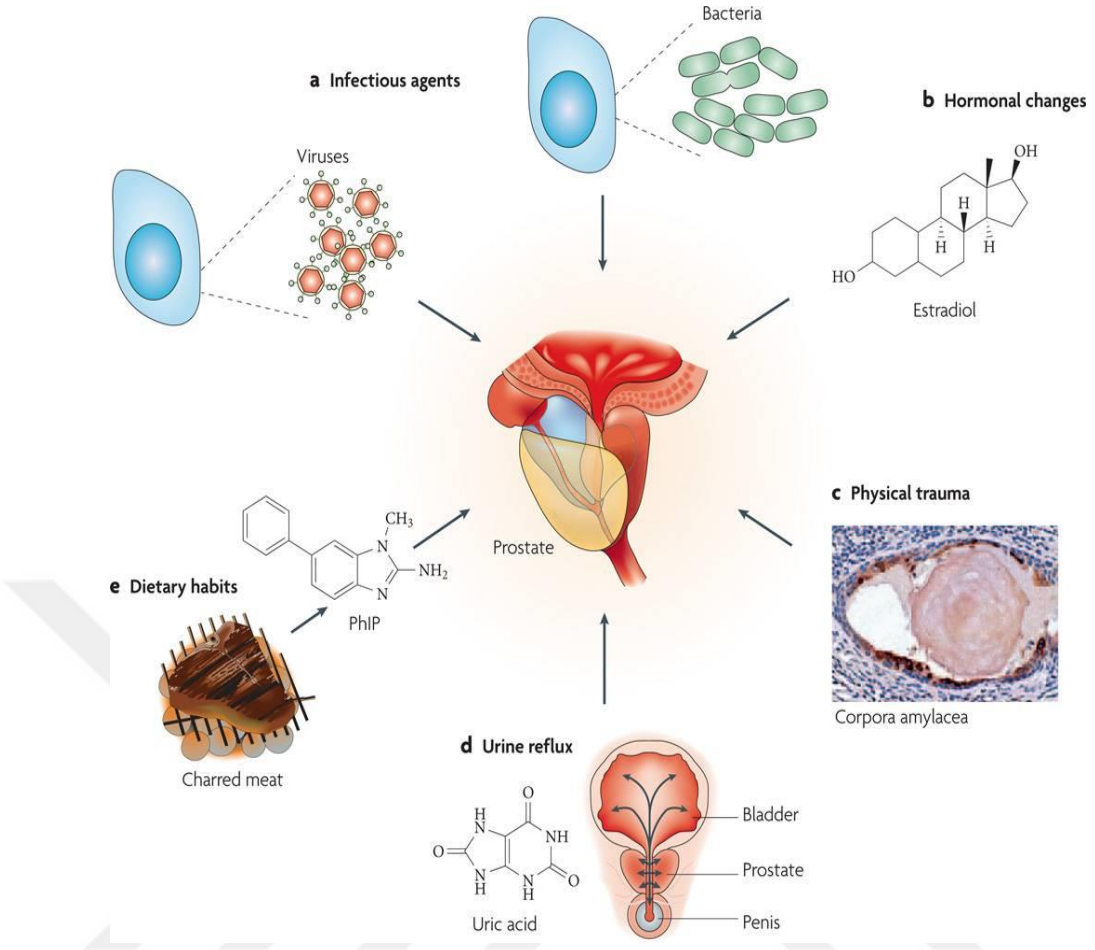
			Males	Females			
Prostate	220,800	26%			Breast	231,840	29%
Lung & bronchus	115,610	14%			Lung & bronchus	105,590	13%
Colon & rectum	69,090	8%			Colon & rectum	63,610	8%
Urinary bladder	56,320	7%			Uterine corpus	54,870	7%
Melanoma of the skin	42,670	5%			Thyroid	47,230	6%
Non-Hodgkin lymphoma	39,850	5%			Non-Hodgkin lymphoma	32,000	4%
Kidney & renal pelvis	38,270	5%			Melanoma of the skin	31,200	4%
Oral cavity & pharynx	32,670	4%			Pancreas	24,120	3%
Leukemia	30,900	4%			Leukemia	23,370	3%
Liver & intrahepatic bile duct	25,510	3%			Kidney & renal pelvis	23,290	3%
All Sites	**848,200**	**100%**			**All Sites**	**810,170**	**100%**

Estimated Deaths

			Males	Females			
Lung & bronchus	86,380	28%			Lung & bronchus	71,660	26%
Prostate	27,540	9%			Breast	40,290	15%
Colon & rectum	26,100	8%			Colon & rectum	23,600	9%
Pancreas	20,710	7%			Pancreas	19,850	7%
Liver & intrahepatic bile duct	17,030	5%			Ovary	14,180	5%
Leukemia	14,210	5%			Leukemia	10,240	4%
Esophagus	12,600	4%			Uterine corpus	10,170	4%
Urinary bladder	11,510	4%			Non-Hodgkin lymphoma	8,310	3%
Non-Hodgkin lymphoma	11,480	4%			Liver & intrahepatic bile duct	7,520	3%
Kidney & renal pelvis	9,070	3%			Brain & other nervous system	6,380	2%
All Sites	**312,150**	**100%**			**All Sites**	**277,280**	**100%**

Şekil 2.3. 2015 Yılı ABD Kanser İnsidansı (Karine ve ark., 2006)

PCa ile yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda; temel olarak PCa ile ilgili yaş, ailesel kalıtım, beslenme, ırksal farklılıklar ve hormonal etkiler gibi birçok etki saptanmıştır (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Prostat kanserine neden olduğu bilinen etkiler; (a) Enfeksiyon ajanlar, (b) Hormonal etkenler, (c) Fiziksel travmalar, (d) Ailesel kalıtım, (e) Beslenme alışkanlıkları (De Marzo ve ark., 2007; Hallstrom ve Laiho, 2008)

Yaş; PCa'nin en önemli risk faktörü olarak gösterilmektedir. (Emil, ve ark., 2004). Amerika Birleşik Devletleri istatistiklerine göre bütün kanserler arasında prostat kanseri yaşla beraber en hızlı artış gösteren kanser türüdür. Ancak prostat kanserinde yaşlanma sürecindeki hangi faktörlerin sorumlu olduğu bilinmemektedir (Karine ve ark., 2006).

Ailesel kalıtım**;** PCa'nın %10'nun da ailesel faktörler etki etmektedir. Kalıtsal gelişen PCa'nın klinik ilerleyişinin agresif yapıda olduğu gözlenmiştir (Angelo, 2007). Pozitif prostat kanseri aile öyküsü de prostat kanseri için göreceli riski arttırmaktadır (Tanagho, 1995).

Beslenme; İnsanların esasen yağdan fakir, bitkisel kökenli besinler tükettiği dünyanın bazı bölgelerinde klinik açıdan prostat kanseri insidansının çok daha düşük olduğunu göstermiştir (Lonergan ve Donald, 2011). Ayrıca yapılan bazı göç araştırmalarında düşük riskli ülkelerden göç eden ve batı tarzı beslenenlerde prostat kanseri oranlarının birkaç kat artarak konaklanan ülkedekine yaklaştığını göstermiştir. Toplam alınan katı yağ, hayvansal yağ ve kırmızı et tüketimi yüksek prostat kanseri riskiyle ilişkilendirilmiştir (Tanagho, 1995). Ayrıca vitamin E ve selenyum gibi antioksidanların düzenli kullanımının PCa riskini azalttığı düşünülmektedir (De Marzo ve ark., 2007).

Irksal farklılıklar; Afrika kökenli Amerikalılarda prostat kanseri gelişme riski beyaz ırklara göre daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Dünyada en yüksek risk grubu ise, Afrika kökenli Amerikalı erkeklerdir ve ölüm oranlarının beyazlara göre daha yüksek olduğu gözlenmektedir (Dunn, 2011). Afrika kökenli Amerikalı erkekler tanı konduğunda beyazlardan daha ileri evre hastalık gösterme eğiliminde oldukları gözlenmiştir (Tanagho, 1995).

Hormonal etkiler; PCa hücrelerinin çoğu hormonlara karşı duyarlıdır ve hormon bulunan ortamda hızla büyüdükleri gözlenmiştir. Ancak kastrasyon sonrasında PCa hastalarında prostat kanserinin oluşmadığı gözlenmiştir. Ayrıca sıçanlarda yapılan bir çalışmada testosteron hormonunun kanser oluşumunu teşvik ettiği gözlenmiştir (Emil ve ark., 2004).

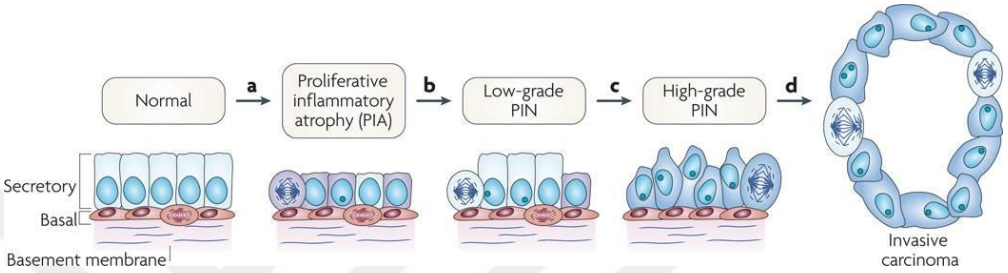
Bunların dışında yetişkinlerde kanser türlerinin %20’ si enfekte ajanlara ya da diğer çevresel faktörlere maruz kalmaktan dolayı başlayan kronik enflamasyondan kaynaklanmaktadır (De Marzo ve ark., 2007).

2.1.3. Prostat kanseri patolojik lezyonları

Erkeklik hormonu olan testosteron miktarını azaltarak veya tamamen ortadan kalkması sağlanarak prostat kanserinde geçici olarak gerileme gözlenmiştir. (Dr. Charles B. Huggins 1966 yılında tıp alanında Nobel ödülü almıştır) Ancak prostat

kanseri bir süre sonra dolaşımda hormon seviyesi düşük olsa dahi ilerlemesini yeniden başlatabilir, bu durumda kontrol edilmesi güç, ölümcül bir kansere dönüşebilmektedir.

Prostat organında meydana gelen patolojik lezyonlar; benin prostat hiperplazisi (BPH), proliferatif inflamatuar atrofi (PİA) ve prostat kanseri (PCa) şeklindedir (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Prostat Neoplazi Gelişiminin Hücresel ve Moleküler Modellemesi (De Marzo ve ark., 2007)

BPH; prostatın büyümesi ile karakterize edilen ve prostat bezinde istenmeyen ancak kansere neden olmayan bir prostat bezi hastalığı olarak adlandırılmaktadır. PCa'da olduğu gibi ileri yaş erkeklerde gözlenmektedir. İlerleyen yaş ile birlikte prostat periferal lobu atrofiye olurken iç dokularda ise stromal ve epitelyal hiperplazi gözlenmektedir. Ancak makroskopik hacimde büyümesi için tümörün uzun zamana ihtiyacı vardır ve bu zamanın sonunda klinik olarak tespit edilebilmektedir. Prostat büyümesi mesaneyi sıkıştırması şeklinde kendini göstermektedir (Iyer ve Scardıno, 2009). İyi huylu prostat büyümesi (BPH) gelişimini birçok faktör etkilemektedir ancak bunlardan en önemlisi androjenin ve yaşlanmanın etkisidir.

Prostat tümörleri, prostatta en geniş hücre popülasyonunu oluşturan salgı lüminal epitel hücrelerinden türevlenmektedir. Prostat bezinde ki prostat kanserinin iki farklı tipte öncül lezyonu bulunmaktadır; PIA (prostat intraepitel atrofi) lezyonları ve PIN (prostat intraepitel neoplazi) olarak adlandırılmaktadırlar (Hallstrom ve Laiho, 2008). PIN lezyonlarının oluşumundan sonra stroma invazyonu ve ardından hormon bağımlı ve bağımsız olarak lenf bezlerine ve kemiğe metastaz şeklinde

gelişim göstermektedir. Genellikle PIA alanlarından yüksek düzeyde prostatik intraepitel neoplaziye (PIN) geçiş bulunmaktadır.

Bakteriyel, viral enfeksiyon, kimyasal ve fiziksel travma, beslenme alışkanlıkları ile hormonal faktörler nedeniyle aktifleşen enflamatuvar hücreler tarafından salınan süperoksit, hidrojen peroksit vb. reaktif oksijen türleri epitel hücrelerinde oksidatif DNA hasarına ve hücre ölümüne yol açabilmektedir. Bu durum epitel hücre rejenerasyonunu tetiklemektedir. Bu ajanlar varlığında epitel hücrelerin DNA sentezine uğramaları ise mutasyon riskini artırmaktadır (De Marzo ve ark., 2007). Adından da anlaşılacağı gibi PIA lezyonları kronik enflamasyona yanıt olarak gerçekleşen hızlı rejeneratif hücre proliferasyonu ile ilişkilidir (De Marzo ve ark., 2007). PIA lezyonları adenokarsinomların yakınında bulunmaktadır. GSTP1 promotörünün hipermetilasyonu gibi genetik değişiklikler normal prostat epitelini lezyonlara dönüştürmekte ve "PIN" olarak adlandırılmaktadır. PIN lezyonlarının iki derecesi vardır: Lezyonun görülme miktarına göre yüksek (HGPIN) veya düşük seviyeli (LGPIN) olarak sınıflandırılmaktadır. Yüksek-seviyeli PIN lezyonları, çoğu kez çok odaklı kanserler şeklinde görülmektedir (De Marzo ve ark., 2007; Hallstrom ve Laiho 2008). Prostat kanserleri hastalarında iki önemli evre görülmektedir. Birincisi androjen bağımlı prostat kanseri, ikincisi androjen bağımsız prostat kanseri olarak adlandırılmaktadır.

2.1.4. Prostat lezyonlarında sıklıkla mutasyonları görülen genler

2.1.4.1. Pten

Tümör baskılayıcı gen olan PTEN, prostat kanserlerinin çoğunda 10q23 kromozomal bölgesinde yer almaktadır. PTEN geni, fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfataz (PIP3) olan lipit fosfatazı kodlamaktadır (Hallostrom, 2007). Önemli sinyal iletim yolaklarını düzenleyen PTEN geninin kaybı metilasyon yoluyla gen susturulmasıyla veya mutasyonla olmaktadır PTEN geninde ki kayıp PIP3 birikimine neden olmaktadır ve buda AKT/PKB (ptotein kinaz B) sinyal yolaklarının aktivitesi

azalır. PTEN tümör baskılayıcı aktivitesi, hücre döngüsü tutulması, apoptozis ve migrasyon düzenlenmesiyle ilişkilendirilmiştir (Hallostrom, 2007).

2.1.4.2. C-myc

Birçok insan kanserinde aktive olan bir transkripsiyon faktörüdür. Hücre döngüsünün ilerlemesi ile DNA replikasyonunu uyarmaktadır (Dong, 2006). Kastrasyon-dirençli ve metastatik prostat kanserinde %90 oranında görülen kromozomal değişikliklerden biri de 8q kromozomunun kazanılmasıdır (Schultz ve ark., 2003; Simmons ve Horowitz., 2006).

2.1.4.3. P53

Hücre döngüsünün G1/G2 ve G2/M geçişlerinde anahtar düzenleyicisini kodlayan p53 DNA hasarı onarım genlerinin uyarılmasında da önemli rol oynamaktadır. DNA hasarı onarımı için hücre döngüsünü durdurucu ve hücreyi apoptoza götürücü yolakları aktive etmektedir. p53 geninde ki mutasyonların prostat kanserinin erken aşamalarında oluştuğu gözenmiştir (Simmons ve Horowitz., 2006).

2.1.4.4. Nkx3.1

8p21 kromozomunda lokalize bir gen olan NKX3.1 geni PIN lezyonları ve prostat tümörlerinin büyük bir çoğunluğu ile ilişkili olan heterozigotluğun kaybedilmesine neden olmaktadır. PIN lezyonlarının %50'si ve metastatik tümörlerin %80'ninde NKX3.1 ekspresyonu azalmakta ya da kaybolmaktadır (Song ve ark., 2009). Bu genin tek alelinin kaybı epitel hiperplazi oluşumu için yeterli olmaktadır (Abdulkadir ve ark., 2005).

2.1.4.5. Retinablastoma (Rb)

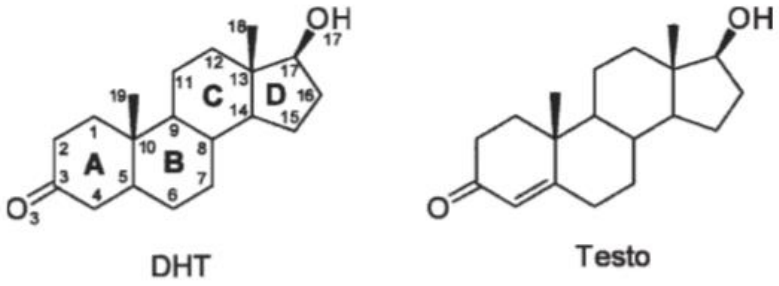
Prostat tümörlerinin %50'sinde görülen ve prostat kanserinde 2. sıklıkta görülmektedir. Rb, AR transkripsiyonunu artırma ve AR aktivitesinde düşüşe sebep

olan Rb-AR etkileşimini inhibe etme yeteneğine sahip olduğu gözlenmiştir. RB hücre döngüsünün G1 fazında ilerlemeyi durdurmakta ve S fazına geçişi engellemektedir. Bu nedenle hücre döngüsü kontrolünün kaybı çoklu kanser tipleriyle ilişkilidir. Rb fosforillenemediği zaman hücre döngüsünün ilerlemesini durdurmaktadır ancak Rb'nin siklin bağımlı kinazlar tarafından fosforilasyonu bu blokajı çözmektedir. pRb AR koaktivatörü olarak fonksiyon gösterir ve fosforillenmemiş Rb AR transkripsiyonunu arttırmaz. Normal prostatta Rb, normal hücresel döngünün devamlılığını sağlayabilmektedir (Porkka ve Vısakorpı, 2004).

2. 2. Androjen Sinyali

2. 2. 1. Androjen

Prostat dokusunun gelişimi, farklılaşması ve devamlılığının sürdürülmesi androjene, özellikle testosteron ve dihidrotestosterona bağlıdır (Şekil 2.6.). Testosteronun ve 5 kat daha yüksek afiniteye sahip olan 5α- redükte formu (DHT)' nun etkilerini gösterebilmek için nükleer streoid hormon reseptörü süper ailesinin bir üyesi olan AR ihtiyaçları vardır (Zıypak ve ark., 2001). DHT testosteronun aksine AR'den çok daha yavaş ayrılmakta ve degredasyona daha dirençli olan bir konformasyonu uyarmaktadır (Basu ve Tindall, 2010; Bennett ve ark., 2010; Feldman ve Feldman, 2001). Steroid yapısındaki bu hormonun kökeni testislerin interstisyel dokusundaki Leydig hücreleridir. Androjen aynı zamanda kollarda, ellerde ve yüzde kılların uzaması, kas sisteminde proteinlerin sentezlenmesi ve bünyeye katılması için uyarıda, kan yapımını etkileyerek kemiklerden kalsiyum, ve fosfor atılmasını önlemede hangi yaşta olursa olsun ses tonunun kalınlaşmasında da görev almaktadır. Androjen düzenleyici etkisini androjen reseptörü (AR) aracılığıyla gerçekleştirmektedir (Korkmaz ve ark., 2000).



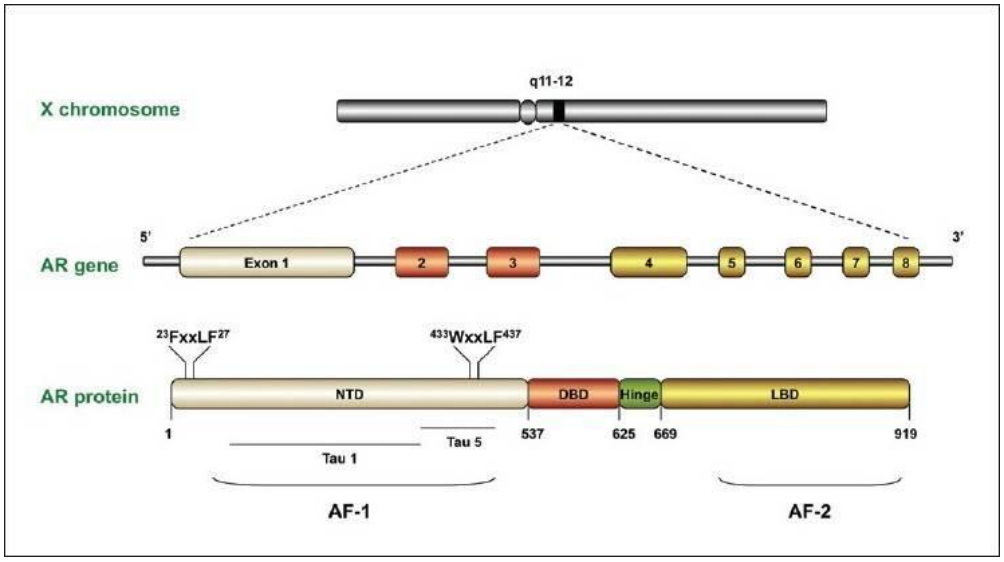
Şekil 2.6. Androjenlerin Yapısı: DHT; Dihidrotestosteron, Testo; Testosteron (Karine ve ark., 2006)

2.2.1.2. Androjen reseptörü (AR)

Androjen reseptörü (AR); NR3C4 (Nükleer reseptör ailesi 3' ün C grubunun 4. eleman) elemanıdır. AR, ligand-bağımlı transkripsiyon faktörü olarak rol oynayarak androjenlerin aktivitesine aracılık eden bir fosfoprotein olarak görev yapmaktadır. AR, ligand bağımlı bir transkripsiyon faktörüdür ve bazı özel genlerin ekspresyonunu kontrol eder. AR doğal ligandları olan testosteron, 5α-dihidrotestosterona (DHT) ergenlikten başlayarak, erkeklerin cinsel gelişimi ve farklılaşmasını, boyca büyümeyi, eklem kıkırdaklarının kaynaşmasını sağlamaktadır (Ellen ve ark., 2015).

2.2.1.3. Androjen reseptörünün yapısı ve aktivasyonu

AR' ü X kromozomunun uzun kolunda (q11-12) lokalize olmuştur ve 8 ekzondan oluşmaktadır (Langerak ve Russell, 2011). AR, 99 aminoasitten oluşmaktadır ve 110 kd. büyüklüğün de bir protein kodlamaktadır (Ellen, 2015). AR, diğer nükleer streoid hormon reseptörleri gibi 4 bölgeyi kapsamaktadır; (Şekil 2. 7.) NTD: N-terminal domaini, DBD: DNA bağlana domaini, LBD: Ligand bağlanma domaininden ve bağlantı bölgesi olan Hindge domaininden oluşmaktadır. AR fonksiyon için 3 domainde önemlidir ve DBD yüksek oranda korunmuştur (Ellen ve ark., 2015).



Şekil 2. 7. Androjen reseptörünün yapısı (Ellen ve ark., 2015)

N-Terminal Domaini (NTD); AR yarısından fazlasını oluşturmaktadır ve tamamı ekson 1 tarafından kodlanmaktadır. 1-537 aminoasitlerini kapsamaktadır. İnsan popülasyonun da NTD uzun polyglutamin (CAG) ve polyglisin (GGC) tekrarlarından oluşmaktadır. Biyokimyasal ve biyofiziksel olarak NTD deki Poly-Q tekrarının artmasıyla α sarmal yapısının arttığı, Poly-Q tekrarının azalmasıyla α sarmal yapısının azaldığı gösterilmiştir (Ellen ve ark., 2015). Transkripsiyonun düzgün olması için NTD' nin tam ve düzgün olması gerekmektedir. Transkripsiyonel aktivasyon birimi olan TAU-1 ve TAU-5 ve aktivasyon fonksiyonu AF-1' i kapsamaktadır. TAU-1 nükleer reseptör bölgesi içermektedir ve TAU-5 ise transkripsiyonel aktivitenin çoğundan sorumludur (Ellen ve ark., 2015). NTD reseptörün stoplazmadan çekirdeğe geçişini sağlayan transaktivasyondan sorumludur.

DNA Bağlanma Domaini (DBD); Ekzon 2 ve 3 tarafından kodlanmıştır. 537-625 aminoasitlerini kapsamaktadır. Steroid hormon reseptörleri arasında en yüksek oranda korunmuştur ve sistein bakımından zengin bir bölgedir (Ellen ve ark., 2015). DBD ve Hindge bölgesi nükleer lokalizasyon sinyali (NLS)' yi içermektedir ve bu sinyal sayesinde reseptörün stoplazmadan çekirdeğe geçişini sağlamaktadır (Zhou ve ark., 1994).

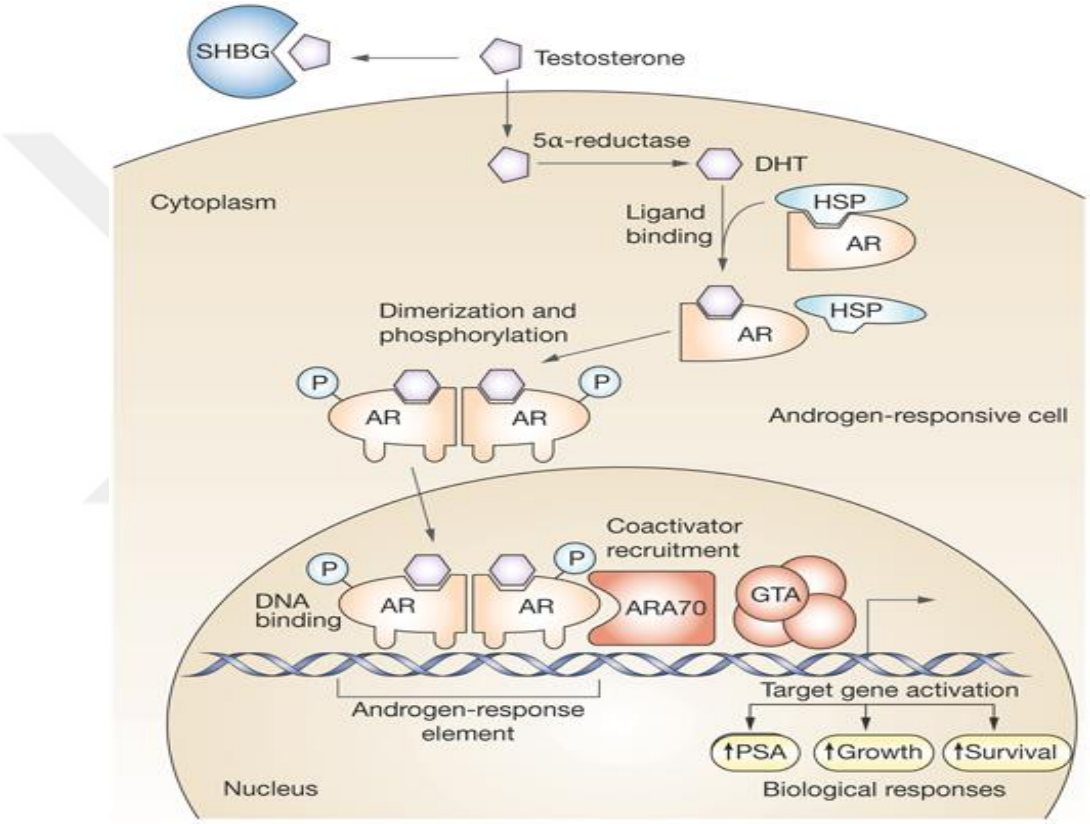
Hindge Bölgesi; Yaklaşık olarak 50 aminoasit içeren bu bölge DBD ve LBD' leri arasında yer almaktadır ve NES (Nükleer çıkış sinyali) sinyalinin bir kısmını içermektedir (Lonergan ve Donald., 2011). 625-669 aminoasitlerini kapsamaktadır.

Ligand Bağlanma Domaini (LBD); AR' nün 669-919 aminoasitlerini kapsamaktadır. Ligandların AR' ye bağlanması AR' nin şaperon proteininden (HSP70-HSP90) ayrılmasına neden olacak konformasyonel bir değişikliğe sebep olur (Lonergan, ve ark., 2011). Bu değişim AR' nin daha aktif bir forma dönüşmesini, çekirdeğe yönlenmesini ve homodimer hale geçip DNA' ya bağlanmasını sağlamaktadır. Nükleer aktivasyon fonksiyonu 2 (AF-2)' yi içermektedir (Ellen ve ark., 2015). Birçok Prostat kanserlerinde AR nokta mutasyonlarının birçoğu burada haritalanmıştır (Bevan ve ark., 1991).

2.2.1.4. Androjen reseptörünün aktivasyonu ve mekanizması

Testesteron, testisler tarafından salgılanan ve cinsiyet hormonu bağlayan globuline (SHBG) bağlı olarak kanda dolaşmaktadır. Serbest testosteron prostat hücresine girdiğinde 5α-redüktaz enzimi tarafından dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülmektedir. Ligand yokluğunda AR' ü sitoplazmada lokalize olmuştur ve DNA' ya bağlanmayı önleyecek bir şekilde ısı şok (Heat shock) proteinlerine (HSP90, HSP70 ve HSP56) şaperonlarına bağlı olarak inaktif durumdadır (Bennett ve ark., 2010; Grosmann ve ark., 2001). Ligandın bağlanması, AR' de bir konformasyonel değişikliği tetikleyerek ısı şoku proteinlerinden ayrılmasına ve hedef genlerin promotör bölgesindeki (Androjen tepki elementleri) ARE dizilerine bağlanarak AR homodimer kompleksinin oluşumunu kolaylaştırmaktadır. AR-AR dimerizasyonunun ardından reseptör çekirdeğe geçerek koregülatörler ile etkileşimine olanak sağlamaktadır (Grosmann ve ark., 2001). Çekirdeğe geçerek hedef genlerin spesifik dizilerine DBA ile bağlanan AR-ligand kompleksi hedef genlerin aktivasyonu ise hücre proliferasyonu, farklılaşma, apoptoz ve PSA üretimi gibi biyolojik yanıtlara yol açmakta dolayısıyla androjen reseptörü doku korunmasında ve homeostazisinde oldukça önemli rol oynamaktadır (Grosmann ve ark., 2001). (Şekil 2. 8.) AR' ne bağlanan ligandlar, AR-DNA komplekslerinin

kararlılığını ve transkripsiyonun miktarını belirlemektedir. Bağlı ligandın kaybedilmesi AR' nün yeniden hücre iskeleti proteinlerine bağlanacağı sitoplazmaya dönmesini düzenlemek için NES (Nükleere çıkış sinyali) fonksiyonuna olanak sağlamaktadır. AR protein seviyeleri proteozomal degredasyon yoluyla da kontrol edilmektedir. Sonuç olarak hücre korunmasında ve homeostazisinde AR hareketi ve transkripsiyon faktörü olarak rolü iyi bir şekilde kontrol edilmektedir (Grosmann ve ark., 2001).



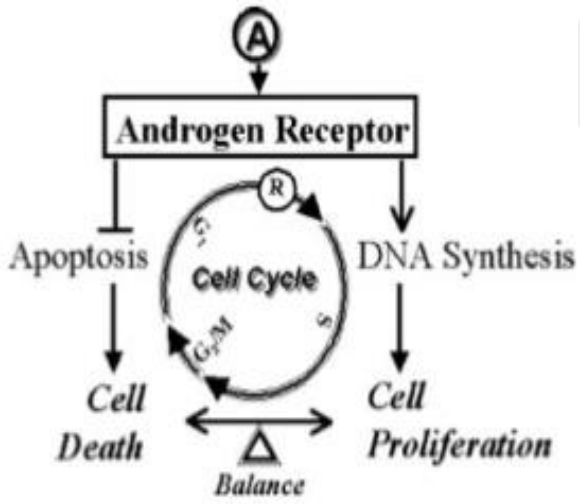
Şekil 2.8. Androjen Sinyal Mekanizması (Feldman ve Feldman, 2001)

2.2.1.5. Androjen-bağımlı prostat kanseri

Ligand bağımlı bir transkripsiyon faktörü olan AR'nün, prostat kanseri gelişimi ve ilerleyişi için büyük öneme sahip olduğu tanımlanmıştır. Androjenler prostat kanseri hücrelerinin poliferasyonunu aktive etmektedir ve AR inaktivasyonu prostat kanseri hücrelerinde DNA replikasyonunu ve sentez fazına geçişi engelleyerek hücre

ölümünü tetiklemektedir. Dolayısıyla azalan AR aktivitesi yaşamsal mekanizmaları zayıflatırken AR aktivitesinin artışı poliferasyona yol açmaktadır.

Bugün androjenler büyük ölçüde farmösötik ajanlar ile inhibe etmesine rağmen androjen yokluğunda PCa ile mücadelede en etkili terapötik araç olarak kalmıştır. PCa'nin çoğu, androjen deprivasyon tedavisinde dirençli hale gelir ve artık tümör hücrelerinin proliferasyon yolaklarının kontrolü ve aktivasyonu için androjene bağımlılığı ortadan kalkar. Androjen yokluğu terapisine cevap olarak başlangıçta gerileme gözlenmiş olsa bile hastalık genellikle zaman içerisinde geleneksel tedaviye yanıt vermeyen ve yüksek derecede agresif olan androjen bağımsız (hormon-refraktuvar) metastatik prostat kanserine geçişi gözlenmektedir (Feldman ve Feldman, 2001).



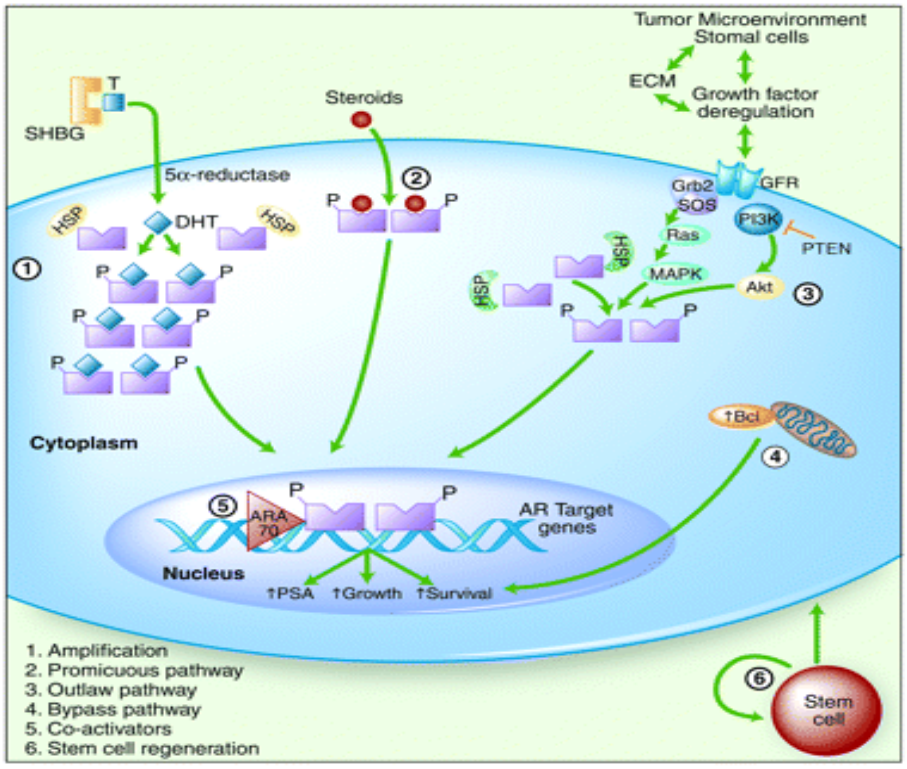
Şekil 2.9. Prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonu ve yaşayabilirliğinin regülasyonunda AR' nün hücre döngüsü bağımlı aktivitesi (Reddy ve ark., 2006)

2.2.1.6. Androjen-bağımsız prostat kanseri

Prostat kanserinin ikinci evresi olarak tanımlanan androjen-bağımsız (hormon refraktuvar) prostat kanserinin gelişimi için AR aktivitesinin regülasyonunun bozulması ile ilişkili olarak birçok model geliştirilmiştir (Grosmann, 2001). Bu modeller AR amplifikasyonu, ligand özgüllüğünde zayıflama, geleneksel olmayan

yolak, anti apoptotik moleküllerin seviyelerindeki artış, AR aktivitesini düzenleyen moleküllerin seviyelerindeki değişiklikler ve kanser kök hücreleri olarak isimlendirilebilmektedirler (Feldman ve Feldman, 2001).

Her bir mekanizma prostat kanseri hücrelerinin androjenlere cevap verme yeteneğini bağımsızlık veya aşırı duyarlılık şeklinde değiştirmektedir. Tüm bu mekanizmaların AR sinyal yolağının aktivasyonunun değişimi sonucu androjen ablasyon terapisi etkili olamamaktadır. Androjen bağımsızlığına geçişin açıklandığı mekanizmalar (Şekil 2. 9.) ki gibi tanımlanmaktadır.



Şekil 2.10. Androjen bağımlı prostat kanserinin androjen bağımsız prostat kanserine geçişini açıklayan mekanizmalar (Nelson, 2003)

Aşırı duyarlılık yolağı; AR'nün ligand bağlanma bölgesinde ki mutasyonlarda veya gen amplifikasyonu yoluyla daha fazla AR'nün üretilmesi tümör hücrelerinin düşük seviyelerde ki androjene karşı bile duyarlılığını arttırabilmektedir (Nelson ve ark., 2003; Feldman ve Feldman, 2001).

Özgül olmayan AR yolağı; AR mutasyonlarının büyük çoğunluğu C-terminal ligand bağlanma bölgesinde bulunmaktadır (Basu ve Tindall, 2010). Androjen reseptörünün ligand bağlanma bölgesindeki mutasyonlar steroid ya da antiandrojenlere cevap vermektedir.

Kural dışı davranış yolağı; Sitokinler veya peptit büyüme faktörleri ile ilgili düzenleyici yolaklardaki genlerin ekspresyonu ve fonksiyonlarında meydana gelen değişim AR'nün uygun olmayan biçimde aktivasyonuna yol açabilmektedir (Feldman ve Feldman, 2001).

Alternatif yolağı; PTEN inaktivasyonu, P53 mutasyonu veya BCL2 AR içermeyen yolaklar, AR veya ligand gerekliliğini önleyebilmektedirler (Grosmann ve ark., 2001).

Lurker yolağı; Androjen bağımlılığına karşı heterojen bir hücre karışımı içeren prostat kanseri androjen ablasyon terapisi öncesinde var olan androjen-bağımsız hücrelerin, tedavi sürecinde klonal seleksiyonu sonucu tümör yapısının androjen-bağımsız hale gelmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu malignan epitel hücrelerinin büyüme seleksiyonu androjen bağımsız PCa biçiminde tümörün yenilenmesine neden olmaktadır (Feldman ve Feldman, 2001).

2.3. Embryonal Fyn-associated Substrate (EFS)

Embrional Fyn-associated Substrate (EFS), SIN (Scr interacting veya sinyal interagting), CASS3, EFS2 ve HEFS olarakta bilinmekte olan Crk bağlantılı substrat (CAS) ailesinin bir üyesidir ve CAS ailesinin tüm üyelerinin karsinogenesiste çeşitli rolleri olduğu belirlenmiştir (Deneka ve ark., 2015). İlk olarak Ishio ve arkadaşları tarafından fare embriyonal cDNA kütüphanesi kullanılarak SH3 domaini ile etkileşebilen proteinleri ortaya çıkarmak amacıyla yapılan çalışmada belirlenmiştir (Ishino, 1995).

2.3.1. EFS'nin yapısı

İnsanlarda 561 aminoasit büyüklüğünde olan EFS geninin, Scr ve Fak gibi diğer proteinlerle bağlantılı olduğu ve hücre sinyalizasyonu için iskele proteini olarak yaptığı bilinmektedir. EFS aynı zamanda bağışıklık sistemi ve kanser gelişiminde rol oynamaktadır.

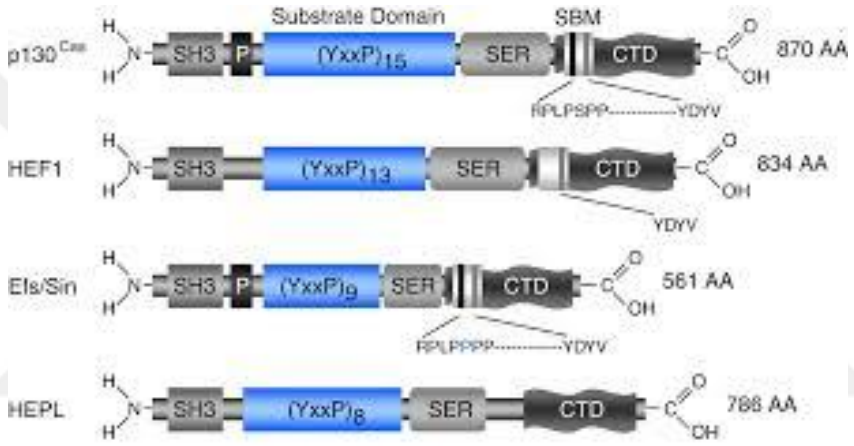
EFS, kromozom lokalizasyonu 14q11.2'dir. İnsanlarda bilinen 3 varyantı (izoformu) bulunmaktadır. İzoform 1; 561 aminoasitten oluşmaktadır ve 6 ekzonluk protein kodlamaktadır. İzoform 2; izoform 1'e oranla daha kısa bir protein kodlamaktadır. 468 aminoasitten oluşmaktadır ve 5 ekzondan oluşan bir protein kodlamaktadır. İzoform 3; diğer 2 izoforma oranla en küçük proteini kodlamaktadır. 392 aminoasitten oluşmaktadır ve 6 ekzondan oluşan bir protein kodlamaktadır.

EFS' nin transkripsiyonel regülasyonu hakkında çok az bilgi bulunmaktadır, ancak EFS' nin çeşitli transkripsiyonel regülatörlerle etkileşebileceği öne sürülmüştür. Bu transkripsiyonel regülatörler; ATF (Activating Tranckription factor), NF-Kβ/NF-Kβ1, GATA-3, Glukokorticoid receptor α/β ve p53' türler.

EFS'nin izoform 1 ve 2'nin farklı dokularda ve farklı seviyelerde ekspresyonları gözlenmektedir. Plesentada en yüksek seviyede ekspresyonlarıyla birlikte embriyonal merkezi sinir sistemi, kalp, testis, akciğer de ekspresyonu

görülmektedir (ncb16; Alexandropoulos, 1996). Ancak timüs ve lenfositlerde düşük ekspresyonu gözlenmektedir. EFS ile ilgili fonksiyonel çalışmalarda en iyi sonuçların bağışıklık sisteminde olduğu belirlenmiştir (Ishino, ve ark., 1997; Donlin ve ark., 2002). EFS'nin geç poliferatif faz endometrium eksplantlarında 17β-estradiol ve progesteron ile seviyesinin azaldığı belirlenmiştir (Donlin ve ark., 2005).

EFS, CAS (Crk-Associated Subsrate) ailesinin bir üyesidir. Cas ailesi insanlarda ve memeli hayvanlarda 4 üyeden oluşmaktadır. Bu üyeler; p130CAS/BRCA1, NEDD9/HEF, CASS4 ve EFS'dir (Danzl ve ark., 2010).



Şekil 2.11. CASS aile proteinlerinin şematik alanı yapısı ve fosforilasyon bölgeleri karşılaştırma (Kumbrink ve ark., 2011)

Cas protein ailesinin üyelerinde amino ucundan karboksi ucuna doğru birer adet; SH3/SRC, substrat domaini (SD), serince zengin (SER) ve karboksi terminal domaini (CTD) bölgelerinden oluşmaktadır. Bunlar dışında BCAR1 ve CAS3 proteinleri ortak olarak SH3 domaininden sonra birer adet prolince zengin bölge ve karboksi terminal domainde de Src bağlama motiflerini içermektedirler. SH3/SRC bölgesi CAS ailesi üyelerinde evrimsel olarak son derece korunmuştur ve prolin bakımdan zengin olup protein bağlanma bölgesidir ve insanlarda EFS geninde 5-68 aminoasitten oluşmaktadır (Alexandropoulos ve Baltimore, 1996). SH3 domaini Cas protein ailesinde %81 benzerlik göstermektedir. SH2 bölgesi; Tirozin, serin ve tironin fosforilasyonunca zengin bölgedir, belirli korunmuş dizileri ihtiva etmektedir ve sinyal proteinlerinin bağlandığı bölge olarak bilinmektedir (Dassen ve ark.,

2007). SH2 domaini, insan EFS geninde 74-372 aminoasitten oluşmaktadır ve tirozin fosforilasyonunca zengindir. Karboksi ucu serince zengin bir 4α heliks yapıdadır. FAT; Fokal adhezyon hedefleyen bölge, SRC; Src ailesi kinaz bağlanma bölgesi olarak isimlendirilmektedir.

2.3.2. EFS ve kanser

CAS familyası proteinleri ile yapılan birçok çalışmada kanserle ilişkileri gösterilmiştir. Bu çalışmalarda; EFS dışında ki her üç üyenin de ya doğrudan bilinen onkogenlere bağlandığı ya da hücrelerin maling transformasyonu ile ilişkili morfolojiyi kontrol ettikleri gösterilmiştir (Vuori ve Ruoslahtı, 1995; Law, 1996; Minegishi ve ark., 1996). Bu protain ailesini kodlayan genlerin ekspresyonlarındaki değişikliklerin meme kanseri ve melanoma metastazları ile agresif glioblastomanın invazyonu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Minegishi ve ark., 1996). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda prostat kanseri hücrelerinde EFS ekspresyonunun normal hücreler ile karşılaştırıldığında prostat kanseri hücrelerinde DNA metilasyonuna bağlı olarak azaldığı ve kanser hücrelerinde EFS overekspresyonunun sağlanmasının hücrelerin maling davranışlarını inhibe ettiği belirlenmiştir (Sertkaya ve ark., 2015).

Diğer taraftan endometriumda 17β-Estradiol ve progesteron hormonlarına cevap veren genlerin belirlenmesine yönelik olarak yapılan bir çalışmada EFS'nin çıkması bu genin hormonlarla uyarılabileceğini göstermektedir (Dassen ve ark., 2007). Yapılan bir mikroarray çalışmasında normalde androjen bağımlı olup uzun süre aktif karbon uygulanmış serumla beslenme sonucu androjen bağımsız hale getirilen prostat kanseri hücrelerinde EFS ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Marques, 2010).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

3.1.1. Materyal

- Sınıf II güvenlik kabini
- CO_2' li inkübatör
- İnvörted ışık mikroskobu
- pH metre
- Soğutmalı santrifüj
- Manyetik karıştırıcı
- 100 x 20 mm' lik hücre kültür kapları
- 60 x 15 mm' lik hücre kültür kapları
- 6 kuyucuklu hücre kültür kapları
- 2. 5- 5- 10- 25 ml hacimli steril pipetler
- 1- 10, 20- 200, 100- 1 000 µl' lik otomatik pipetler
- Pastör fırınında steril edilmiş pastör pipetleri
- 15 ve 50 ml' lik falkon tüpleri
- Pipet uçları
- Eppendorf tüpler
- Tripsin-EDTA
- DMSO
- Hücre ortamı; RPMI 1640
- Fötal dana serumu (FBS)
- Penisilin/streptomisin
- L- Glutamin
- Hemositometre
- Aktif karbon
- LY294002

- PD59058
- DHT (Dihidrotestosteron)
- % 0. 4 Tripan mavisi solüsyonu
- Fosfat tamponu (PBS/Phosphate Bufferred Saline)

Bu tez çalışmasındaki deneylerde ATCC'den temin edilen 2 adet prostat hücre hattı kullanılmıştır.

- LNCaP (İnsan prostat karsinomu lenf nodu metastazı hücre hattı)
- PNT1-a (İnsan normal prostat hücresi)

3.1.2. Yöntem

3.1.2.1. Hücrelerin bakımı

Hücrelerin besin gereksinimlerini karşılamak amacı ile % 10 FBS, % 1 penisilin/streptomisin, % 1 L-glutamin içeren RPMI 1640 besi ortamı kullanıldı. Yüzeye bağımlı hücreler yetiştirilirken yüzeyi tamamen kaplayıncaya kadar rutin olarak 2 günde bir ortamları steril cam pastör pipeti yardımı ile çekildi ve hücrelerin üzerine taze ortam eklenerek değiştirildi. Hücreler, 100 x 20 mm' lik veya 60 x 15 mm' lik hücre kültürü kaplarında 37ºC' de % 5 CO_2' li inkübatörde büyütüldü. Hücreler tüm yüzeyi kaplayacak kadar çoğaldıklarında ise pasajlandılar.

3.1.2.2. Hücrelerin pasajlanması

Hücreler yetiştirilirken tüm yüzeyi kaplayacak kadar çoğaldıklarında, yüzeye bağımlı hücrelerin ortamı steril cam pastör pipeti yardımı ile çekildi. Hücre kültürünün yüzeyi tripsin muamelesinin etkisini arttırmak amacı ile Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen steril 1XPBS (1litre 1 X PBS; 8g NaCI, 0.2g KCI, 0. 24 g KH_2PO_4, 1.44 g NaH_2PO_4, pH; 7.4 otoklavlandı.) ile bir kez yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve 37ºC'de % 5 CO_2' li inkübatörde 1-2 dk hücreler yüzeyden ayrılıncaya dek bekletildi. Hücreler yüzeyden ayrılınca hücre

yoğunluğuna uygun hacimde taze ortam hücrelerin üzerine ilave edildi ve pipet yardımıyla homojenize edildi. Hücreler yeni kütür kabındaki ortamın üzerine yavaşça ilave edildi ve büyümeleri için 37ºC' de % 5 CO_2' li inkübatöre yerleştirildi.

3.1.2.3. Hücrelerin dondurulması ve çözdürülmesi

Hücrelerin kısa ve uzun süreli stoklanması için en uygun yöntem -86ºC veya -196ºC'nin altında dondurulması işlemidir. Dondurulan hücreler uzun süre özelliklerinde herhangi bir değişim meydana gelmeden korunmuş olur. Dondurma işleminde hücreleri donma işlemindeki olumsuzluklardan korumak amacıyla DMSO (dimetilsülfoit) gibi kriyoprotektan ajanlar kullanılmaktadır. Hücre kültüründe pasajlama işlemi gerçekleştirilen hücreler, hücre kültürü kabına aktarılmadan % 10 FBS içeren taze hücre ortamı içerisindeki hücrelerin üzerine % 5 DMSO eklendi ve 1 ml hacimde kriyotüplere aktarılarak -86ºC' ye veya -190ºC sıvı azota kaldırıldı. Çözdürülecek olan hücreler -86ºC veya -190ºC'de olan hücreler dondurucudan çıkarılır çıkarılmaz 37ºC su banyosunda çözülene kadar bekletildi. Ardından hücreler hücre kültür kabındaki 37ºC'ye ısıtılmış 8 ml ortamın üzerine dikkatlice ilave edildi ve büyümeleri için 37ºC' de % 5 CO_2' li inkübatöre yerleştirildi.

3.1.2.4. Hücre sayımı

Hücre pasajlama işlemi yapılırken; hücre süspansiyonunun miktarını belirlemek ve yeni kültüre istenen miktarda hücre alabilmek amacıyla hemositometrede hücre sayımı yapıldı. Sayım için hücre süspansiyonundan 10 µl alındı ve tripan mavisiyle 100 µl' ye tamamlandı. Hemositometre üzerine bir lamel koyuldu ve homojenize edilen karışımdan pipet yardımıyla hemositometre ve lamel arasına kenardan yavaşça yayıldı. Hemositometre üzerinde yer alan 9 büyük kare içindeki hücreler sayıldı. Milimetredeki hücre sayısını (hücresayısı/ml) belirlemek için aşağıdaki formülden yararlanıldı.

Hücre sayısı/ml = ((Sayılan hücre miktarı X Dilüsyon oranı (10)) X 104) / 9.

3.1.2.5. Serum yoksunluğu ve madde uygulamaları

Öncelikle aktif karbon (Charcoal treated) ile muamele edilmiş fötal dana serumu (CT-FBS; Charcoal treated- FBS) hazırlandı; Fötal dana serumu içerisine % 3 oranında aktif karbon ilave edildi. Gece boyu +4ºC' de karıştırılarak inkübe edildi. Süpernatant tamamen berraklaşıncaya kadar birkaç kez 4 000 rpm' de 10 dk santrüfüj edildi. Elde edilen süpernatant filtrelenerek -20ºC' ye kaldırıldı.

Bu aşamada; LNCaP hücrelerini androjen uygulamasından önce büyüme faktörlerinden yoksun bırakmak için hücreler karbon ile muamele edilmiş FBS içeren RPMI 1640 ortamı içerisinde büyütüldü. Pasajlama işleminden sonra hücreler bir kez 1XPBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler % 2 CT-FBS ortamına alınarak 37ºC' de % 5 CO_2' li inkübatörde 48 saat inkübe edildi. Ardından hücreler %0,5 CT-FBS ortamına alınarak 37ºC' de % 5 CO_2' li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Son olarak hücrelere 10 nM DHT uygulaması yapıldı.

3.2. Hücre Poliferasyonunun Ölçülmesi

3.2.1. Materyal

- CO_2' li inkübatör
- Sınıf II güvenlik kabini
- İnvöted ışık mikroskobu
- Hücre ortamı; RPMI 1640
- 24 kuyucuklu kültür kapları
- 100 X 20 mm' lik kültür kapları
- 60 X 15 mm' lik kültür kapları
- Tripsin-EDTA
- FBS (Fötal dana serumu)
- L-glutamin
- Penisilin/Streptomisin

- Hemositometre
- PBS (Fosfat tamponu)
- % 0.4 Tripan mavisi solüsyonu
- Eppendof tüpler
- 1-10, 20-200, 100-1 000 µl' lik pipetler
- Steril pastör pipetleri
- Pipet uçları

3.2.1.1. Yöntem

Hücreler pasajlanma işleminin ardından hemositometre ile sayıldı ve 24' lük platelere her kuyucuğa 50 000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ekim işleminin ardından (4 saat) belirlenen dozlarda madde uygulaması yapıldı (24- 48- 72 saat). Madde uygulaması süresinin ardından platelerin her kuyucuğu tek tek tripsinize edildi ve hücreler tripan mavisi ile boyanarak ölü ve canlı hücreler sayıldı. Sayımın ardından veriler Mikrosoft Excell programı aracılığıyla grafiğe döküldü.

3.3. Plazmid İzolasyonu

3.3.1. Materyal

- Spektrofotometre
- Plazmid izolasyon kiti
- Ampisilin
- Kanamisin
- Santrifüj
- Çalkalamalı inkübatör
- LB besiyeri
- 1- 10, 20- 200, 100- 1 000 µl' lik pipetler
- Eppendorf tüpler
- Pipet uçları

- 15 ml' lik ve 50 ml' lik falkon tüpler
- İzopropanol
- % 70 ethanol

3.3.2. Yöntem

Plazmid izolasyonu yapmak için; 2 ml 100 µg/ml ampisilin içeren LB besiyeri içerisine EFS konstraktından meydana gelen gliserol stoktan öze yardımıyla sürüntü örnek alınarak inokülasyon yapıldı. Çalkalamalı inkübatörde 2 saat boyunca 37ºC' de 180 rpm'de büyütülen hücrelerden öze yardımıyla 100 µg/ml ampisilin içeren LB-agar petrilerine çizgi ekim yapıldı. Çizgi ekim yapılan LB-agar petrileri gece boyu 37ºC' de inkübe edildi. 24 saat sonra oluşan kolonilerden biri alınarak 100 µg/ml ampisilin içeren 2 ml LB ortam içerisinde inoküle edildi ve 2 saat 37ºC' de 180 rpm' de inkübe edilen hücrelerden 1ml alınarak 100 µg/ml ampisilin içeren 100 ml LB ortam içerisinde 37ºC'de 180 rpm' de inoküle edildi. Gece boyu büyütülen hücreler +4ºC' de 600 g' de 15dk yapılan santrifüjle çöktürüldü. Çöktürülen hücrelerden plazmid izolasyon kiti yardımıyla plazmidler izole edildi. Spektrofotometre ile plazmidlerin saflıkları ve miktarları ölçüldü.

3.4. Transfeksiyon

3.4.1. Materyal

- pcDNA 3.1-C-HA-EFS
- pEGFP- C1- AR
- M- Venüs- N1
- ppm- C- HA- EFS
- EFS siRNA
- AR siRNA
- Tripsin-EDTA
- Hücre ortamı; RPMI 1640
- Fötal dana serumu (FBS)

- Penisilin/streptomisin
- L-glutamin
- 1 X PBS
- Metafectan veya Fugene HD
- 1- 10, 20- 200, 100- 1 000 µl' lik pipetler
- Eppendorf tüpler
- Steril pipet uçları

3.4.2. Yöntem

3.4.2.1. EFS ve AR konstraktlarının transfeksiyonu

60 x 15 mm hücre kültür kaplarına pasajlanan ve % 50-80 yoğunluğa ulaşan hücreler (LNCaP) transfeksiyondan 2 saat önce 1 defa PBS ile yıkanır ve serum içermeyen 1.5 ml ortama alındı. 2 saatin sonunda 2 farklı eppendorfa serum içermeyen 50 µl ortama içine 3 µl FUGENE HD transfeksiyon reaktifi (Fugene: DNA= 3:1) ve 2. eppendorfa ise 1 µg DNA konuldu. Sonrasında 2. tüpteki DNA alınarak 1. Tüpteki eppendorfa yavaşça aktarıldı ve 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. Toplam 100 µl hacimde hazırlanan transfeksiyon solüsyonu hücreler üzerine damla damla damlatıldı. Hücreler 37ºC' de 4 saat inkübe edilen hücreler 4 saatin sonunda hücrelerin ortamı çekilerek 1 ml PBS ile hücreler yıkandı. Hücrelerin üzerine taze ortam eklenerek hücreler 37ºC' de % 5 CO_2 24 saat inkübasyona bırakıldı.

3.4.2.2. Sirna transfeksiyonu

Ektopik ekspresyon transfeksiyonlarında olduğu gibi siRNA transfeksiyonunda da hücreler 2 saat öncesinde 1 defa PBS ile yıkandıktan sonra serum içermeyen 1.5 ml ortama alındı. 2 saatin sonunda 60 x 15 mm hücre kültürü kaplarında ki hücreler için 1. eppendorf tüpüne 100 µl serum içermeyen besi ortamı konuldu ve üzerine 5 µl Fugene HD eklendi. 2. eppendorf tüpe ise 100 µl serum içermeyen besi ortamı içerisine 2 µl siRNA konuldu. En son 2. tüpteki siRNA alınarak 1. tüpteki ortam üzerine yavaşça bırakıldı ve 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 15 dk' nın sonunda

toplamda 200 µl hazırlanan transfeksiyon solüsyonu damla damla damlatıldı ve hücreler 4 saat 37ºC' de % 5 CO_2' de inkübe edildi. 4 saatin sonunda hücrelerin ortamı çekildi ve hücreler 1 ml PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerine taze besi ortamı eklenerek hücreler 37ºC' de % 5 CO_2' de 48 saat inkübasyona bırakıdı.

3.5. İmmünofloresan

3.5.1. Materyal

- Flöresan mikroskop
- 22 x 22mm No:1 lamel
- % 100 soğuk Methanol
- % 1 BSA içeren PBS
- % 0.2 Triton X- 100 içeren PBS
- % 70- 100 EtOH
- 1 X PBS
- EFS ekspresyon konstraktı
- AR ekspresyon konstraktı
- DHT
- AR (D6F11) XPm primer antikoru
- EFS polyclonal primer antikoru
- Anti-mause IgG (Invitrogen Molecular Probes, Alexa flour 594)
- Anti-rabbit IgG (Invitrogen Molecular Probes, Alexa flour 488)
- 0.25 µg/ml DAPI
- 1- 10, 20- 200, 100- 1 000 µl' lik pipetler
- Steril pipet uçları

3.5.2. Yöntem

3.5.2.1. Hücrelerin hazırlanması

Lamellerin sterilizasyonu için öncelikle lameller % 70 EtOH içerisinde bekletildi. Ardından steril kabin içerisinde lameller kağıt mendil üzerine bırakıldı ve kuruyan lameller 6 kuyucuklu kültür kaplarına yavaşça yerleştirildi. Hücreler 3'er ml ortam içerisinde % 50-60 yoğunluk olacak şekilde içerisinde lamel olan kültür kaplarına pasajlandı ve 37ºC' de % 5 CO_2' de 24 saat inkübe edildi. Hücrelere ardından deney seti tasarımına uygun şekilde transfksiyon veya madde uygulaması yapıldı.

3.5.2.2. Fiksasyon ve bloklama

İnkübasyonun ardından hücrelerin ortamı uzaklaştırılır ve hücreler 1 ml PBS ile yıkandı. % 100 soğuk methanol de gece boyu -20ºC' de fiksasyona bırakıldı. Ertesi gün methanolü uzaklaştırmak amacıyla hücreler 1 ml 1 X PBS ile 4-5 defa yıkanır. Hücreler % 0.2 Triton X- 100 ile oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 5dk inkübe edildi. Hücreler 1 ml 1 X PBS ile yıkanır ardından % 1 BSA içeren PBS ile bloklama amacıyla oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi ve bloklama solüsyonunu uzaklaştırmak amacıyla 1 ml 1 X PBS ile hücreler yıkanır.

3.5.2.3. Primer antikor İşaretlemesi

% 1 BSA içeren PBS içerisinde hazırlanan primer antikor (miktarlar antikorun optimizasyonuna göre ayarlanmaktadır.) her lamele 50 µl olacak şekilde damlatıldı ve lamellerin üzerini kaplayacak boyutta parafilm ile kapatılarak 37ºC' de 60 dk inkübe edildi. 60 dk' nın sonunda parafilmler uzaklaştırılarak hücreler 4-5 defa 1 ml 1 X PBS ile yıkandı.

3.5.2.4. Sekonder antikor işaretlemesi

Sekonder antikor işaretlemesi ve sonrasındaki aşamalarda hücrelerin ışık görmesi engellenerek yapıldı. % 1 BSA içeren 1 X PBS içerisinde hazırlanan sekonder antikor her lamele 50 µl olacak şekilde damlatıldı ve lamellerin üzerini kaplayacak boyutta parafilm ile kapatılarak 37ºC' de 20 dk inkübe edildi. Ardından parafilmler uzaklaştırılarak hücreler 4-5 defa 1 ml 1 X PBS ile yıkandı. Lamellerin üzerine 1 ml % 70 EtOH eklendi ve +4ºC' de 5dk bekletildi. Hemen ardından lamellerin üzerine 1 ml % 100 EtOH eklendi ve oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde bekletildi 1-2 dk bekletildi.

3.5.2.5. DAPI ile boyama

Lameller % 100 ethanol içerisinden lanset yardımıyla dikkatlice çıkarılarak kağıt mendil üzerinde kurutuldu. Hücrelerin lamel üzerine tutunduğu yüzeye 0.25 µg/ml (Sadece DNA' ya bağlanan) DAPI' den 10 µl damlatılarak lamelle isimlendirilen lamların üzerine dikkatlice kapatıldı. Karanlık ortamda flöresan mikroskobunda inceleme yapıldı.

3.6. Western-Blot (İmmünoblotlama)

3.6.1. Materyal

- BCA assay kiti
- Proteaz inhibitörü
- Fosfataz inhibitörü
- 100 X NaF
- 100 X PMSF
- RİPA modified tamponu
  - 10 mM trizma baz (pH: 8.0)
  - 1 mM EDTA

  - 1 mM EGTA
  - 140 mM NaCI
  - % 1 triton X- 100
  - % 0.1 SDS
  - % 0.1 sodyum deoksikolat
- İzopropanol
- Methanol
- % 30 akrilamid
- Temed
- APS (amonyum persülfat sol)
- 4 X SDS-PAGE ayırma jel tamponu (pH: 8.8)
  - 3 M trizma baz (pH: 8.8)
  - % 4 SDS
- 4 X SDS-PAGE depolama jel tamponu (pH: 6.8)
  - 1 M trizma baz (pH: 6.8)
  - % 4 SDS
- Blok ısıtıcı
- Beta mercaptoethanol
- 10 X SDS- PAGE jel yürütme tamponu (1 litre)
  - 30 g trizma baz
  - 144 g glisin
  - 10 g SDS
  - SDS- PAGE yürütme tamponu 1 X olarak kullanıldı.
- 4 X yükleme tamponu
  - 0.4 mM EDTA
  - 40 mM trizma baz (pH:8.0)
  - % 4 SDS
  - % 20 gliserol
  - 200 µl brom fenol mavisi
- 10 X SDS-PAGE transfer tamponu
  - 30 g trizma baz

- 144 g glisin
- % 20 methanol
- SDS-PAGE transfer tamponu 1 X olarak kullanıldı.

- Ponceaus buffer
- BSA (Bowine serum albümin)
- Hepes
- Yağsız süt tozu
- 10 X TBS tamponu (pH: 7.4)
  - 70 g trizma baz
  - 12.1 g NaCI
  - TBS tamponu 1 X olarak kullanıldı. Kullanılırken % 0.1 Tween-20 ilave edildi.
- Anti-mause IgG horse radish peroxidase (HRP)
- Anti-rabbit IgG horse radish peroxidase (HRP)
- AR (D6F11) XPm primer antikoru
- EFS polyclonal primer antikoru
- PSA/KLK3 (D2A8) primer antikoru
- pERK (1/2) (phospho-p44/42 MAPK) primer antikoru
- pAKT (ser473) primer antikoru
- Beta-actin (8H10D10) primer antikoru
- pAR (ser213) (E-6)
- pAR (ser308) (156C1352)
- Lambda Protein Phosphatase (Lambda PP)
- Santrijüj
- Çalkalayıcı
- X-ray kaset
- Spektrofotometre
- Hücre kazıyıcı
- Fotoğraf film
- ECL PLUS kiti
- Dikey elektroforez sistemi

- Whatman kağıtları
- PVDF (Polyvinlidene flüoride) transefer membranı
- Poşet dosya
- Fixer
- Developper
- 1-10, 20-200, 100-1 000 µl' lik pipetler
- Eppendorf tüpler
- Steril pipet uçları

3.6.2. Yöntem

3.6.2.1. Hücrelerden protein izolasyonu

Western-blot yönteminde kullanılmak üzere hazırlanan hücrelerden RİPA modifiyed tamponu kullanılarak protein izole edildi. Protein izole edilecek olan hücreler ortamı içerisinde protein kazıyıcı yardımıyla kazındı ve 15ml' lik falkona alındı. Hücreler 1200 rpm' de 5 dk santrifüj edildi ve ortam uzaklaştırıldı. Falkonda ki hücrelerin üzerine içerisine fosfataz, proteaz, 100 X NaF ve 100 X PMSF eklendi ve her falkona 250 µl olacak şekilde dağıtıldı (60 X 15cm' lik kültür kapları için). Hücreler RİPA modified tamponu içerisinde çözülerek 1.5 ml' lik ependorfa alındı. Hücreler bu şekilde buz üzerinde 45dk bekletildi. Ardından 12 000 g' de 10 dk santrifüj edildi. Oluşan süpernatant yeni ependorfa alındı ve protein lizatları -86ºC' ye kaldırıldı.

3.6.2.2. Protein miktarının belirlenmesi

Hücrelerden izole edilen protein lizatlarının miktarlarını ölçmek için BCA assay kit kullanıldı. BCA assay kitinden her örnek başına 200 µl QA ve 4 µl QB olacak şekilde karışım hazırlandı ve vortekslendi. 96 kuyucuklu plate de her kuyucuğa 200 µl dağıtılan karışım içerisine 2.5 µl protein lizatı eklendi ve iyice karıştırıldı. 15 dk 37ºC' de inkübasyona bırakıldı. Ardından spektrofotometrede 562

nm' de absorbans ölçümleri yapıldı. Elde edilen absorbans değerleri referans değer ile normalize edildi ve proteinlerin miktarı µg/µl cinsinden belirlendi.

3.6.2.3. Proteinlerin sds-page ile ayrılması

Dikey elektroforezde jel dökme aparatının camları öncelikle su, etanol ve izopropanol ile silindi. Ardından camlar birleştirildi ve yüzdelik miktarına göre 5-10 ml ayırma jeli hazırlanarak iki cam arasına döküldü (Çizelge 3.1.).

Jelin düzgün donması için jel üzerine hemen izopropanol döküldü. Ayırma jeli donduktan sonra jelin üzerindeki izopropanol uzaklaştırıldı ve depolama jeli (5 ml) döküldü ve hemen ardından tarak yerleştirildi (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.1. Ayırma jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları

Ayırma jeli (10 ml)	% 6	% 8	% 10	% 12	% 15
dH_2O	5.4 ml	4.7 ml	4.1 ml	3.4 ml	2.4 ml
% 30 akrilamid	2 ml	2.7 ml	3.3 ml	4 ml	5 ml
4XAyırma jeli tamponu	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
% 10 APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Protein lizatlarının yükleme miktarına (50-100 µg) karşılık gelen hacimde protein ve üzerine 25 µl tamamlanacak kadar su eklendi hemen ardından 4 X yükleme tamponu eklendi. 4 X yükleme tamponu kullanılmadan önce gerekli hacimde 4 X yükleme tamponu içerisine % 10 oranında beta-mercaptoethanol eklenip kısa bir santrijüj yapıldı. Hazırlanan örnekler blok ısıtıcıda 95ºC' de 5 dk denatüre edildi. Hemen ardından buz üzerine alınan örnekler kısa bir santrifüjün ardından jele yüklendi. Jeldeki kuyucuklara yüklenen protein örnekleri 80 voltta jelin sonuna dek yürütüldü.

Çizelge 3.2. Depolama jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları

Depolama jeli	10ml	5 ml	2. 5ml
dH_2O	5.7 ml	2.85 ml	1.425 ml
% 30 akrilamid	1.7 ml	0.85 ml	0.425 ml
4XDepolama jeli tamponu	2.5 ml	1.25 ml	0.625 ml
% 10 APS	100 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

3.6.2.4. Protein örneklerinin SDS-PAGE jelden membrana transferi

Jelin sonuna kadar yürütülen örnekler western-blot sandviç aparatının içerisinde elektrik akımı yardımıyla membrana transefer işlemi gerçekleştirildi. 1 X Transfer buffer içerisinde sırasıyla bir sünger, whatman kağıdı, proteinlerin yürütüldüğü jel, PVDF membran, whatman kağıdı ve onunda üzerine sünger yerleştirilerek aparatın arasında hava kabarcığı kalmayacak şekilde hazırlandı ve transfer tankının içerisine yerleştirildi. Ancak PVDF membran yerleştirilmeden önce % 100 methanol içerisinde ıslatıldı. Transfer tankının içerisine 1 X Transfer buffer eklendi ve gece boyu +4ºC' de 90 mA' de transfere bırakıldı.

3.6.2.5. PVDF membrana primer antikor işaretlemesi

Gece boyu transfer işleminin ardından membran 1 X TBS-T ile yıkandıktan sonra transfer işleminin olduğundan emin olmak için ponceaus buffer ile boyandı. Ardından membrana 1 X TBS-T içerisinde hazırlanan % 5 süt tozu ile oda sıcaklığında 60 dk çalkalayıcı üzerinde bloklama yapıldı. Blokmanın hemen ardından memebran 1 X TBS-T ile 2 sefer yıkandı ve oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde primer antikor solüsyonunda 60 dk boyunca karıştırılarak işaretlendi. Primer antikor solüsyonu hazırlanırken % 0.5 süt tozu içeren veya % 5 BSA içeren 1 X TBS-T içerisinde hazırlandı. Primer antikor işaretlemesinin ardından membrana 1 X TBS-T ile 1 defa 15 dk ardından 3 defa 5 dk 'lık yıkamalar yapıldı.

3.6.2.6. PVDF membrana sekonder antikor işaretlemesi

Membrana primer antikor yıkamaları yapıldıktan sonra 1 X TBS-T içerisinde hazırlanmış HRP bağlı tavşan (rabbit) veya fare (mause) sekonder antikorları (1/10 000 veya 1/20 000 oranında) ile çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 60 dk işaretleme yapıldı. Sekonder antikor solüsyonu hazırlanırken %0.5 süt tozu içeren veya %5 BSA içeren 1 X TBS-T içerisinde hazırlandı. Sekonder antikor işaretlemesinin ardından membrana 1 X TBS-T ile 1 defa 15 dk ardından 3 defa 5 dk' lık yıkamalar yapıldı.

3.6.2.7. Bantların görüntülenmesi

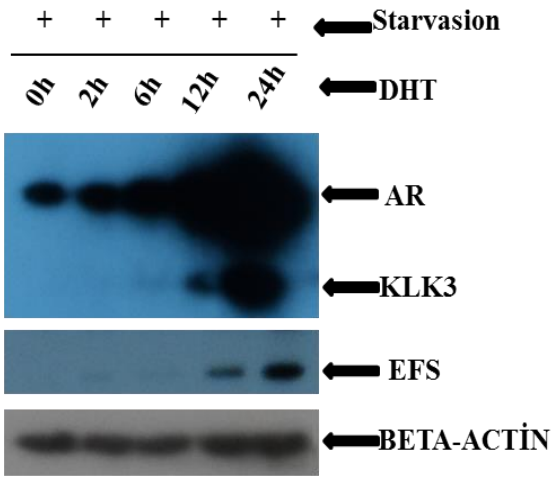
Antikor işaretlemelerinin ardından PVDF membran üzerine karanlık odada ECL-PLUS kiti solüsyonlarından (A ve B) 1:1 oranında 2 ml döküldü ve membran 5 dk boyunca yavaşça karıştırılarak inkübe edildi. 5 dk ardından membran X-ray kaset içerisine yerleştirilen poşet dosya arasına yerleştirildi. Membran üzerine film konularak farklı sürelerde pozlamalar alındı. Pozlama sonrasında filmler en az 2 dk developper ve ardından 5 dk fixer solüsyonunda bekletilerek bantların film üzerinde görüntülenmesi sağlandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

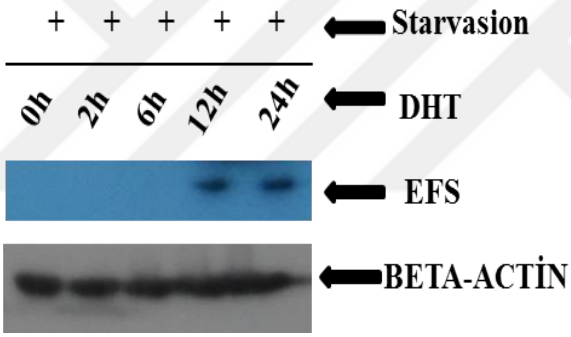
4.1. Androjenin EFS Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Prostat kanserinin androjen bağımlı hücresi olan LNCaP hücrelerine androjenin EFS üzerine etkilerini araştırmak için western-blot yöntemi kullanılmıştır. EFS androjenle uyarılan bir gen bir gen olabileceğinden ve androjenlerde etkisini androjen reseptörü (AR) aracılığı ile gösterdiği için LNCaP hücrelerine AR aktivite manipülasyonları yapılarak EFS'nin seviyesel değişimleri araştırıldı (Şekil 4.1.). Aynı deney seti PNT1-a hücrelerinde de kuruldu (Şekil 4.2.). İlk olarak AR antogonistiği olan Bicalutamide (Bic) (10 μM) kullanıldı (Şekil 4.3.). Dihidrotestosteron (DHT) varlığında ve yokluğunda Bic etkisine bakıldı. Hücrelere DHT verilmeyen koşullarda EFS'nin seviyesinin azaldığı ve DHT verilen koşullarda yine EFS seviyesinde bir azalma olduğu gözlendi. Sonuçların prostat kanserinin biyobelirteci olan PSA seviyesi ile kolerasyon içerisinde benzer bir değişim hareketine sahip olduğu görüldü. Hücreler içerisindeki mevcut AR seviyesi siRNA aracılıklı olarak azaltılması sonrasında EFS değişimlerine bakıldı ve AR' nün siRNA aracılıklı olarak EFS seviyesini ciddi olarak azaldığı görüldü. Ancak DHT varlığında EFS seviyesindeki azalmanın kısmen tolere edildiği görüldü.

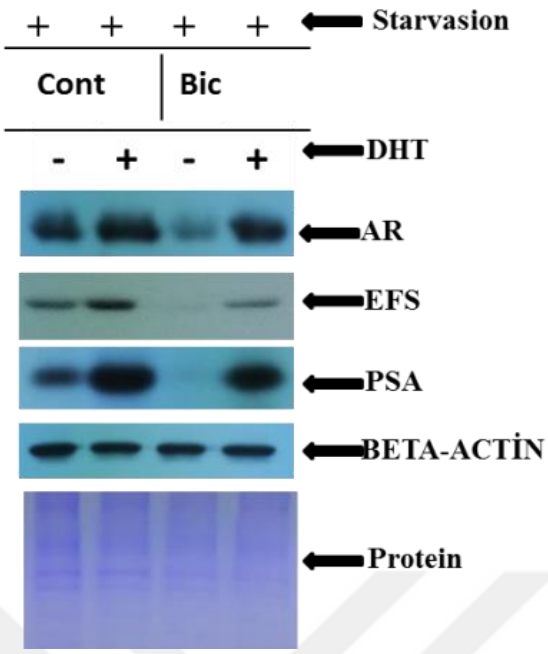
Hücrelerde AR' nün siRNA aracılıklı olarak susturulduğu koşullarda EFS seviyesinde azalma gözlenirken DHT varlığında EFS seviyesinde azalmanın kontrol hücrelerine göre azaldığı gözlense de DHT olmayan koşullara göre bu etki azalmamaktadır. Bu durum bize EFS' nin farklı mekanizmalar tarafından kontrol edilebileceğini göstermektedir (Şekil 4.4.).



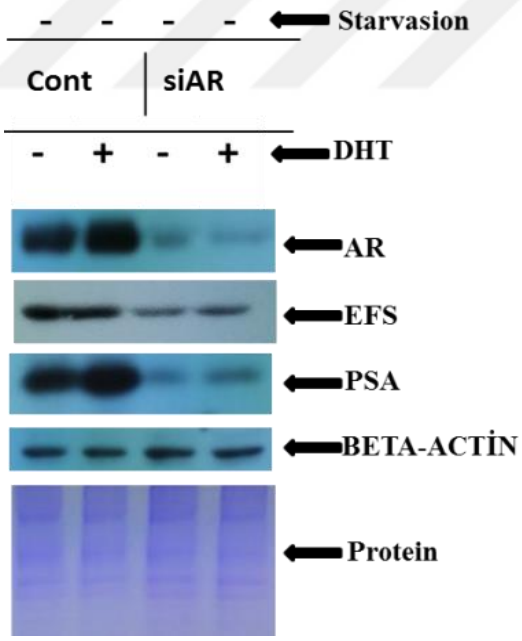
Şekil 4.1. LNCaP hücrelerinde serum yoksunluğu uygulamasının ardından 0- 2- 6- 12- 24 saatlik DHT uygulamasının ardından elde edilen protein lizatlarından western-blot yöntemi kullanılarak EFS seviyesine bakıldı (0h hücrelere herhangi bir madde uygulanmamıştır)



Şekil 4.2. PNT1a hücrelerinde serum yoksunluğu uygulamasının ardından 0- 2- 6- 12- 24 saatlik DHT uygulamasının ardından elde edilen protein lizatlarından western-blot yöntemi kullanılarak EFS seviyesine bakıldı (0h hücrelere herhangi bir madde uygulanmamıştır)



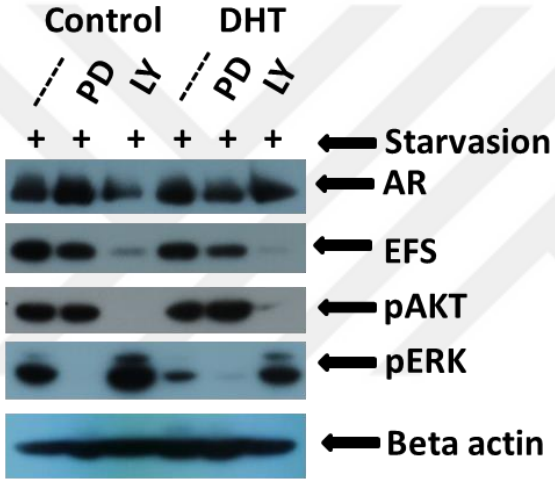
Şekil 4.3. LNCaP hücrelerine serum yoksunluğu uygulamasının ardından hücrelere bicalatumide (10 μM) madde uygulaması yapıldı 2 saat ardından 24 saat DHT (10 μM) madde uygulaması yapıldı ve hücrelerden elde edilen protein lizatlarına western-blot yöntemi kullanılarak AR ve EFS seviyelerine bakıldı.



Şekil 4.4. LNCaP hücrelerinde var olan AR' nün siRNA ile susturulmasının ardından 24 saatlik madde uygulaması yapıldı ve hücrelerden elde edilen protein lizatları western-blot yöntemi kullanılarak AR ve EFS seviyelerine bakıldı (kontrol hücrelerine hiçbir madde uygulanmadı)

4.2. EFS' nin Farklı Mekanizmalar Tarafından Kontrolünün Araştırılması

EFS' nin farklı mekanizmalar tarafından kontrol edilebileceğine değinmiştik. Yaptığımız deneyler doğrultusunda hücrelere PI3K/AKT sinyal yolağı inhibitörü olan LY294002 (25 mM) ve MAPK/ERK sinyal yolağı inhibitörü olan PD59058 (20 mM) verilerek sinyal yolaklarının aktivitesine bakıldı (Şekil 4.5.). Hücrelere DHT verilmiş koşullarda PI3K/AKT sinyal yolağının inhibe edildiğinde EFS seviyesinde ciddi bir düşüş gözlendi. Buda EFS' nin aynı zamanda PI3K/AKT sinyal yolağı tarafından kontrol edildiğini göstermektedir.



Şekil 4.5. LNCaP hücrelerine serum yoksunluğu uygulamasının ardından PD59058 ve LY294002 madde uygulaması yapıldı 2 saat sonra hücrelere 24 saatlik DHT madde uygulaması yapıldı ve hücrelerden elde edilen protein lizatları western-blot yöntemi kullanılarak AR ve EFS seviyelerine bakıldı (kontrol hücrelerine hiçbir madde uygulanmadı)

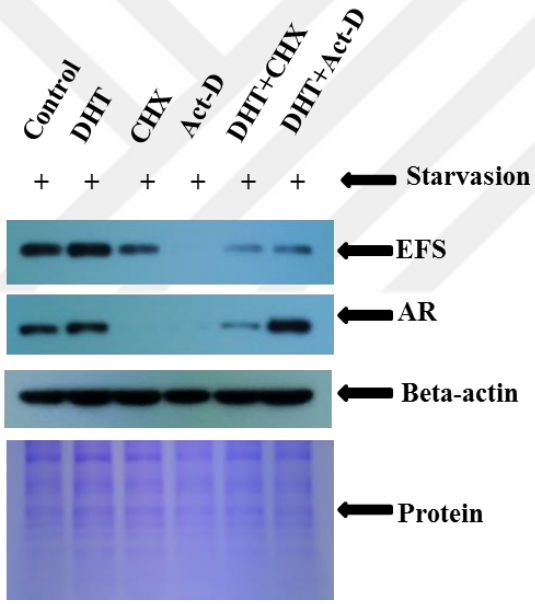
4.3. EFS' nin Androjen ile Seviyesel Artışının RNA Düzeyinde veya Protein Düzeyinde Oluşunun Belirlenmesi

EFS'nin androjen ile seviyesel olarak arttığını belirledik. Ancak bu artışın RNA düzeyinde mi ya da protein düzeyinde bir artış olduğunu belirlemek için hücrelere genel protein sentezi inhibitörü Cycloheximide (CHX) ve genel mRNA sentezi inhibitörü olan Actinomissin-D (Act-D) 24 saat DHT varlığında ve yokluğunda uygulandı (Şekil 4.6.). Hücrelerde protein sentezi inhibe edildiği zaman

EFS seviyesinde bir azalma görülse de bu azalma çokta ciddi bir azalma değildir. Buda bize EFS' nin protein stabilitesinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Hücrelerde mRNA sentezi inhibe edildiği zaman EFS' nin tamamen ortadan kalktığı gözlenmiştir. Buda EFS' nin hücre içerisinde ki seviyesinin temel olarak RNA seviyesi üzerinden kontrol edildiğini göstermektedir.

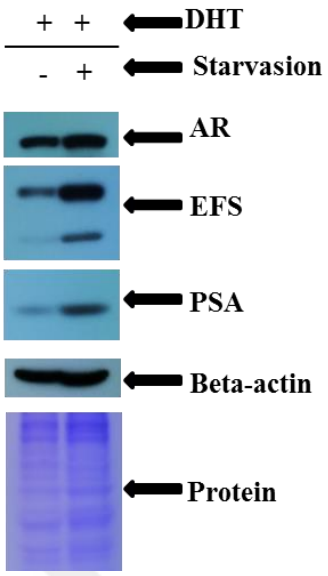
Hücrelere DHT verildiği koşullarda EFS seviyesi artarken hem protein sentezi seviyesi inhibe edildiğinde hem de mRNA seviyesi inhibe edildiğinde EFS seviyesinde bir azalma gözlendi. Buda EFS' nin seviyesel azalmasının doğrudan RNA üzerinden olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.6. LNCaP hücrelerine serum yoksunluğu uygulamasının ardından Act-D ve CHX madde uygulamasının sonrasında DHT uygulanan hücrelere 24 saat DHT uygulaması yapıldı hücrelerden elde edilen protein lizatları western-blot yöntemi kullanılarak AR ve EFS seviyelerine bakıldı (kontrol hücrelerine hiçbir madde uygulanmadı)

4.4. Serum Yoksunluğunda EFS Seviyesinin Araştırılması

Hücrelerde CT-FBS ile serum yoksunluğu 24 saat DHT uygulamasının ardından EFS seviyesine bakıldı. Serum yoksunluğunda EFS seviyesinde ciddi bir artış olduğu gözlendi (Şekil 4.7.).

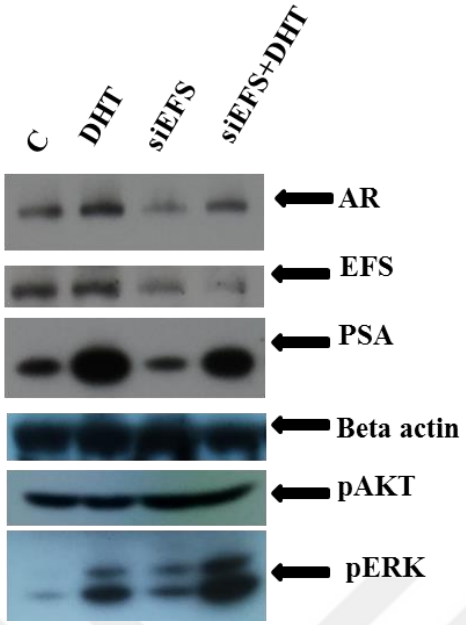


Şekil 4.7. LNCaP hücrelerinden birine serum yoksunluğu uygulanırken diğer hücre normal FBS'li ortam ile beslendi ve ardından hücrelere 24 saat DHT madde uygulaması yapıldı hücrelerde AR ve EFS seviyelerinin serum yoksunluğu olan ve olmayan hücrelerdeki değişimine bakıldı

4.5. EFS' nin AR Seviyesi ve Transaktivasyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması

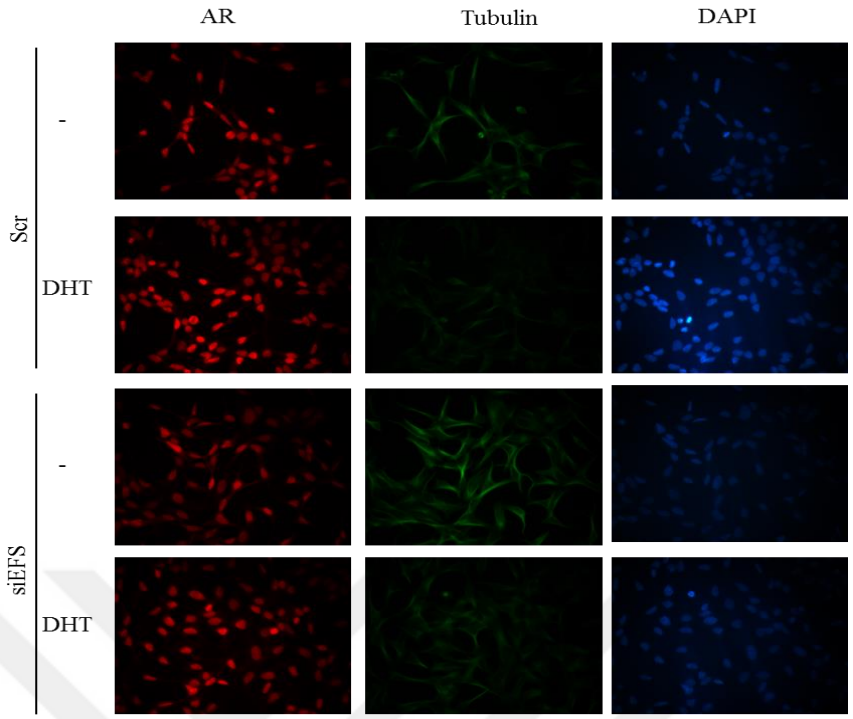
Hücrelerde EFS siRNA aracılıklı olarak susturulduğunda DHT yokluğunda AR seviyesinde bir azalma meydana geldiği gözlendi. Ancak siEFS+DHT varlığında her ne kadar siEFS' nin DHT yokluğunda EFS seviyesi artmış olsa da hücrelere DHT verildiği zamanki EFS seviyesine oranla bir azalma gözlenmiştir. Bu PSA ile kolerasyon içerisindedir (Şekil 4.8.).

Şimdiye kadar elde edilen verilerde Western-Blot yöntemiyle total hücrelerde ki elde edilen verilerden gösterildi. Bunun doğrultusunda tek bir hücre içerisinde ki EFS seviyesine bakmak için immunofloresan mikroskobisi yapıldı. EFS' nin siRNA aracılıklı olarak susturulduğu hücrelere DHT uygulaması yapıldı. Hücrelerde AR' nün gerek seviyesel gerekse hücre içerisindeki lokalizasyonu araştırıldı. Yapılan incelemelerde elde edilen sonuçların Western-Blot sonuçları ile uyumlu olduğu gözlendi.



Şekil 4.8. LNCaP hücrelerinde var olan EFS siRNA aracılığı ile susturularak 24 saatlik DHT uygulaması yapıldı ardından hücrelerden protein lizatı elde edilerek western-blot yöntemi kullanılarak AR ve EFS seviyelerine bakıldı (kontrol hücrelerine hiçbir madde uygulanmadı)

EFS' nin DHT olmayan koşullarda AR seviyesinde azalma olduğu gözlendi. Ancak EFS' nin siEFS aracılıklı olarak susturulduğunda AR' nün stoplazmada biraz daha difüz yoğunlukta olduğu görüldü. siEFS+DHT varlığında bile bu difüzlüğün varlığı halen dikkat çekmektedir (Şekil 4.9.).

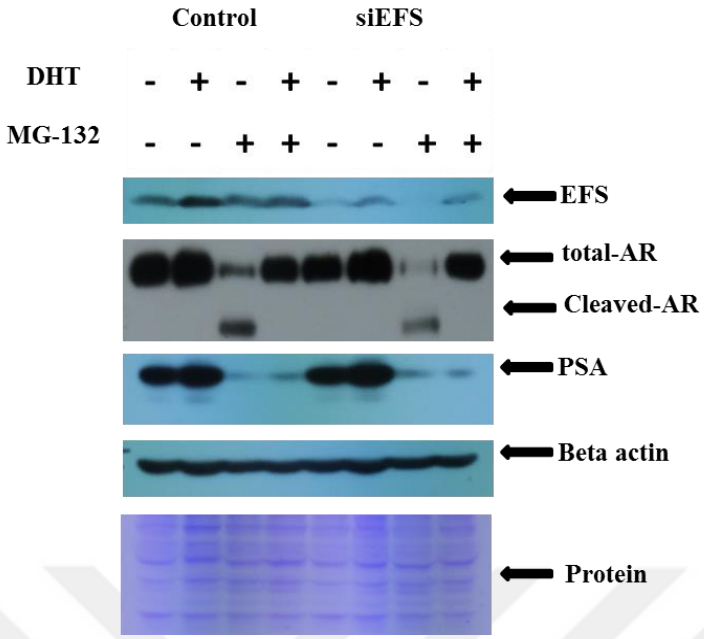


Şekil 4.9. LNCaP hücrelerinde var olan EFS siRNA aracılıklı olarak susturuldu ve 24 saat DHT uygulaması yapıldı ve ardından hücreler Immunofloresan yöntemi kullanılarak incelendi (kontrol hücrelerine hiçbir madde uygulanmadı)

4.6. EFS Aracılıklı AR Seviyesinin Mekanizmasının Belirlenmesi

EFS aracılıklı olarak AR seviyesinin proteozomal degredasyon aracılıklı yıkımının yapılıp yapılmadığını belirlemek için proteozomal degredasyon yıkım inhibitörü olan MG-132 kullanıldı (Şekil 4.10.).

Sadece MG-132 bir kliviç form oluşturduğu bilinmektedir. Hem total hem de kliviç AR seviyesinde ki azalmanın EFS seviyesinde de azalmaya neden olduğu görülmüştür. Total AR da meydana gelen azalmadan kaynaklı kliviç AR seviyesinde de azalma meydana gelmektedir.



Şekil 4.10. LNCaP hücrelerinde var olan EFS siRNA aracılıklı olarak susturuldu ve hücrelere MG-132 uygulaması ve DHT uygulaması yapıldı ardından AR ve EFS seviyelerine bakıldı (kontrol hücrelerine hiçbir madde uygulanmadı)

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Prostat kanserinin oluşmasında yaş, kalıtım, beslenme alışkanlıkları, ırksal farklılıklar ve hormonal değişikliklerin yanı sıra çevresel birçok etkinin rol oynadığı görülmektedir. Prostat gelişimi esnasında özgül olarak eksprese edilen çok az regülatör gen bilinmektedir (Bhatia ve ark., 1999). Serumdaki PSA düzeyi ile erken teşhis ve cerrahi müdahale ile radyasyon terapisi ölüm oranını önemli ölçüde azaltmaktadır. Bununla birlikte teşhisi ile ilgili yeterince biyolojik belirtecin tanımlanmamış olması erken tanı ve tedaviyi zorlaştırmaktadır. Ayrıca PSA seviyesinin de birçok olguda hatalı pozitif veya hatalı negatif sonuç verdiği bilinmektedir (Abate ve Shen, 2000).

Prostat kanseri, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin erkeklerde en sık görülen kanserler arasında yer almaktadır. Prostat kanseri tümörleri genellikle androjen bağımlıdır ve bu durumda tedaviler testosteron seviyesini azaltmaya yönelik olmaktadır. Bu tedavi yaklaşımıyla genellikle bir süreliğine tümör çapında küçülme ve hastalarda dönemsel bir rahatlama sağlansa da tedavi sürecinin ardından çoğu hastada androjen bağımsız tümör gelişimi gözlenmektedir. Bu aşamadan sonra hastalar için herhangi bir tedavi seçeneği kalmamaktadır ve androjen normal prostat bezinin gelişimi ve prostat kanserinin gelişiminde önemli rol oynayan bir molekül olup etkisini AR aracılığıyla göstermektedir.

Yapılan çalışmalar androjen reseptörü molekülünün çoğu androjen bağımsız tümörlerde de bulunduğu ve bu yüzden de androjenle uyarılabilen genlerin androjen bağımsız prostat kanseri gelişiminde rolleri olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesinin daha iyi anlaşılabilmesi için androjen ile uyarılabilen genlerin belirlenmesi çok önemlidir (Bubendorf ve ark. 1999; Linja ve ark., 2001).

Prostat kanseri tedavisinde erkeklik hormonu olan testosteron miktarını azaltarak veya tamamen ortadan kalkması sağlanarak prostat kanserinde geçici olarak

gerileme gözlenmiştir. (Dr. Charles B. Huggins 1966 yılında tıp alanında Nobel ödülü almıştır.) Ancak prostat kanseri bir süre sonra dolaşımda hormon seviyesi düşük olsa dahi ilerlemesini yeniden başlatabilir, bu durumda kontrol edilmesi güç, ölümcül bir kansere dönüşebilmektedir.

Crk bağlantılı substrat (Cas) ailesinin üyelerinin karsinogenesiste çeşitli rolleri olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Diğer taraftan yapılan çalışmalar EFS'nin bir hücre içi sinyal molekülü olabileceğini önermektedir (Deneka ve ark., 2015). Bu raporlar ile uyumlu şekilde EFS'nin hormonlar ile uyarılabileceğine yönelik çeşitli veriler bulunmaktadır (Dassen ve ark., 2007; Marques, 2010).

Yapılan çalışmalarda Cass ailesinin EFS dışında ki üyelerinin doğrudan bilinen onkogenlere bağlandığı ve hücrelerin maling tarnsformasyonu ile ilişkili morfolojiyi kontrol ettikleri gösterilmiştir (Vuori ve Ruoslahti, 1995; Law, 1996). Ayrıca bu protein ailesini kodlayan genlerin ekspresyonlarındaki değişikliklerin meme kanseri ve melanoma metastazları ile agresif gioblastomanın invezyonu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Minn ve ark., 2005; Kim ve ark., 2006; Natarajan ve ark., 2006).

Embrional Fyn-associated Substrate (EFS), Crk bağlantılı substrat (CAS) ailesinin bir üyesidir ve CAS ailesinin tüm üyelerinin karsinogenesiste çeşitli rolleri olduğu belirlenmiştir (Deneka, ve ark., 2015). İlk olarak Ishio ve arkadaşları tarafından fare embriyonal cDNA kütüphanesi kullanılarak SH3 domaini ile etkileşebilen proteinleri ortaya çıkarmak amacıyla yapılan çalışmada belirlenmiştir (Ishino, 1995).

EFS' nin insanlarda bilinen 3 varyantı (izoformu) bulunmaktadır. EFS'nin izoform 1 ve 2' nin farklı dokularda ve farklı seviyelerde ekspresyonları gözlenmektedir ve plesenta da en yüksek seviyede ekspresyonlarıyla birlikte embriyonal merkezi sinir sistemi, kalp, testis, akciğer de ekspresyonu görülmektedir (Alexandropoulos ve Baltimore, 1996). Timüs ve lenfositlerde düşük ekspresyonu gözlenmektedir. EFS ile ilgili fonksiyonel çalışmalarda en iyi sonuçların bağışıklık sisteminde olduğu belirlenmiştir (Ishino ve ark., 1997; Donlin ve ark., 2002).

EFS'nin geç poliferatif faz endometrium eksplantlarında 17β- estradiol ve progesteron ile seviyesinin azaldığı belirlenmiştir (Donlin ve ark., 2005). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda prostat kanseri hücrelerinde EFS ekspresyonunun normal hücreler ile karşılaştırıldığında prostat kanseri hücrelerinde DNA metilasyonuna bağlı olarak azaldığı ve kanser hücrelerinde EFS overekspresyonunun sağlanmasının hücrelerin maling davranışlarını inhibe ettiği belirlenmiştir.

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda prostat kanseri hücrelerinde EFS ekspresyonunun normal hücreler ile karşılaştırıldığında prostat kanseri hücrelerinde DNA metilasyonuna bağlı olarak azaldığı ve kanser hücrelerinde EFS overekspresyonunun sağlanmasının hücrelerin maling davranışlarını inhibe ettiği belirlenmiştir (Sertkaya ve ark., 2015).

Yapılan bir mikroarray çalışmasında normalde androjen bağımlı olup uzun süre aktif karbon uygulanmış serumla beslenme sonucu androjen bağımsız hale getirilen prostat kanseri hücrelerinde EFS ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Marques ve ark., 2010). Yapılan bir mikroarray çalışmasında normalde androjen bağımlı olup uzun süre aktif karbon uygulanmış serumla beslenme sonucu androjen bağımsız hale getirilen prostat kanseri hücrelerinde EFS ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Marques, 2010).

Tüm bu veriler doğrultusunda yaptığımız çalışmalar da androjen bağımlı prostat kanseri hücresi olan LNCaP ve normal prostat hücresi olan PNT1-a hücreleri kullanılarak yaptığımız tez çalışmasında androjenin EFS ekspresyonu üzerine olan etkisi ile beraber EFS'nin ekspresyonunun AR transaktivasyonuna etkilerini araştırarak prostat bezi hücrelerinde ve prostat kanseri hücrelerinde büyük öneme sahip bir genin aktivasyonu belirleyerek prostat kanserine katkıda bulunduk.

EFS'nin androjenle uyarılan bir gen olmasından yola çıkarak LNCaP hücrelerinde yaptığımız çalışmalar doğrultusunda DHT varlığında EFS seviyesinin arttığını ve DHT yokluğunda bu EFS seviyesinin neredeyse tamamen ortadan kalktığını gözlemledik. Aynı zamanda AR' nün siRNA aracılıklı susturulduğu

hücrelere DHT olan koşullarda EFS azalıyor görünse de DHT olmayan koşullara göre hücrelerde ki EFS seviyesinin azalmadığını gözlemledik. Buda bize EFS'nin androjen sinyali dışında farklı sinyal yolakları tarafından kontrol edilebileceğini göstermektedir.

Bu sonuçlar doğrultusunda yaptığınız diğer bir çalışmalarda EFS'nin androjen sinyali dışında PI3K/AKT sinyal yolağı tarafından kontrol edildiği sonucuna vardık. PI3K/AKT sinyal yolağı dışında farklı sinyal yolaklarının olup olmadığı ise farklı çalışmalarla araştırılıp desteklenmelidir. EFS'nin androjen ile seviyesel artışının RNA ya da protein düzeyinde oluşunu belirlemek amacıyla yaptığımız çalışmalardan yola çıkarak androjenle uyarılan EFS'nin seviyesel azalmasının doğrudan RNA üzerinden gerçekleştiği verisine ulaştık. Bu sonuçlar doğrultusunda EFS'nin androjenle uyarılan bir gen olduğu sonucuna varıldı. Bundan sonra EFS yokluğunda androjen reseptörü (AR) seviyesinde nasıl bir değişiklik gösterdiğini belirlemek amacıyla deneyler yaptık.

Western-blotta total hücrelerde AR seviyesine ve immünofloresan da (IF) ise tek bir hücre üzerinde ki AR seviyesine bakıldığında sonuçların birbiriyle uyumlu olduğunu gözlemledik. Elde edilen veriler EFS'nin siRNA aracılığıyla susturulması durumunda AR seviyesinin stoplazma da difüz olduğu kanısına varıldı.

Tüm bu sonuçlardan yola çıkarak EFS'nin prostat kanserinin androjen bağımlı hücrelerinde androjenle uyarılan bir gen olduğu sonucuna varılmıştır. EFS' nin prostat kanseri hücrelerinde androjen sinyal mekanizmasında rol oynayabileceği ve aynı zamanda prostat kanserinde önemli bir gen olabileceği düşünülmektedir. Bu sonuçların başka deneylerle de desteklenmesinin ardından prostat kanseri için önemli veriler elde edilmiş olacaktır.

KAYNAKLAR

ABATE, C., SHEN, M.M., 2000. Molecular Genetics of Prostate Cancer. Genes Dev., 14: 2410-2434.

ABDULKADİR, S.A., MAGEE, J.A., PETERS, T.J., KALEEM, Z., NAUGHTON, C.K., HUMPHREY, P.A., MILBRANDT, J., 2002. Conditional Loss of Nkx3.1 in Adult Mice İnduces Prostatic İntraepithelial Neoplasia. Mol. Cell. Biol., 22: 1495-1503.

ALEXANDROPOULOS, K. BALTIMORE, D., 1996. Coordinate Activation of c-Src by SH3- and SH2-binding Sites on a Novel p130Cas-related Protein, Sin. Genes & Development, 10: 1341–1355.

ANGELO M., 2007. Zonal Predisposition to Prostate Disease. Nature, 7: 256-269.

BASU, S. TİNDALL, D. J., 2010. Androgen Action in Prostate Cancer. Horm Cancer, 1: 223-228.

BENNETT, N. C., GARDINER, R. A., HOOPER, J.D., JOHNSON, D.W., GOBE, GC. 2010. Molecular Cell Biology of Androgen Receptor Signalling. Int. J. Biochem. Cell. Biol., 42: 813-827.

BEVAN, C. L., HOARE, S., CELAESSENS, F., HEERY, D. M., PARKER, M. G., 1991. The AF-1 and AF2 Domains of The Androgen Receptor İnteract With Distinct Regions of SRC1. Molecular and Cellular Biology, 19 (12): 8383-8392.

BHATIA, R., DONJACAUR, A.A., SCIAVOLINO, P.J., KIM, M., DESAI, N., YOUNG, P., NORTON, C.R., GRIDLEY, T., CARDİFF, R.D., CUNHA, G.R., ABATE-SHEN, C., SHEN, M.M., 1999, Roles For Nkx3.1 in Prostate Development and Cancer. Genes Dev., 13: 966-977.

BUFENDORF, L., Kononen, J., Schraml, P., Moch, H., Gasser, T. C., Willi, N., Mithatsch, N. J., Sauterr G., and Kallioniemi O.P., (1999). Survey of Gene Amplifications During Prostate Cancer Progression by High-thoughout Flurescense in Situ Hybridization on Tissue Microarrays. Cancer Res., 59(4): 803-806.

DANZL, N. M., DONLIN, L. T., ALEXANDROPOULOS, K., 2010. Regulation of Medullary Thymic Epithelial Cell Differentiation and Function by The Signaling Protein Sin. The Journal of Experimental Medicine, 5: 999–1013.

DASSEN, H., PUNYADEERA, C., KAMPS, R., KLOMP, J., DUNSELMAN, G., DIJCSK, F., GOEIJ, A., EDERVEEN, A., GROOTHUIS, P., 2007. Progesterone Regulation of İmplantation-related Genes New İnsights İnto The Role of Oestrogen. Cellular and Molecular Life Sciences, 8: 1009-1032.

DENEKA, A., KOROBEYNİKOV, V., GOLOMİS, E. A., 2015. Embrional Fyn-associated Subsrate (EFS) and CASS4: The Lesser-known CAS Protein Family Members. Gene, 570 (1): 25-35.

DE MARZO, A. M., DEWEESE, T. L., PLATZ, E. A., MEEKER, A. K., NAKAYAMA, M., EPSTEIN, J. I., ISAACS, W. B., NELSON, W. G., 2004. Pathological and Molecular Mechanisms of Prostate Carcinogenesis:

Implications for Diagnosis, Detection, Prevention, and Treatment. J. Cell Biochem., 91: 459–477.

DE MARZO, A. M., PLATZ, E.A., SUTClLIFFE, S., XU, J., GRONBERG, H., DRAKE, C.G., NAKAI, Y., ISAATC, W.B., NELSON, W.G., 2007. Inflammation in Prostate Carcinogenesis. Nat. Rev. Cancer, 7: 256-269.

DONG, J. T., 2006. Prevalent Mutations in Prostate Cancer. J. Cell Biochem., 97 (3): 433-447.

DONLİN, L. T., ROMAN, C. A., ADLAM, M., REGELMANN, A. G., ALEXANDROPOULOS, K., 2002. Defective Thymocyte Maturation by Transgenic Expression of a Truncated Form of The T Lymphocyte Adapter Molecule and Fyn substrate, Sin. Journal of Immunology, 11: 6900–9.

DONLIN, L. T., DANZL, N. M., WANJALLA, C., ALEXANDROPOULOS, K., 2005. Deficiency in Expression of The Signaling Protein Sin/Efs Leads to T-lymphocyte Activation and Mucosal İnflammation. Molecular and Cellular Biology, 24: 35–46.

DONLIN, L. T., ROMAN, C. A., ADLAM, M., REGELMANN, A. G., ALEXANDROPOULOS, K., 2002. Defective Thymocyte Maturation by Transgenic Expression of a Truncated Form of The T Lymphocyte Adapter Molecule and Fyn substrate, Sin. Journal of Immunology, 11: 690–699.

DUNN, M. W., 2011. Prostate Cancer Overview. Semin Oncol Nurs, 27: 433-447.

ELLEN, T. M. H., LI J., XU, E., YONG, E., 2015. Androgen Receptor: Structure, Role in Pancer and Drug Discovery, 36 (1): 3-23.

EMIL, A., TANOGHO, J., MCANINCH, J. W., 2004. Prostat Kanseri ve Benign Prostat Hiperplazisi., Nobel Kitabevleri, İstanbul, s418.

FELDMAN, B. J., FELDMAN, D., 2001. The Development of Androgen-İndependent Prostate Cancer. Nat. Rev. Cancer, 1: 34-45.

GARCIA, J. A., and RINI, B. I., 2011. Castration-resistant Prostate Cancer: Many treatments, many options, many challenges ahead. Cancer, 118: 2583-2593.

GROSMANN, M. E., HUANG, H., TINDALL, D. J., 2001. Androgen Receptor Signaling in Androgen-Refractory Cancer, J. Nat. Cancer, 93: 1687-1697.

HALLOSTROM, T. A., 2007. p53 and DNA Damage Checkpoint Responsen in The Human Prostate. Molecular and Cancer Biology Program, Helsinki, 87: s100.

HALLOSTROM, T. M., LAIHO, M., 2008. Genetic Changes and DNA Damage Responses in The Prostate. Prostate, 68: 902-918.

ISHIO, M., 1995. Molecular Cloning of a cDNA Encoding a Phosphoprotein, EFS, Which Contains a Src Homology 3 Domain and Associated With Fyn. Oncogene, 2331-2338.

ISHIO, M., OHBA, T., INAZAVA, J., SASAKİ, H., ARİYAMA, Y., SASAKİ, T., 1997. Identification of an Efs İsoform That Lacks The SH3 Domain and Chromosomal Mapping of Human Efs. Oncogene, 15: 1741–5.

IYER, P., Scardino, 2009. The Complete Guide to Overcoming Prostate Cancer, Prostatis and BPH. Penguin Group, Prostate Book, 152-251.

KARINE, P. J., COTE, P., BLANCHET, C. L. J., LABRİE, F., ROCK, B., 2006. Comparison of Crystal Structures of Human Androgen Receptor Ligand-Dinding Domain Complexed With Various Agonists Reveals Molecular Determinants Responsible For Binding Affinity. Protein Science, 15: 987-999.

KAZANCI, G., 2009. Prostat Kanseri ve Benign Prostat Hiperplazisi, Smith Genel Üroloji, İstanbul, s116.

KIM, M., GANS, J. D., NOGUERIA, C., WANG, A., PAIK, J. H., FENG, B., BRENNAN, W. C., HAHN, C., CORDON-CORDO, C., WAGNER, S. N., FLOTTE, T. J., DUNCEN, L. M., GRANTER, S. R., and CHIN, L., 2006. Comparative Oncogenomics Identifies NEDD9 a Melanoma Metastasis Gene. Cell, 125: 1269-1281.

KONISHI, N., SHIMADA, K., ISHIDA, E., NAKAMURA, M., 2005. Molecular pathology of prostate cancer. Pathology İnternational, 55: 531-539.

KORKMAZ, K. S., KORKMAZ, C. G., RAGNHILDSTVEIT, E., KIZILDAG, S., PRETLOW, T. G., SAATCIOGLU, F., 2000. Full-length cDNA Sequence and Genomic Organization of Human NKX3A-Alternative Forms and Regulation by Both Androgens and Estrogens. Gene, 260: 25-36.

KORKMAZ, C. G., KORKMAZ, K. S., MANOLA, J., XI, Z., RISBERG, B., DANİELSEN, H., KUNG, J., SELLERS, W. R., LODA, M., SAATCIOGLU, F., 2004, Analysis of Androgen Regulated Homeobox Gene NKX3.1 During Prostate Carcinogenesis. J. Urol., 172: 1134-1139.

KUMBRING, JOERG, KUMBRING, KATHRIN, KIRSCH, H., 2011. Targeting Cas Family Proteins as a Novel Treatment for Breast Cancer. Breast cancer, 1: 540-545.

LANGREAK, P., RUSSELL P., 2011. Regulatory Networks Integrating Cell Cycle Control With DNA Damage Checkpoints and Double-strand Break Repair. Philos Trans R. Soc. Lond. B. Biol. Sci, 366: 3562-3571.

LAW, S. F., 1996. Human Enhancer of Filamentation 1, a Novel p130Cas-like Docking Protein Associates With Focal Adhesion Kinase and Induces Pseudohyphal Growt in Saccharomyces Cerevisiae. Mol. Cell Biol., 7: 3327-3337.

LINJA, M. J., SAVIVINAINEN, K. P., SARAMAKI, O. R., TAMMELA, T. L., VESSELA, R. T., VISAKORPI, T., 2001. Amplification and Overexpression of Androgen Receptor Gene in Hormone-refractory Prostate Cancer. Cancer Res., 61: 3550-3555.

LONERGAN, P. E., DONALD, J., 2011. Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer Development and Progression. J Carcinog, 10: 1-12.

MARQUES, R. B., 2010. Bypass Mechanisms of The Androgen Receptor Pathway in Therapy-resistant Prostate Cancer Cell Models. PLoS One, 4: 1350-1356.

MINN, A. J., GUPTA, G. P., SIEGEL, P. M., BOS, P. D., SHU, W., GIRI, D. D., VIALE, A., OLSHEN, A. B., GERALD, W. L., and MASSAGUE, J., 2005. Genes That Mediate Brest Cancer Metastasis to Lung. Nature, 436: 518-524.

MINEGISHI, M., TACHIBANA, K., SATO, T., IWATA, S., NOJIMA, Y., MORIMOTO, C., 1996. Structure and Fuction of Cas-L, a 105 kd Crk-associated Susbrate-relared Protein That is Involved in Beta 1 Integrin-Mediated Signaling in Lymphocytes. J. Exp. Med., 4: 1365-1375.

NATARAJAN, M. J., STEWART, J. E., GOLEMIS, E. A., PUGACHEVA, E. N., ALEXANDROPOULUS, K., COX., WANG, W., GRAMMER, J. R., and GLADSON, C. L., 2006. HEF1 is Necessary and Specific Downstream Effector of FAK That Prometes The Migration of Glioblastoma Cell. Oncogene, 25: 1721-1732.

NCBI, Gene. Haziran 2016. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10278.

NELSON, W. G., DE MARZO, A. M., ISAASC, W. B., 2003. Prostate cancer. J. Med., 349: 366-381.

PRESCOTT, J. L., Bok, L., and TINDALL, D. J., 1998. Isolation and Androgen Regulation of The Human Homeobox cDNA, NKX3.1. Prostate, 35: 71-80.

PORKKA, K. P., VISAKORPI, 2004. Molecular Mechanisms of Prostate Cancer. European Urology, 45: 683–691.

REDDY, G.P., BARRACK, E.R., DOU, Q.P., MENON, M., PELLEY, R., SARKAR, F.H., SHENG, S., 2006, Regulatory Processes Affecting Androgen Receptor Expression, Stability, and Function: Potential Targets to Treat Hormonerefractory Prostate Cancer. J. Cell Biochem., 98: 1408-1423.

RINI, B. L., 2011, Thyroid Function Abnormalities in Patients Receiving VEGF-Targeted Therapy. Clin. Adv. Hemato.l Oncol., 9:337-8.

SCARDINO, P., 2005. Scardino's Prostate Book, The Complete Guide to Overcoming Prostate Cancer, Prostatis and BPH, Penguin Group, s1170.

SCHULTZ, W. A., BURCHARDT, M., and CRONAUER, M. V., 2003. Molecular Biology of Prostate Cancer, Mol. Hum. Reprod., 9: 437-448.

SERTKAYA, S., HAMİT, S. M., DİLSİZ, N., VARİSLİ, L., 2015. Decreased Expression of EFS is Correated With The Advanced Prostate Cancer. Tumour Biol., 36: 799-805.

SIMMONS, O., and HOROWITZ, J. M., 2006, Nkx3.1 Binds and Negatively Regulates The Transcriptional Activity of Sp-family Members in Prostate-Derived Cells. Biochem J., 393: 397-409.

SONG, H., ZHANG, B., WATSON, M. A., HUMPHERY, P. A., LIM, H. and MILBRANDT, J., 2009, Loss of Nkx3.1 Leads to The Activation of Discrete Downstream Target Genes During Prostate Tumorigenesis, Oncogene, 28: 3307-3319.

TANAGHO, E. A,. 1995. Anatomy of the genitourinary tract. General Urology, 456-77.

VUORI, K., and RUOSLAHTI, E., 1995. Tyrosine Phosphorylation of p130Cas and Cortactin Accompanies Integrinmediated Cell Adhesion to Extracellular Matrix. J. Bio. Chem., 38: 22259-22262.

ZHOU, Z. X., SAR, M., SIMENTAL, J. A., LANE, M. V., WISON, E. M., 1994. A Ligand Dependent Bipartite Nuclear Targeting Signal in The Human Androgen Receptor. Requiretment Fort he DNA-binding Domain and Modulation by NH2-terminal and Carboxly-terminal Sequences. J. Biol. Chem., 222-243.

ZIYPAK, T., ADANUR, Ş., and FELDMAN B. J., FELDMAN, D., 2001. The Development of Androgen-independent Prostate Cancer; Androjen Reseptör Bozuklukları ve Erkek İnfertilitesi. Nat. Rev. Cancer, 59: 280-285.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hasine YEL
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : MARDİN, 02.11.1991
Telefon : +90 (534) 393 07 36
e-mail : hasineyel47@gmail.com

EĞİTİM

Derece		Adı	İlçe	İl	Bitirme Yılı
Lise	:	Yaşar Okay Lisesi	Artuklu	Mardin	2009
Üniversite	:	Gaziantep Üniversitesi/Fen-Edebiyat fakültesi/Biyoloji Bölümü	Şahinbey	Gaziantep	2014
Yüksek lisans	:	Harran Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji Anabilim Dalı	Haliliye	Şanlıurfa	2016

UZMANLIK ALANI

Moleküler Biyoloji	:	PCR, Agaroz-page elektroforez, SDS-PAGE, Western blot, transformasyon, plazmit ve genomik DNA izolasyonu, RNA izolasyonu, transfeksiyon, immünfloresan yöntemi
Hücre Biyolojisi	:	Hücre kültürü, Hücre canlılığı ve sitotoksisite testleri (WST-1)
Bilgisayar	:	Microsoft Office, Image J

YABANCI DİLLER : İngilizce

YAYINLAR

VARIŞLI, L.,YEL, H., İLİKAY, S., 2016. Yeni Bir Anti-Apoptotik Potein Olarak HN1'in Tanımlanması. Tıpta ve İnovasyon Buluşmaları-2, 5-7 Mayıs, Gaziantep, s29

VARIŞLI, L.,YEL, H., İLİKAY, S., 2016. Oksidatif Stres Sentrozom Sayısı Düzenlenmesinde Ana Faktördür. Tıpta ve İnovasyon Buluşmaları-2, 5-7 Mayıs, Gaziantep, s30.