



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**PROSTAT KANSERİNDE AR-V7 ve AR-V567es ANDROJEN
RESEPTÖR VARYANTLARININ HSP-27 ve NF- κ B SİNYAL
YOLAĞI ÜZERİNE ETKİLERİ**

İLKER KILIÇCIOĞLU

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

EYLÜL 2019



**PROSTAT KANSERİNDE AR-V7 ve AR-V567es ANDROJEN RESEPTÖR
VARYANTLARININ HSP-27 ve NF- κ B SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE
ETKİLERİ**

İlker KILIÇCIOĞLU

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EYLÜL 2019

İLKER KILIÇCIOĞLU tarafından hazırlanan “Prostat Kanseri AR -V7 ve AR-V567es Androjen Reseptör Varyantlarının HSP-27 ve NF-K β Sinyal Yolu Üzerine Etkileri” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof.Dr. Ece KONAÇ

Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D, Gazi Üniversitesi

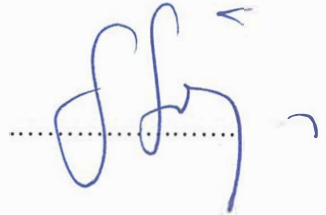
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Başkan : Prof.Dr.Sinan SÖZEN

Üroloji A.D, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Doç.Dr.H.İlke ÖNEN

Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Prof.Dr.Cenk Y.BİLEN

Üroloji A.D, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Prof.Dr. Sümer BALTACI

Üroloji A.D, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Tez Savunma Tarihi: 18/09/2019

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



İLKER KILIÇCIOĞLU

18.09.2019

PROSTAT KANSERİNDE AR-V7 ve AR-V567es ANDROJEN RESEPTÖR
VARYANTLARININ HSP-27 ve NF-κB SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

(Doktora Tezi)

İlker KILIÇCIOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eylül 2019

ÖZET

Prostat kanseri, rastlanma sıklığı açısından erkeklerde ikinci, genel olarak ise dördüncü en sık görülen kanser tipidir. Prostat kanserinin progresyonunda androjen reseptöründeki mutasyonlar önem taşımaktadır. Androjen reseptörünün alternatif kesimlenmesi ile oluşan AR varyantları, son yıllarda prostat kanseri alanındaki önemli bir araştırma konusudur. Prostat kanserinde anormal artmış AR varyant ekspresyonuna aracılık eden moleküler mekanizmalar halen tam olarak bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında, prostat kanserinde regülasyonu bozulmuş olan AR yolağının ve NF-κB, HSP-27 gibi ilişkili sinyal yollarındaki anahtar genlerin ekspresyonu prostat kanserli hücre hatlarında ve farklı evrelerdeki prostat kanserli hasta gruplarında araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, ileri evre prostat kanseri vakalarında androjen reseptörleri blokajının yanı sıra NF-κB sinyal yolağını ve AR regülatörü olduğu daha önceki çalışmalarda ortaya konan Hsp-27 proteinini hedefleyen terapilerin de önemli olacağı düşünülmektedir. Prostat kanserinin başlaması ve progresyonunda önem arz eden AR ve varyant AR oluşumu ile ilgili moleküler mekanizmaların aydınlatılması ile bu ilişkili sinyal yollarını hedefleyen inhibitörlerin klinikte kullanımı yaygınlaşarak prostat kanserinin tedavisine yönelik önemli aşamalar kaydedilebilecektir.

Bilim Kodu : 1055.1
AnahtarKelimeler : Prostat kanseri, Androjen reseptörü, Nükleer faktör kappa-B, Isı şok proteini-27
Sayfa Adedi : 80
Danışman : Prof. Dr. Ece KONAÇ

THE EFFECTS OF ANDROGEN RECEPTOR VARIANTS, AR-V7 and AR-V567ES, ON HSP-27 AND NF- κ B SIGNALING PATHWAY IN PROSTATE CANCER.
(Ph. D. Thesis)

İlker KILIÇCIOĞLU

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

September 2019

ABSTRACT

Prostate cancer is the second most common cancer in men and globally the fourth most common cancer. Mutations in the androgen receptor are important in the progression of prostate cancer. AR variants which are created with alternative splicing of androgen receptor have been an important research topic in prostate cancer in recent years. Molecular mechanisms mediating expression of abnormally increased AR variant in prostate cancer are still unknown. In this thesis, the expression of the AR pathway, which is impaired in prostate cancer, and key genes in related signaling pathways such as NF- κ B, HSP-27, has been investigated in prostate cancer cell lines and in different groups of prostate cancer patients. According to the results, therapies targeting the NF- κ B signaling pathway and HSP-27 protein which is known to be AR regulator will be important in addition to androgen receptor blockade in advanced prostate cancer cases. By elucidating the molecular mechanisms related to the formation of AR and variant AR, which are important in the initiation and progression of prostate cancer, the use of inhibitors targeting these related signaling pathways will become prevalent and important steps in the treatment of prostate cancer will be recorded.

ScienceCode : 1055.1
Keywords : Prostate cancer, Androgen receptor, Nuclear factor kappa-B, Heat shock protein-27
Page Number : 80
Supervisor : Prof. Dr. Ece KONAÇ

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca büyük bir sabır, ilgi ve hoşgörü göstererek akademik bilgisini ve desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen, gelecekteki mesleki yaşamımda da yoluma daima ışık tutacağını bildiğim, kendisinden daha öğreneceğim çok şey olan, saygıdeğer danışman Hocam Prof. Dr. Ece KONAÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık sürem içinde kendilerinden edindiğim bilgi ve tecrübelerden ötürü Bölümümüz Öğretim Üyeleri Doç. Dr. H. İlke ÖNEN ve Doç. Dr. A. Seda YAR SAĞLAM'a teşekkür ederim. Hasta kanlarının teminini koordine eden ve klinik bilgilerini katarak tez çalışmama destek veren Gazi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sinan SÖZEN ve Hacettepe Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Cenk Y. BİLEN ve deneyler sonrası istatistiksel çalışmaları gerçekleştiren Halk Sağlığı Anabilim Dalından Dr. Öğr. Üyesi Asiye UĞRAŞ DİKMEN hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Doktora öğrenimim boyunca 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı ile bursiyer olarak desteklenmeye hak kazandığım TÜBİTAK-BİDEB'e teşekkürlerimi sunarım. 01/2017-10 ve 01/2019-08 kod numaralı projeler ile tez çalışmamı destekleyen Gazi Üniversitesi BAP birimine ve YÖK-Öğretim Üyesi Yetiştirme Programına (ÖYP) tez çalışmamda sağladıkları destekten ötürü teşekkür ederim.

Son olarak, tüm eğitim hayatımda desteklerini her zaman hissettiğim ve hep yanımda olarak beni motive eden anneme, babama ve kardeşime çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Prostat Kanseri	5
2.3. Prostat Kanseri Risk Faktörleri.....	5
2.4. Prostat Bezi Yapısı ve Fonksiyonu	6
2.5. Prostat Kanserinin Tanısı.....	7
2.6. Prostat Kanserinin Moleküler Patogenezi ve Progresyonu.....	7
2.7. Androjen Reseptörünün Yapısı, Fonksiyonu ve Gelişimdeki Rolü	10
2.8. Androjen Reseptör Varyantları.....	14
2.9. NF- κ B (Nükleer Faktör Kappa-B) Sinyal Yolağı.....	18
2.10. Isı Şok Proteini 27 (HSP-27).....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Gereçler.....	23
3.1.1. Kullanılan cihazlar	23
3.1.2. Kullanılan sarf malzemeleri	23
3.1.3. Kullanılan kimyasallar.....	24
3.1.4. Kullanılan kitler	25

	Sayfa
3.1.5. Kullanılan solüsyonların hazırlanışı	25
3.2. Yöntemler.....	28
3.2.1. Hücre kültürü.....	28
3.2.2. İlaç uygulamaları.....	29
3.2.3. Hücre canlılığının belirlenmesi	29
3.2.4. RNAi ile baskılama	30
3.2.5. Protein izolasyonu, miktar tayini ve Western blot yöntemi	31
3.2.6. Hasta ve kontrol grubu	32
3.2.7. Periferel kan örneklerinden serum eldesi	33
3.2.8. Tam kandan RNA izolasyonu ve Real-Time PCR	34
3.2.9. ELISA yöntemi	34
3.2.10. İstatistiksel analiz	35
4. BULGULAR.....	37
4.1. NF- κ B İnhibitörü BAY11-7082 ve HSP-27 İnhibitörü KRIBB- 3'ün Prostat Kanseri Hücre Hatlarının Canlılıkları ve Proliferasyonları Üzerine Etkisinin İncelenmesi.....	37
4.2. AR, AR-V7 ve AR-V567es'in Bazal İfade Seviyelerinin Protein Düzeyinde İncelenmesi	44
4.3. BAY11-7082 ve KRIBB-3'ün AR , AR-V7, P65, Fosforile IKK α/β ve Fosforile HSP-27'nin İfadelenmeleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	45
4.4. AR-V7 siRNA Baskılamanın İnhibitörler ile Kombinasyonunun 22Rv1 Hücrelerindeki Protein İfadelenmesine Etkileri	47
4.5. AR, AR-V7 Ve AR-V567es'nin Kontrol, Prostat Kanseri Ve Metastatik Prostat Kanseri Hastaların Tam Kan Örneklerinde mRNA Düzeyinde İfadelenme Seviyeleri.....	49
4.6. NF- κ B ve HSP-27'nin Kontrol, Prostat Kanseri (Pca) ve Metastatik Prostat Kanseri (Met-Pca) Hastaların Serum Örneklerinde Protein Düzeyinde İfadelenme Düzeyleri.....	51
5. TARTIŞMA.....	55

	Sayfa
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR.....	67
EKLER.....	75
EK-1. Etik Kurul	76
ÖZGEÇMİŞ.....	78



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Prostat kanseri hastalarının klinikopatolojik karakteristikleri.....	33
Çizelge 3.2. Metastatik prostat kanseri hastalarının klinikopatolojik karakteristikler	33



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin temel nitelikleri	4
Şekil 2.2. Prostat kanserinin başlaması ve progresyonunda yer alan moleküler değişikliklerin özeti	10
Şekil 2.3. Tam uzunluktaki AR ve AR-V7 kesim varyantının transkript yapıları	16
Şekil 2.4. NF- κ B aktivasyonunun şematik gösterimi	19
Şekil 2.5. Isı şoku proteini-27 (HSP27) ile androjen reseptörü (AR) arasındaki ilişki	20
Şekil 4.1. LNCaP hücrelerinin (5000hücre/kuyu) BAY11-7082 ile belirtilen dozlarda 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.....	38
Şekil 4.2. LNCaP hücrelerinin (5000hücre/kuyu) KRIBB-3 ile belirtilen dozlarda 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.....	38
Şekil 4.3. LNCaP hücrelerinin (5000hücre/kuyu) BAY11-7082 ve KRIBB-3 kombinasyonu ile belirtilen dozlarda 24 saatlik inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.....	39
Şekil 4.4. PC-3 hücrelerinin (5000hücre/kuyu) BAY11-7082 ile belirtilen dozlarda 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.....	40
Şekil 4.5. PC-3 hücrelerinin (5000hücre/kuyu) KRIBB-3 ile belirtilen dozlarda 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları	41
Şekil 4.6. PC-3 hücrelerinin (5000hücre/kuyu) BAY11-7082 ve KRIBB-3 kombinasyonu ile belirtilen dozlarda 24 saatlik inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.....	41
Şekil 4.7. 22Rv1 hücrelerinin (5000hücre/kuyu) BAY11-7082 ile belirtilen dozlarda 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.....	43
Şekil 4.8. 22Rv1 hücrelerinin (5000hücre/kuyu) KRIBB-3 ile belirtilen dozlarda 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.....	43
Şekil 4.9. 22Rv1 hücrelerinin (5000hücre/kuyu) BAY11-7082 ve KRIBB-3 kombinasyonu ile belirtilen dozlarda 24 saatlik inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.....	44

Şekil**Sayfa**

Şekil 4.10. İnhibitör uygulanmamış 22Rv1, LNCaP ve PC-3 hücre hatlarında AR, AR-V7 ve AR-V567es'in protein düzeyindeki içsel ekspresyon seviyeleri.....	45
Şekil 4.11. 22Rv1, PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında BAY11-7082 ve KRIBB-3'ün AR, AR-V7, p65, fosfo-IKK α / β ve fosfo-Hsp-27'nin ifadelanmeleri üzerine etkileri.....	47
Şekil 4.12. 22Rv1 hücre hatlarında AR-V7'ye özgü siRNA baskılamanın inhibitörler ile kombinasyonunun hedef proteinlerin ifadelanmesi üzerine etkileri.....	49
Şekil 4.13. AR ile AR-V7 ve AR-V567es AR varyantlarının kontrol, prostat kanseri (PCa) ve metastatik prostat kanserli (Met-PCa) hasta kanlarındaki mRNA düzeyinde ifadelanme değişiklikleri	51
Şekil 4.14. Kontrol, prostat kanseri (PCa) ve metastatik prostat kanserli (Met-PCa) hasta serum örneklerinde NF- κ B ifadelanme düzeyleri.....	52
Şekil 4.15. Kontrol, prostat kanseri (PCa) ve metastatik prostat kanserli (Met-PCa) hasta serum örneklerinde Hsp-27 ifadelanme düzeyleri	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
M	Molar
μM	Mikromolar
nM	Nanomolar
mM	Milimolar
μg	Mikrogram
gr	Gram
μl	Mikrolitre
ml	Mililitre
cm^2	Santimetrekare
nm	Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat
CO_2	Karbondioksit
U	Unite
Dk	Dakika
Sn	Saniye
%	Yüzde
α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa

Kısaltmalar**Açıklama**

ADT	Androjen Deprivasyon Terapisi
APS	Amonyum persulfat
AR	Androjen reseptörü
AR-V7	Androjen Reseptörü Varyant-7
BCL-2	B hücresi lenfoma geni 2
BSA	Bovine serum albumin
BPH	Benign Prostat Hiperplazisi
DBD	DNA-Binding Domain
DHT	Dihidrotestesteron
DMSO	Dimetilsülfoksit
dNTP	Deoksiribonükleotidtrifosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ETS	E-twenty six
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetal bovin serum
FDA	Amerikan gıda ve ilaç dairesi
HSP	Isı şoku proteini
$\text{I}\kappa\beta\alpha$	Kappa-B inhibitörü alfa
$\text{IKK}\alpha/\beta$	Kappa-B inhibitörü kinaz alfa/beta
MgCl	Magnezyum klorür
mRNA	Haberci RNA
NF-$\kappa\beta$	Nükleer faktör kappa-B
PBS	Fosfat tampon solusyonu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PIN	Prostatik intraepitelyal neoplazi
PMSF	Fenilmetil sulfonil florid
PSA	Prostat spesifik antijen
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Ters transkripsiyon PCR
SDS	Sodyum dodesil sülfat
WST-1	Kolorimetrik hücre proliferasyonu kiti

1. GİRİŞ

Prostat kanseri (PCa), dünya genelinde erkeklerde kanserle ilişkili ölümler arasında ikinci sırada yer alan önemli bir sağlık problemidir. Tedaviye yönelik önemli bir yaklaşım olan androjen deprivasyon tedavisi (ADT) uygulamasına rağmen, agresif ve terapiye dirençli tümörlerin relapsı hastalar arasında başlıca ölüm nedenidir. Bu ADT'ye dirençli PCa formu, hormona refrakter veya kastrasyon dirençli prostat kanseri (KDPK) olarak adlandırılır. Bu evrede, androjen yokluğunda bile sürekli androjen reseptörü (AR) sinyalizasyonu aktiftir. Yüksek düzeydeki AR sinyallemeinin altında yatan çeşitli mekanizmalar arasında AR gen amplifikasyonu, sitokinler veya kinazlarla ligandan bağımsız AR aktivasyonu, hem intrakrin hem de intratümoral androjen üretimi, AR ko-aktivatörlerinin aşırı ekspresyonu ve en önemlisi, yapısal olarak aktif AR kesim varyantlarının ekspresyonu bulunmaktadır. Bu nedenle androjen reseptörü, prostat kanserinin başlamasını ve ilerlemesini destekleyen başlıca faktörlerden biri olarak bilinmektedir.

AR'nün üzerinde N-terminal domain (NTD), DNA'ya bağlanan domain (DBD) ve hormona bağlanan domain (LBD) olmak üzere 3 bölümü vardır. Androjene bağımlı gen ekspresyonu ve hücre gelişimi tam uzunluktaki AR (FL-AR) tarafından, androjenden bağımsız transkripsiyonel aktivite ve hücre gelişimi ise karboksi ucu kesilmiş, liganda bağlanan domain içermeyen AR varyantları (AR-V7, 567es gibi) tarafından sürdürülmektedir. Bu kesilmiş AR formları, C-terminal ligand bağlama bölgesini içermez, ancak N-terminal bölgesini korur, böylece kastre hormon seviyelerine rağmen AR hedef genlerinin transkripsiyonel aktivasyonunu teşvik eder. Tam uzunluktaki androjen reseptöründen alternatif kesimlenme (splicing) mekanizması ile oluşan androjen reseptörü varyant-7 (AR-V7) ileri evre prostat kanserinde abiraterone, enzalutamid gibi anti-androjen ilaçlara direnç ve kötü prognoz nedeni olarak belirtilmeye başlanmıştır. Ancak moleküler düzeyde ilişkili sinyal yolları henüz aydınlatılmamıştır. Sekiz ekzondan oluşan androjen reseptörünün ekzon 5,6 ve 7 kısmı delesyona uğramış bir başka varyantı ise ARV-567es olarak tanımlanmıştır.

NF- κ B (Nükleer Faktör Kappa- β) transkripsiyon faktörleri, hücrelerin immün ve inflamatuvar uyaranlara karşı verdiği yanıtın düzenlenmesini ve hücre sağkalımını kontrol eden önemli protein gruplarından. Ayrıca anjiogenezi, proliferasyonu, migrasyonu uyarıcı ve apoptozu baskılayıcı rolü de bilinmektedir. Hücrelerde NF- κ B yolağının aşırı aktivasyonunun primer prostat kanseri oluşumu ve metastatik kastrasyona dirençli evreye geçişte ilişkili olabileceği çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Ayrıca, AR promotorü üzerindeki çoklu NF- κ B bağlanma bölgeleri aracılığı ile tam uzunluktaki AR ifadenmesinin artışında rolü olabileceği düşünülmektedir.

Hormon terapi, radyoterapi, kemoterapi gibi standart kanser terapilerini içeren hücresel streslere yanıt olarak ifadesi artan sitoprotektif şaperon proteinlerin de tedaviye karşı dirençte büyük rol oynadığı bilinmektedir. HSP-27 (Isı-şok proteini 27) şaperon proteinleri, prostat kanserini de içine alan pek çok kanserde aşırı ifadenmesi belirlenmiştir. HSP'leri, AR gibi pek çok steroid reseptörün katlanmasında, aktivasyonunda, hücre içi trafiğinde ve transkripsiyonel aktivitesinin düzenlenmesinde rol alır. Aşırı ekspresyonu kötü prognoz ve kastrasyona direnç süreci ile de ilişkilidir. Bu nedenle, prostat kanserinde regülasyonu bozulmuş olan AR yolağının ve NF- κ B, HSP-27 gibi ilişkili sinyal yollarının inaktif hale getirilmesi ile bu yollar ile ilişkili anahtar genlerin üzerinde protein ekspresyonu seviyesinde önemli etkilerinin bulunması beklenebilir.

Bu amaçla bu tez çalışmasında, NF- κ B ve HSP-27'yi hedefleyen inhibitör ajanların kombinasyonu ve AR-V7 'nin siRNA aracılı susturulması ile agresif prostat kanserinde yüksek aktivitesi bilinen AR ile ilişkili yollar üzerine olan etkileri prostat kanserli hücre hatlarında protein düzeyinde incelenmiştir. Ayrıca çalışmamızda, total kandan AR, AR-V7, AR-V567es ekspresyonu real-time PCR yöntemi ile RNA düzeyinde ifadenmeleri incelenerek hastalığın evresine özgü ifade profillemesi yapılmıştır. NF- κ B yolağı ve HSP-27 ekspresyonu NF- κ B ve HSP-27 insana özgü ELISA kiti ile protein düzeyinde incelenmiştir. Bu tez çalışması sonucunda, prostat kanserinde regülasyonu bozulmuş olan AR yolağının, HSP-27 ile NF- κ B sinyal yolağı ile ilişkili anahtar genlerin ekspresyonu üzerinde önemli etkileri görülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

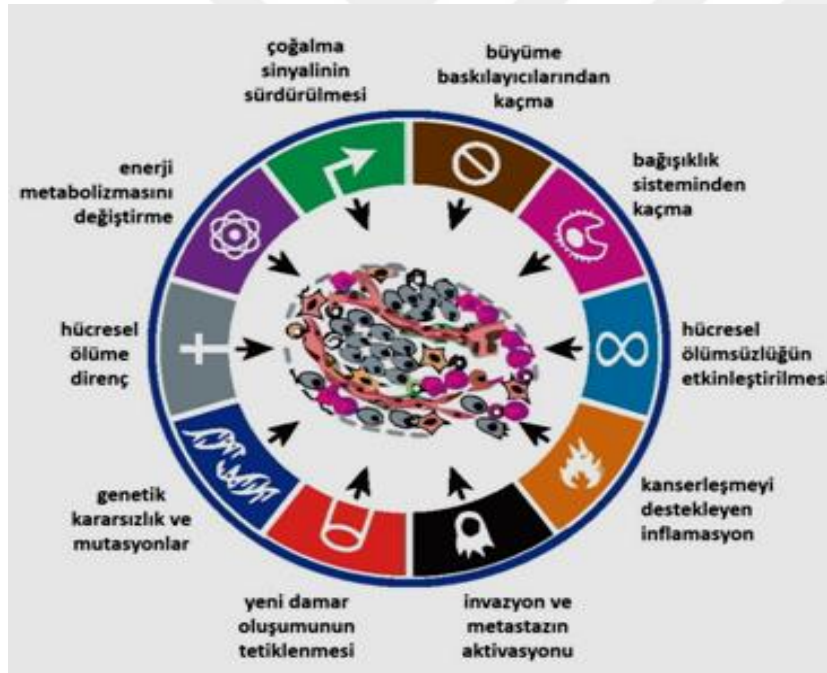
2.1. Kanser

Kanser, normal dokulara sızmak ve onları tahrip etmek için doğal sınırlarının ötesine geçen, anormal hücrelerin gelişimi ile karakterize karmaşık bir hastalıktır. Normal bir hücrenin malign bir hücreye transformasyonu, genetik ve epigenetik değişiklikleri içeren çok aşamalı bir süreçtir [1]. Çok aşamalı bu süreç, kanserojenez olarak adlandırılır.

In vivo modeller ile yapılan karsinojenez çalışmalarından elde edilen kanıtlar; başlangıç (inisiyasyon), artış (promosyon) ve ilerleme (progresyon) olarak tanımlanmış üç farklı karsinojenez aşamasının, neoplastik hücrelerin gelişiminden çok daha önce ortaya çıktığını göstermiştir [2]. İnisiyasyon, onkogenik yolların aktivasyonu ve apoptotik yollar ile DNA onarım mekanizmalarının inaktivasyonuna neden olabilen, bir hücrede geri dönüşümsüz genetik değişikliklerin uyarılmasıdır. İnisiyasyon aşaması, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu DNA zincirindeki kopmalar-eklentiler ve diğer lezyonları içeren DNA hasarlarını indükleyebilen endojen veya eksojen kanserojen maddeler tarafından tetiklenebilir. Genel olarak, reaktif bir kimyasal madde nükleotidlerin yapısını değiştirerek DNA'da etkin onarımı ortadan kaldırır ve, DNA replikasyonu sırasında mutasyonlar meydana getirir. Artan DNA hasarına neden olabilen veya katkıda bulunabilen kanserojenler arasında ultraviyole ışınımı, Hepatit B gibi virüsler, safra tuzları ve sigara dumanında bulunan kimyasallar sayılabilir [3]. Promosyon aşaması, bir preneoplastik tümör popülasyonu üretmek için başlatılan hücrenin klonal genişlemesidir. Mutasyona sahip hücrelerin çoğalması, genellikle mutajenik olmayan mitojen ajanlar ile uyarılır. Örneğin androjenler, tümörogenezi artırıcı özelliklere sahip olduğu gösterilen ajanlardandır [4]. Progresyon aşaması ise, preneoplastik hücrelerin bir kısmının daha fazla genetik ve epigenetik değişikliklere uğradığı, çoğalma, yayılma ve metastazda artış gösteren malign hücrelere dönüştüğü geri dönüşümsüz bir süreçtir [5].

Kanser biyolojisini anlamak için yapılan çalışmalar sonucunda, kanser hücrelerine karakteristik önemli özellikleri keşfedilmiştir. Kanser hücreleri, normal hücrelerde

doğal bir süreç olan apoptotik yollara dirençlidirler. Ayrıca, angiogenez denilen süreç ile, yeni kan damarları oluşturulmasıyla beslenmeyi sürdürürler. Proliferatif sinyaller hep aktiftir ve sınırsız olarak büyümeyi ve bölünmeyi sürdürürler. Tümör baskılayıcıların mutasyonlar ile inaktivasyonu sonucu, onkogen aktivasyonu ile büyüme baskılayıcılardan etkilenmezler. Metastaz ve invazyon kapasiteleri oldukça yüksek olduğundan, dolaşım yolu ile yeni odaklarda yayılma imkanı bulurlar. Ayrıca, normal hücrelerde görülen belirli miktarda çoğalma sonucu gözlenen kontak inhibisyona duyarsızdırlar. Kanseri hücreleri, yüksek telomerase aktivasyonu sonucu sınırsız bölünme kapasitesine sahiptir. Oldukça hızlı bölünme yeteneklerinden dolayı yüksek miktarda enerjiye ihtiyaç duyan kanser hücreleri, enerji metabolizmalarını değiştirerek Warburg etkisi olarak bilinen mekanizma ile glikozu kullanarak devamlı enerji üretirler [2].



Şekil 2.1. Kanseri hücrelerinin temel nitelikleri [2]

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın raporuna göre kanser, dünyadaki ikinci önde gelen ölüm nedenidir ve 2018'de tahmin edilen 9,6 milyon ölüm kanser kaynaklıdır. Yaklaşık olarak, 6 ölümden 1 tanesi kanser nedenidir. [6]. Yine WHO'nun 2014 verilerine göre, Türkiye'de erkeklerde kansere bağlı ölümlerin sayısı 58 bin 400, kadınlarda ise 32 bin 500 olarak rapor edilmiştir [7]. Bu nedenle, kanser riskinin

azaltılması, önlenmesi, erken teşhis ve etkili tedavisine yönelik çabalar konusunda araştırmalar önem arz etmektedir.

2.2. Prostat Kanseri

Prostat kanseri, dünya çapında akciğer, meme ve barsak kanserlerinin ardından en sık teşhis edilen kanser tipidir. Amerikan verilerine göre, cilt kanserinden sonra, prostat kanseri Amerikalı erkeklerde en sık görülen kanserdir. Amerikan Kanser Derneği'nin tahminlerine göre, 2018'de ABD'de yaklaşık 164.690 yeni prostat kanseri vakası ve prostat kanserinden yaklaşık 29.430 ölüm olacağı şeklindedir [8]

Ülkemizde Kanser Dairesi Başkanlığının 2014 yılı verilerine göre prostat kanseri erkeklerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada görülmektedir ve insidansı 100.000'de 32.9'dur [9].

2.3. Prostat Kanseri Risk Faktörleri

Dünyada prostat kanseri insidansı ve mortalite oranlarında önemli farklılıklar vardır. İnsidans oranlarındaki bu farklılık, genetik, çevresel ve sosyal faktörlerin kombinasyonuna bağlanabilir. Yaş, ırk ve aile öyküsü en önemli risk faktörleri iken, diyet ve yaşam tarzı da potansiyel risk faktörleri olarak tanınmaktadır [10].

Prostat kanseri, 40 yaşın altındaki erkeklerde oldukça nadir görülen ve daha sonra yaşamın her on yılında görülme sıklığıyla hızla arttığı için yaşlı erkeklerin hastalığı olarak kabul edilir. Prostat kanserinin premalign evresinden invaziv formuna ilerlemek on yıllar alabildiği bilinmekle birlikte, gelişmiş ülkeler prostat kanseri tarama programları ile hastalığın çok daha erken bir aşamada tespit edilebileceği için tanı yaşının düşmesi de muhtemeldir [10].

İrk, prostat kanseri gelişiminde ikinci önemli risk faktörüdür. Siyahi ırktakilerin diğer etnik gruplarla karşılaştırıldığında prostat kanseri görülme sıklığı daha yüksektir. Ayrıca, prostat kanseri siyahi erkeklerde beyaz ırktaki akranlarına göre daha genç yaşta teşhis edilmektedir. İrksal farklılıkların araştırıldığı çalışmalar, siyah erkeklerde beyaz erkeklere kıyasla artmış 5-alfa redüktaz aktivitesi ve

dihidrotestosteron seviyelerinde görülen testosteron metabolizmasında belirgin farklılıklar göstermiştir. Ayrıca, androjen reseptöründe gözlenen farklılıkların da siyah erkeklerde prostat kanseri sıklığında da rol oynayabildiği düşünülmektedir [11].

Ailede prostat kanseri öyküsü, prostat malignitelerinin gelişimi için bir başka önemli risk faktörüdür. Prostat kanseri vakalarının% 5-10'unun aile öyküsü ve prostat kanserine yatkınlık genlerinin kalıtımı ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Etkilenen birinci derece akraba 65 yaşından küçük bir yaşta teşhis edilirse veya eğer herhangi bir yaşta birden fazla birinci derece akraba teşhis edilmişse risk daha da artar. Ek olarak, biyolojik annesi meme kanseri olan erkeklerde artmış bir prostat kanseri riski bulunduğu dair kanıtlar vardır. Aynı ailedeki prostat ve meme kanserleri arasındaki bu ilişki, BRCA1 / BRCA2 genlerindeki mutasyonların varlığına bağlanabilir. Kalıtsal prostat kanseri vakalarında ayrıca, kromozom 1 üzerinde yer alan RNASEL genini inaktive edici mutasyonlar da gözlenmiştir [12,13].

Diyet ve yaşam tarzının prostat kanseri insidansını etkileyebileceğini, ABD'ye yerleşen Asya kökenli erkek göçmenlerde prostat kanseri insidansının, kendi ülkelerine göre daha yüksek olduğunu gösteren karşılaştırmalı epidemiyolojik çalışmalar ortaya koymuştur. Yüksek yağ içerikli batı diyetinin, prostat karsinogenezinde rol oynadığı belirtilmiştir. İn vitro ve in vivo çalışmalarda, yüksek yağlı diyetle maruz kalmanın bir sonucu olarak prostat kanseri hücrelerinin çoğaldığı gösterilmiştir. Vaka kontrolü ve prospektif kohort çalışmaları da yüksek diyetisel yağ tüketimi ile prostat kanseri arasındaki bağlantıyı desteklemiştir. Ek olarak, birkaç çalışmada yüksek alfa-linolenik asit alımı ile artan bir prostat kanseri riski gösterilmiştir. Bu bağlamda, prostat kanseri insidansı ve mortalite riski ile bağlantılı olması nedeniyle obezite önemli bir faktördür [14].

2.4. Prostat Bezi Yapısı ve Fonksiyonu

Prostat, mesanenin altına yerleşik ve üretrayı çevreleyen, ceviz kadar büyüklükte bir salgı organıdır. Prostat, üretrayı katmanlar halinde saran sırayla transisyonel, santral ve periferik zonlardan oluşur. Transisyonel zon sfinkterik bir işleve hizmet ederken, santral ve periferik zonlar prostatın sekretuar işlevinden sorumludur.

Transisyonel zonda genelde 50 ve üstü yaştaki erkeklerde gelişen ve alt idrar yolu semptomlarına neden olan benign prostat hiperplazisi (BPH) ortaya çıkar. PCa, ilk olarak periferik zondan gelişir. Prostat bezinin asıl işlevi, semen bileşenlerinden biri olan prostat sıvısını salgılamaktır. Prostat bezinin kasları da, bu seminal sıvının ejakülasyon sırasında üretraya itmesini sağlar. Ejakülasyon sırasında milyonlarca sperm, testislerden vas deferens yoluyla prostat alanına doğru hareket eder. Bu noktada prostat, mesane ve idrar yolu arasındaki açıklığı kapatarak, idrar yolundaki sıvıyı serbest bırakıp spermi ilerleterek kasılır. PCa için biyobelirteç olan prostat spesifik antijen (PSA), sperm hareketine yardımcı olmak için spermi sıvılaştıran bir serin proteazdır. Salgılama fonksiyonuna ek olarak, prostat ayrıca kanda bulunan maddeleri prostatın bazal kısmından lümene taşır. Testise açılan bir kapı olarak prostat, bir erkeğin yaşamı boyunca çevresel olarak bakteri ve virüslere maruz kalmanın neden olduğu önemli bir inflamasyon bölgesidir [15,16].

2.5. Prostat Kanserin Tanısı

Herhangi bir kanser tarama programının amacı, kanseri metastazdan önceki erken aşamalarında tespit etmek ve böylece genel hastalığa özgü mortaliteyi azaltmaktır. Prostat kanserinde tanı genel olarak PSA tanısı, digital rektal muayene ve histopatolojik analiz yöntemleri ile saptanmaktadır. Bu tekniklerin belli ölçüde sınırlamaları olduğundan risk değerlendirilmesinde, hasta tedavi takibi ve sağkalımında önem arz edecek yeni biyobelirteçler araştırılmaktadır. Günümüzde oldukça yaygın uygulanabilen PSA testi son otuz yılda prostat kanserinin tanısında büyük yer almıştır. PSA testinin yaygınlaşması ile birlikte batılı ülkelerde prostat kanserinin tanısında da artış gözlemlenmiştir. Kallikrein ilişkili bir serin proteaz olan PSA, prostatın sekresyon ürünü olup, prostatın doğal yapısının bozulması sonucu kandaki düzeyi artar ve sonucunda biyopsi gerekir [17,18].

2.6. Prostat Kanserin Moleküler Patogenezi Ve Progresyonu

Lokal olarak sınırlı hastalık için prognoz, cerrahi rezeksiyon veya radyasyon tedavisi ile yapılan tedavi için olumludur. Prostat kanserinin her aşamasında, nükleer bir reseptör olan androjen reseptörü aktivitesi önemli rol oynar ve bu nedenle, invaziv hastalık için tedavi seçenekleri, bu yolu hedeflemeye dayanır. Genellikle direkt AR

antagonistleriyle birleştirilmiş androjen deprivasyon tedavisi, yayılmış hastalık için standart tedavidir ve hastalara 24-36 aylık regresyon sağlar [19]. Bununla birlikte, başlangıçta uygulanan etkili tedavi seçeneklerine rağmen, AR'nin anormal reaktivasyonu nedeniyle nükseden PCa kastrasyona dirençli prostat kanseri (KDPK) olarak adlandırılır. KDPK'ne progresyon aynı zamanda hücre döngüsü ilerlemesiyle birlikte kontrolsüz proliferasyonu ileten sinyal yollarındaki bozulmalar da artar. Neoplastik büyümeyi destekleyen ve tedavi edilemeyen KDPK oluşumunu teşvik eden moleküler mekanizmaları anlamak, etkin tedavi seçenekleri geliştirmek için çok önemlidir [19].

Gelişen prostat bezi, stroma ile çevrili lümen ve bazal epitel hücre katmanlarından oluşur. Lümenal epitel hücreleri, prostat lümeni düzenleyen polarize kolumnar hücrelerdir ve bazal hücreler, lümeni stromadan ayıran uzun hücrelerdir. Bu hücreler, çeşitli hücresel belirteçlere dayanarak patolojik olarak ayırt edilebilir. Örneğin, lümenal epitel yüksek düzeyde AR ifade eder ve sitokeratin 8 ve 18, CD57 ve NKX3.1 için pozitifdir. Bazal epitel hücreleri düşük AR seviyeleri ifade eder ve sitokeratin 5 ve 14, p63, CD44 ve GSTP1 için pozitiflik gösterir [19,20].

Her ne kadar prostat kanserinin prostat epitelyal hücrelerinden geliştiği fikri kabul görse de, tümörlerin bazal hücrelerden mi yoksa lümenal epitel hücrelerden mi kaynaklandığı konusunda çelişkili kanıtlar vardır. Prostat organı sıklıkla kanserin varsayılan öncüsü olan prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) lezyonlarının yanı sıra çoklu tümör odaklarını da içerir. Tümörler geliştikçe, daha küçük kanal yapılarıyla giderek daha az organize olurlar ve sonuçta bu yapıları tamamen kaybedebilirler. Büyüme ile birlikte, tümörler çevre dokuları istila eder ve lenf bezlerine, mesaneye ve kemiğe metastaz yapar. PCa ile bir takım delesyonlar, amplifikasyonlar ve daha yakın zamanda, genomik translokasyonlar ilişkilendirilmiştir. Bunlardan bazıları AR'nin aktivitesini / yapısını değiştirir, bazıları AR tarafından düzenlenir ve diğerleri AR sinyalinden bağımsızdır [21,22].

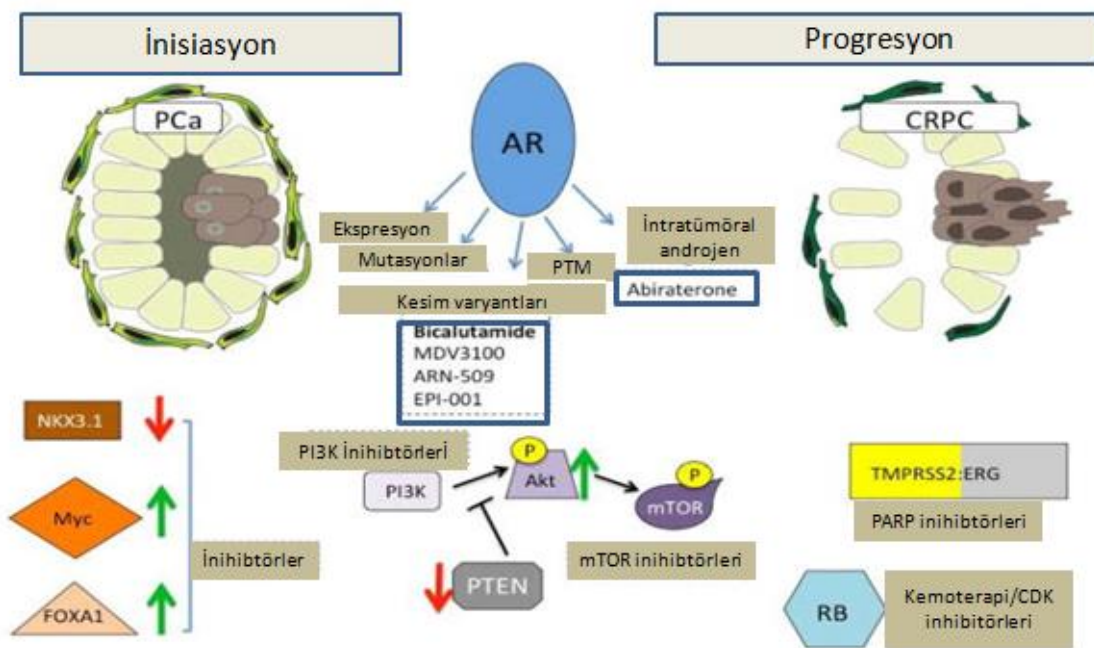
PCa'deki en sık regülasyonu bozulmuş yollardan biri, büyümeyi arttırmada ve apoptozu bloke etmede kritik bir rol oynayan PI3K sinyalizasyon yoludur. Primer PCa'nın yaklaşık % 40'ı ve metastatik PCa'nın % 70'i PI3K / AKT yolunda genomik değişiklikler sergiler. Bunların çoğu, AKT aktivasyonunu sınırlayan bir lipit fosfataz

olan PTEN (fosfataz ve tensin homologu) kaybıyla karakterizedir. Fare modellerinde yapılan çalışmalarda, PTEN'in homozigot delesyonunun, metastaz yapan tümörleri uyarmak için yeterli olduğu gösterilmiştir [19,23].

Füzyon proteinlerinin tekrarlayan kromozomal translokasyonlar yoluyla oluşumu da PCa'de önemli bir faktördür. Bu füzyonların çoğunluğu yalnızca androjen ile regüle edilmiş değildir, aynı zamanda AR'nün füzyonların oluşumunu desteklediğine dair kanıtlar vardır. Tomlins ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, PCa'nın %50'sinden fazlasının TMPRSS2 promotörü ve ETS transkripsiyon faktörlerinin kodlama bölgelerinin kısımları arasında bir gen füzyonu oluşturduğunu bulmuşlardır [24].

TMPRSS2 (transmembran proteaz, serin 2), PCa'de yüksek oranda ifade edilen androjene duyarlı bir gendir. ETS (E-twenty six) protein ailesi üyeleri ise aşırı eksprese edildiklerinde, hücre proliferasyonunu, hücre göçünü, hücre döngüsü kontrolünü ve apoptozu düzenleyerek tümörögenizde işlev gören transkripsiyon faktörleridir. TMPRSS2 ve ERG arasındaki füzyonlar, ETV1 veya ETV4 gibi diğer ETS ailesi üyeleri ile yapılan füzyonlardan çok daha yaygındır. Bu durumun olası nedeni, TMPRSS2 ve ERG'in, aynı kromozom üzerinde yaklaşık 3 Mb ayrı yerleşimde olmasıdır, oysa diğer ETS faktörleri, farklı kromozomlar üzerinde yer almaktadır. AR'nün bu füzyonların oluşumunu kolaylaştırdığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Normal prostat epitel hücrelerine DHT uygulamasının, FISH ile ölçülen TMPRSS2 ve ERG'nin ko-lokalizasyonunu indüklediği de gösterilmiştir. Füzyonun ifadenmesinin, invazyon ile ilişkili genlerin ifadesini arttırdığı konusunda iyi bir fikir birliği vardır. Bazı araştırmacılar, protein düzeyindeki ekspresyonun baskılanmasının in vitro çoğalmayı azalttığını göstermişlerdir. Birkaç araştırma grubu ise, füzyon proteinlerinin fare prostatındaki yapay ekspresyonunun, tümör üretmek için yetersiz olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte, ETS faktörü ekspresyonu ile kombine olarak artmış PI3K sinyalinin tümörögenizde rol oynadığı da gösterilmiştir [24,25,26]. Ayrıca, füzyon ifadenmesi ve PTEN delesyonu birlikteliğinin hastalarda biyokimyasal rekürrens bulgusu olan artmış serum PSA düzeyi için prediktif olduğu da belirtilmiştir [27].

Bir çok kanserde onkogenler veya tümör baskılayıcıların protein düzeyinde ekspresyonlarının değişmesine neden olan bir takım genel genomik değişiklikler meydana gelmektedir. Prostat kanserinde c-myc'in amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu yaygındır. Hem p53 hem de Rb ekspresyonunda kayıp veya inaktivasyon meydana gelmektedir, ancak bu durum, primer tümörlerden ziyade metastatik tümörlerde daha yaygındır. Daha da önemli olarak, AR'ünde ve AR işlevini modüle eden proteinlerde de çeşitli değişiklikler vardır [19,28].



Şekil 2.2. Prostat kanserinin başlaması ve ilerlemesinde yer alan moleküler değişikliklerin özeti [19].

2.7. Androjen Reseptörünün Yapısı, Fonksiyonu ve Gelişimdeki Rolü

AR, transkripsiyon faktörlerinin süper ailesinin bir nükleer steroid reseptörü üyesidir ve NR3C4 (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 4) olarak sınıflandırılır. AR geni, Xq11-12 bölgesinde lokalizedir. Bu nedenle, erkekler genin tek bir kopyasına sahiptir ve inaktive edici mutasyonlar androjen duyarsızlık sendromu (AIS) ile sonuçlanır [29].

AR, yaklaşık 919 amino asitlik bir proteini kodlayan sekiz ekzon içerir [30]. Uzunluktaki varyasyon, değişken uzunluktaki bir poliglutamin tekrarının ve değişken bir poliglisin tekrarının bir sonucudur. Her iki tekrar da ekson 1 tarafından kodlanan amino terminal bölgesindedir ve bu nedenle literatürdeki amino asit numaralandırması tutarsız olabilir. Daha kısa glutamin tekrarları tipik olarak çoklu hücre tiplerinde daha yüksek transkripsiyonel aktivite seviyelerine neden olur. Daha az CAG tekrarı olan AR'ne sahip erkeklerde, PCa riskinin daha yüksek olduğuna dair bazı kanıtlar vardır [29,31].

Çoğu nükleer reseptör gibi, AR de farklı fonksiyonel motiflerden oluşur. Bunlar; amino terminal domain (ekzon 1 tarafından kodlanan NTD), DNA'ya bağlanan domain (ekzon 2 ve 3 tarafından kodlanan DBD), bir menteşe bölgesi (ekson 4'ün 5' kısmı tarafından kodlanan Hinge bölgesi ve bir ligand'a bağlanan domain (Ekzon 4 ila ekzon 8'in kalanı tarafından kodlanan LBD) olarak üç kısımdan oluşur [32].

Ligandına bağlanmamış AR etkin değildir bu nedenle ısı şok proteinleri (HSP) adı verilen sitoplazmik şaperonlara bağlanır [30,33]. Dolaşımdaki esas androjen olan testosteron testislerde üretilir. Prostatta ve sınırlı sayıdaki başka dokularda, testosteron 5 α -redüktaz enzimleri tarafından dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülür. Her ne kadar testosteron ve DHT ikisi de AR'ne bağlanıp aktivasyonunu sağlasa da, DHT'nin AR için daha yüksek bir afinitesi vardır ve prostattaki birincil androjendir. Hormon bağlanması, sitoplazmik şaperonların ayrışmasıyla sonuçlanan ve nükleer lokalizasyon sinyalini açığa çıkaran bir konformasyonel değişime neden olur. Hormona bağlı AR, dimerize olup nükleusa transloke olduktan sonra DNA dizilerine bağlanıp hedef gen ekspresyonunu düzenlemek için bir dizi transkripsiyonel yardımcı düzenleyiciler ile etkileşime girer. AR yardımcı düzenleyicileri olarak 150'den fazla protein tanımlanmıştır. Bunlar, p160 (SRC-1, SRC-2 / TIF2, SRC-3 / AIB1) familyası, p300 / CBP, ARA54, ARA55 ve ARA70 olmak üzere diğer birçok proteini içerir. Yardımcı düzenleyicilerin çoğu, transkripsiyonu kolaylaştırmak için kromatin yapısını açmada görev alan histon asetil transferazlar, metil transferazlar ve kinazlar gibi enzimlerdir. En iyi bilinen mekanizmada, bir AR dimeri konsensüs DNA bağlama dizisine bağlanır ve transkripsiyonu aktive etmek için bir dizi yardımcı düzenleyiciyi bir araya getirir. Ayrıca, bu dimer doğrudan DNA'ya bağlanmadan, diğer transkripsiyon faktörleriyle

etkileşime girerek de transkripsiyonu düzenleyebilir. AR'nün ayrıca diğer hedef genlerin transkripsiyonunu henüz tam aydınlatılmamış mekanizmalar ile baskıladığı da bilinmektedir. Ligand bağlanması ile AR ayrıca hedef gen dizilerine bağlanmaksızın çeşitli kinazları aktive ederek transkripsiyonu düzenleyebilir [29,30,34].

AR normal prostat gelişimi ve fonksiyonu için hayati önem taşıyan gen ekspresyonunu düzenler. Ürogenital sinüs mezenkimindeki (UGM) stromal AR, prostat gelişiminin başlaması için parakrin sinyalleme yoluyla duktal morfogenezini düzenler [35]. Doku rekombinant deneyleri, androjen duyarsız (Tfm) farelerden alınan mesane epitel hücreleri ile birleştirilmiş AR pozitif farelerin UGM'sinin stromal hücrelerinin, bir prostatın karakteristik glandüler yapılarını ürettiğini, ancak dorsolateral fare prostatının salgıladığı androjen bağımlı proteinlerin tam olarak üretilmediğini göstermiştir. Bununla birlikte, tersi kombinasyonda, androjenlerin varlığında bile farelerde prostatik gelişme göstermediği gözlenmiştir. Bu durum, prostat gelişiminde mezenkimal AR'nün çok önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Stromal AR, normal gelişen prostatta epitel hücre proliferasyonu, sağkalım ve farklılaşmanın anahtar bir modülatörü olarak işlev görür. Normal bir prostatta, AR tüm lümen hücrelerinde ve bazı epitelyal bazal ve ara hücre tiplerinde ve ayrıca stromal hücrelerde eksprese edilir. Epitel hücreleri, stromal hücrelerden salgılanan androjen kaynaklı büyüme faktörlerine bağlıdır. Epitelyal AR'nün birincil rolü, prostatın karakteristiğini oluşturmak için sekrete edilen proteinlerin üretimi gibi görünmektedir. İlginç bir şekilde AR, hem lümenal hücrelerin hayatta kalma faktörü olarak hem de bazal hücre proliferasyonunun bir baskılayıcısı olarak işlev gören bir büyüme uyarıcı ve inhibitör rolü oynayarak normal prostat gelişimini sıkı bir şekilde düzenler [29,35,36].

Prostat kanserindeki rolünün aksine, normal prostat epitelindeki AR proliferasyonu inhibe eder ve farklılaşmayı destekler. Olgun prostat, bazal, lümen ve küçük bir yüzdedeki nöroendokrin hücreden oluşur. Bazal hücreler AR negatif, androjenden bağımsız ve lümen hücrelerinden daha az farklıdır. Bazal hücreler ayrıca yüksek proliferatif ve düşük apoptotik fraksiyon sergilerler. Aksine lümenal hücreler, AR-pozitif, androjene bağımlıdır ve prostat spesifik antijen (PSA) ve prostatik asit fosfataz (PAP) gibi farklılaşma markerlarını ifade etmesi açısından oldukça farklıdır.

Prostat kök hücresi, kök hücre popülasyonunu yenilemek ve kendi kendini yenileyebilme yeteneğine sahip geçici çoğalan hücreler üretmek için asimetrik olarak bölünür. Geçici çoğalan bu hücreler, lümenal ve nöroendokrin hücrelere farklılaşır [37].

Androjenler embriyonik gelişim, puberte, fertilité ve erişkin homeostazında kilit rol oynarlar. AR için bir ligand olarak bu işlevlerini gerçekleştirirler. Ergenlikten önce erkekler, vücuttaki değişikliklerin testislerde Leydig hücrelerinden sentezlenen testosteron yerine, DHEA ve ACTH gibi adrenal androjenler tarafından yönlendirildiği adrenarş denilen bir sürece maruz kalır. Bu değişiklikler kasık ve koltuk altı kıllarındaki artışla belgindir. Tersine, ergenlikle ilişkili olgunlaşma testosteronun androjenik ve anabolik etkilerinden kaynaklanır. Ergenlik, testislerin ve penisin genişlemesi, vücut kıllarının büyümesi, gırtlakın genişlemesi ve sesin derinleşmesi, artmış kemik ve kas kütlesi, boy, davranış değişiklikleri ve spermatogenez ile belgindir.

Testosteron, ergenlik döneminde kemik kitlesinin birikmesi, ve kemik sağlığının korunması için önemlidir. Testosteron osteoblast hücre sağkalımını ve proliferasyonunu artırır, bu da kemik emilimini azaltır, formasyonu artırır ve kemik kütlesinin korunmasına yardımcı olur [37,38].

Androjenlerin prostattaki normal fonksiyonlarını ve lümen epitel hücrelerinin farklı fonksiyonlarını düzenlemek açısından önemli olan AR, prostat spesifik antijen gibi seminal sıvı proteinlerini kodlayan birçok geni, yüksek düzeyde protein ve lipid sentezini desteklemek için gerekli metabolik yollarda bulunan çoklu genleri indüklerken, normal prostat lümen epitel hücrelerinin çoğalmasını uyarmaz. Bununla birlikte AR, PCa gelişimini ve PCa hücre hatlarındaki androjen yoksunluğunu açıkça uyarabilir ve G0 / G1 hücre döngüsünün durmasına da neden olur [39].

AR ayrıca prostat stromasındaki hücre alt grupları tarafından zayıf bir şekilde eksprese edilir ve bu hücrelerde AR'nün keratinosit büyüme faktörü veya fibroblast büyüme faktörü gibi büyüme faktörlerinin ekspresyonunu stimüle edebileceği de belirtilmektedir. Bu mekanizma sayesinde, stromal hücrelerdeki AR, epitelin

büyümesini dolaylı olarak düzenleyebilir ve bu stromal faktörlerin kaybı kastrasyon sonrası prostat involüsyonuna da katkıda bulunabilir [37].

2.8. Androjen Reseptör Varyantları

1941 yılında Huggins ve Hodges, metastatik prostat kanserli hastaların tedavisinde hormonal manipülasyonun klinik etkinliğini göstermişlerdir. Yayımladıkları ilk çalışmalarında, terapötik yanıtı değerlendirmek ve hastalık ilerlemesini izlemek için prostatik asit fosfataz (PAP) adlı bir serum biyobelirteç kullandıklarını belirtmişlerdir. Günümüzde cerrahi veya kimyasal kastrasyonları içeren androjen deprivasyonu tedavisi, ileri prostat kanserli hastalar için bakım standardıdır ve serum prostat spesifik antijen (PSA) seviyeleri, tedavi yanıtı ve hastalık ilerlemesinin bir göstergesi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. ADT ile tedavi edilen metastatik prostat kanseri olan erkeklerde, kastrasyona dirençli prostat kanserine ilerleme neredeyse her zaman değişken bir klinik yanıt süresinden sonra meydana gelir, ancak literatürde ADT'nin metastatik prostat kanseri hastalarının küçük bir alt grubunda tam remisyon ve uzun vadede sağkalım süresine (> 10 yıl) yol açabileceğini gösteren önemli istisnalar da bildirilmiştir. Benzer şekilde, bir biyobelirteç olarak serum PSA, terapötik yanıtın ve ADT'yi takiben hastalık ilerlemesinin değerlendirilmesinde önemli bir rol oynamasına rağmen, metastatik prostat kanserli erkeklerde prognostik ve prediktif yararı çok sınırlıdır ve ADT'ye direnç belirtici değildir [40,41].

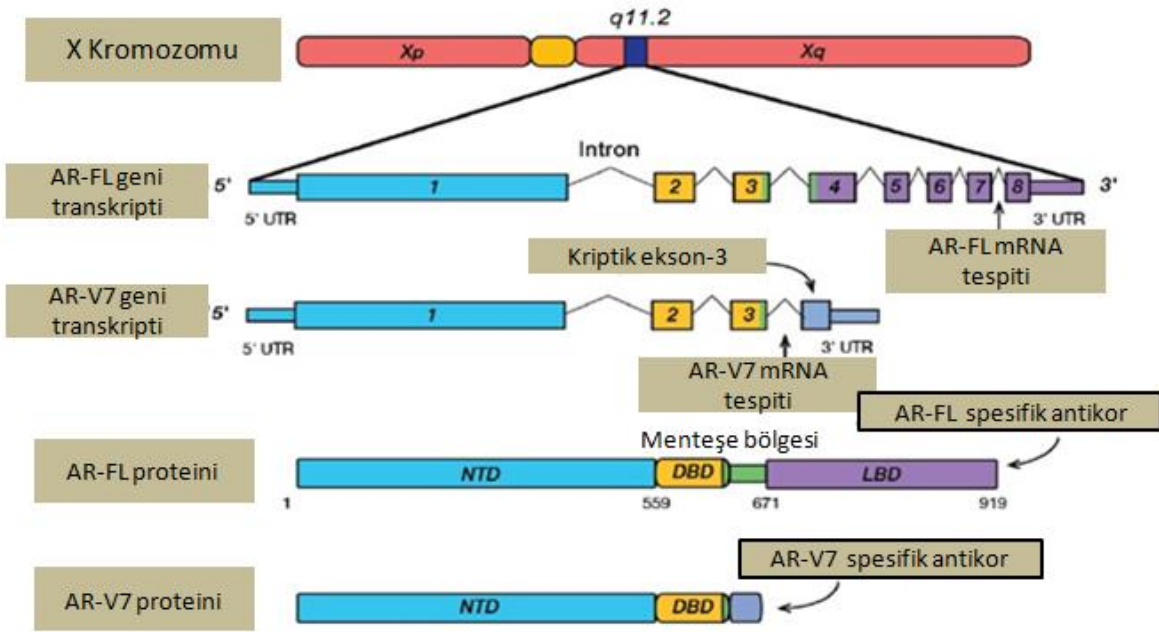
Esas olarak, KDPK'de sürekli androjen reseptörü sinyalinin önemini destekleyen kanıtlar temel alınarak, metastatik KDPK (mKDPK) hastalarını tedavi etmek için yeni AR-hedefleme tedavileri geliştirilmiştir. AR sinyalleme sisteminin mKDPK için kilit rolü olduğu bilinen bir görüştür [42]. Dolaşımdaki androjenlerin kastre seviyeleri altında, AR sinyalizasyonu öncelikle gonadal olmayan androjenlerin yanı sıra AR proteininin aşırı ekspresyonu tarafından sürdürülür. Bu kavramsal çerçeve, erken genom çalışmalarından elde edilen bulgular ile desteklenmiştir ve ligand sentezini daha fazla baskılamak (Abirateron) veya AR aşırı ekspresyon setinde AR'nü bloke etmek için (Enzalutamid) tasarlanan KDPK tedavilerinin başarılı klinik gelişimine doğrudan katkıda bulunmuştur. Abirateron ve Enzalutamid, FDA tarafından sağkalım yararı temelinde metastatik KDPK'nin kemoterapi ile kombine veya tekli tedavisi için

onaylanmıştır. Abirateron, hem dolaşımdaki hem de intratümöral androjen seviyelerini etkili şekilde azaltan seçici bir CYP17A1 inhibitörüdür. Enzalutamid ise, yüksek AR afinitesi nedeniyle AR sinyalini güçlü şekilde baskılayan bir AR antagonistidir. Bu iki ilaç, mKDPK'li hastalar için tedavi seçeneklerini genişletmesi yanında hastalık sonuçlarını da gerçekten iyileştirmiştir ve prostat kanseri tedavisinin klinik görünümünü hızla değiştirmişlerdir. Bununla birlikte, önemli bir KDPK hasta grubunun bu iki ilaca karşı direnç gösterdiği ve ayrıca tedavi edilen hastaların da çoğunluğunun tedavi süresince edinilmiş direnç geliştirdiği gözlenmiştir. Terapi verilmeden önce hastanın dirençli olup olmadığını bilmek açık bir klinik fayda olsa da, tedavi seçiminde birincil veya kazanılmış direnci belirtmek için şu anda mevcut biyobelirteç bulunmamaktadır. Abirateron ve enzalutamide direnç geliştiren hastaların çoğundaki PSA seviyelerinde artışla birlikte ilerleyerek, AR sinyalizasyonunun bu güçlü inhibitörlerine rağmen, AR sinyalinin tekrar aktivasyonuna işaret ettiği açıktır [42-45]. Anormal AR fonksiyonunun aktivasyonu ilaca direnç sağlamaktadır.

AR uç-birleştirme (splice) varyantları (ARVs), AR'de görülen aberasyonlar için esas nedenlerden olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. AR varyantları, ligand-bağlanmayan kesilmiş AR molekülleridir ve abirateron ve enzalutamid dahil olmak üzere mevcut tüm AR yönelimli tedavilerin temel hedefi olan liganda bağlanan domaini eksik olup (LBD), AR fonksiyonu için gerekli olan N terminal alanını ve DND bağlanma alanını korur. AR varyantları, ligand yokluğunda veya enzalutamid varlığında yapısal olarak aktif AR sinyallemesine aracılık edebilir. Birçok ARV, keşfedilmiş ve karakterize edilmiş olsa da, bunların büyük çoğunluğu için klinik uygunluk belirsizliğini korumaktadır. mKDPK'nde en yüksek ifadenme gösteren AR varyantı olarak bilinen AR-V7, daha kapsamlı olarak araştırılmıştır [46-48].

Son yıllarda AR varyantlarının keşfi, karakterizasyonu ve klinikteki uygunluğu açısından bir takım çalışmalar yapılmıştır. Bu bulgulara dayanarak, AR-V7, göreceli ekspresyon bolluğu, transkripsiyonel aktivitesi ve mKDPK'de saptanabilen bir protein ürününün varlığı nedeniyle, en önemli AR varyantlarından biri olarak tanımlanmıştır. AR geninde, N terminal bölgesi (NTD), DNA'ya bağlanan bölge (DBD), menteşe bölgesi ve liganda bağlanan bölge (LBD) dahil olmak üzere kodladıkları AR protein alanı ile ilgili sekiz ekzon bulunur. AR - V7 mRNA'sı, ilk üç

eksonu, ardından intron 3 içerisinde varyanta spesifik kriptik ekson 3 (CE3)'ü tutar. CE3 bölgesinde oluşan uç-birleştirme, 16 varyant spesifik amino asitten sonra erken translasyon terminasyonu nedeniyle LBD bölgesi kesilmiş bir AR-V7 proteini oluşumu ile sonuçlanır. Tam uzunluktaki AR transkript (AR-FL) ve AR-V7 arasındaki bu yapısal farklılıklar, AR-FL ve AR-V7'nin spesifik olarak tespit edilmesini sağlar [40,47].



Şekil 2.3. Tam uzunluktaki AR ve AR-V7 kesim varyantının transkript yapıları [40].

AR-V7, Johns Hopkins ve Maryland Üniversitesi'ndeki iki bağımsız grup tarafından keşfedilmiştir. Araştırmalar sonucunda, ekson 3'ten sonra kesilen ve bu nedenle ligand bağlayıcı alanları eksik yedi farklı AR kesim varyantı keşfetmişlerdir. AR, AR-V1 ve AR-V7 ekspresyonu, KDPK hastalarında hormon-naif hastalara göre artmış bulunmuş, ancak yalnızca artan AR-V7 ekspresyonu cerrahi sonrası biyokimyasal başarısızlıkla, yani daha önce PSA seviyelerinin yükselmesiyle ilişkiliyken, AR-V7 / AR oranı, AR, veya AR-V1 ekspresyonu nüks için güvenilir olarak prediktif olmadığını belirtmişlerdir [40].

AR-V7, ekson 3'ten sonra kesilir ve tam uzunluktaki AR pre-mRNA'nın intron 3'ünde bulunan kriptik bir ekson 3'e (CE3) eklenir. AR-V7, ekzon 3'ten sonra kesildiği için,

iki taraflı nükleer lokalizasyon sinyali (NLS)'nin ikinci yarısından yoksundur, bu da AR-V7 nükleer lokalizasyonunun nasıl gerçekleştiği sorusunu akla getirmiştir. Chan ve arkadaşlarının çalışmasında, AR-V7'nin CE3 bölgesindeki K629 ve R631'in tam uzunluktaki AR menteşe bölgesinde K629 ve R631 ile aynı hizada olduğunu ve bu rezidülerdeki alanın mutasyonunun nükleer lokalizasyonu azalttığını, ancak yine de AR-V7'yi çekirdekten tamamen dışlamadığını göstermişlerdir. Bu sonuçlar, AR-V7'deki kanonik AR NLS pozisyonundaki iki temel rezidünün, AR-V7 nükleer lokalizasyonu için gerekli olduğunu, ancak AR-V7'nin tam uzunluktaki AR'den farklı olan çekirdeğe lokalize olduğu başka mekanizmaların da olduğunu gösterir [49]. Ayrıca, ligand ile düzenlenmiş bir AR nükleer çıkış sinyali (NES), LBD üzerinde yerleşiktir.

Tam uzunluktaki AR'den farklı olarak, AR-V7'nin nükleer lokalizasyonu ve transkripsiyonel aktivitesi androjen tarafından düzenlenmez ve hem androjen azaltılmış hem de tersi koşullarda yapısal olarak etkindir. AR-V7, PSA gibi normal olarak androjene yanıt veren genlerin ekspresyonunu düzenlerken, tam uzunluktaki AR ile düzenlenen gen alt setine kıyasla proliferatif bir fenotip ile bağlantılı farklı bir gen setini daha güçlü bir şekilde düzenlediğine dair kanıtlar vardır. Bununla birlikte, Li ve arkadaşlarının çalışmasında AR-V7'nin, AR ile aynı genlerin bir alt kümesinin ekspresyonunu düzenlediğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, PSA gibi AR hedefi genlerin ekspresyonu, DHT veya AR-V7 ekspresyonunun artmasıyla sürekli olarak artış göstermiştir. Ayrıca AR-V7 transkripsiyon oranının, AR transkripsiyon oranına bağlı olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur [50].

Hücre hatlarında yapılan çalışmalar, VCaP ve LN95 hücrelerinde androjen ile ARV7 düzenlemesinin benzer olmakla birlikte, 22Rv1 hücrelerinde ARV7'nin ifadesinin daha yüksek olduğu ve protein ifadesinin neredeyse tam uzunluktaki AR'ye eşit ve hormonal değişikliklerden daha az etkilendiği gösterilmiştir [51].

Sekiz ekzondan oluşan androjen reseptörünün ekzon 5,6 ve 7 kısmı delesyona uğramış bir başka varyantı ise AR-V567es olarak tanımlanmıştır. Transgenik farelerle yapılan bir çalışmada bu varyantın karsinogenezi indüklediği ve tümör progresyonunu hızlandırdığı belirtilmiştir. Prostat kanserli hastalar ile yapılan bir

başka çalışmada ise hastaların yaklaşık %30'unda AR-V567es ifadenmesi gösterilmiştir [83].

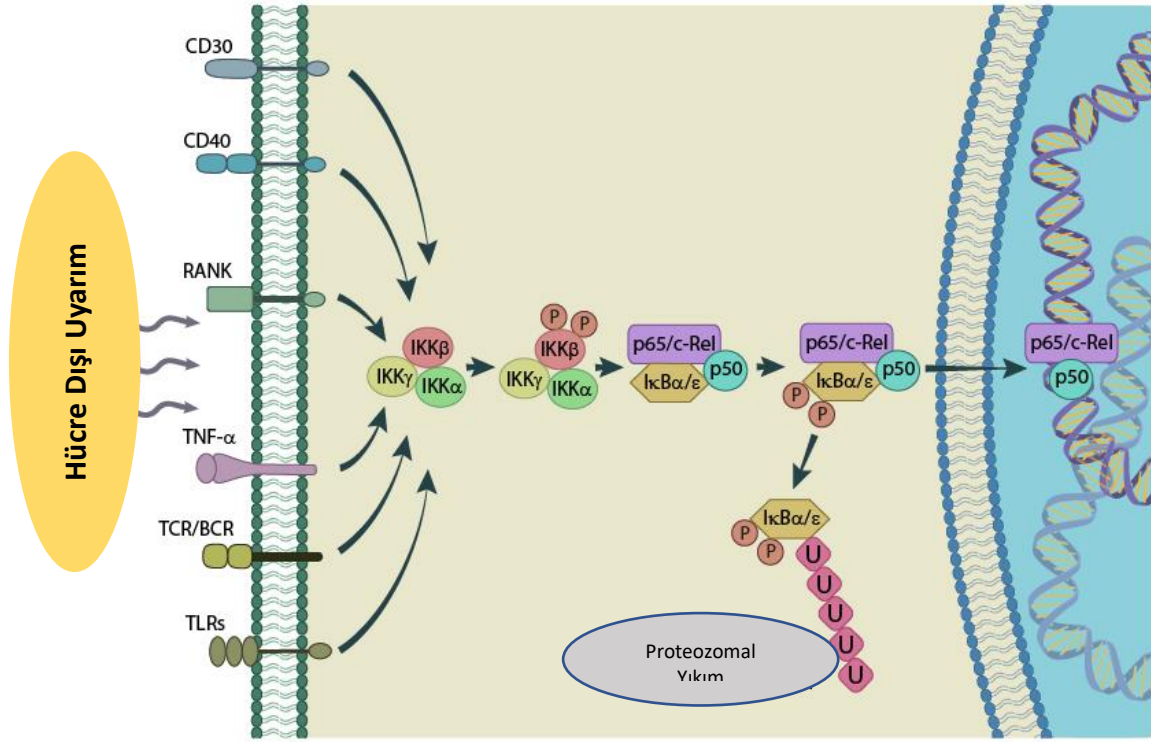
Tam uzunluktaki androjen reseptöründen splicing mekanizması ile oluşan AR varyantlarının ileri evre prostat kanserinde ilaç direnci ve kötü prognoz nedeni olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmeye başlanmıştır. Ancak moleküler düzeyde ilişkili sinyal yolları henüz aydınlatılamamıştır.

2.9. NF- κ B (Nükleer Faktör Kappa-B) Sinyal Yolağı

NF- κ B hücrelerin immün ve inflamatuvar uyarılara verdiği yanıtın düzenlenmesini ve hücrelerin canlılığını sürdürmesinin kontrolünde önemli transkripsiyon faktörleri ailesidir. Bu kontrol kanser kemorezistansı ve onkogenezisini içeren süreçleri içermektedir. Ayrıca anjiogenezi, proliferasyonu, migrasyonu uyarıcı ve apoptozu baskılayıcı rolleri de bilinmektedir. NF- κ B, p50 ve p65 heterodimerlerinden meydana gelir. Sitoplazmada ise NF- κ B'ye bağlı olarak bulunan I κ B (NF Kappa β inhibitörü) proteini NF- κ B'nin nükleusa translokasyonunu ve dolayısı ile hedef genlerinin aktivasyonunu inhibe eder. İyonize radyasyonlar, patojenler, hücre stresler gibi hücre dışı uyarılar sonucu I κ B proteininin fosforilasyonu indüklenir. Bu fosforilasyon ise yıkımına neden olur. Böylece inhibitörü olan I κ B proteininden ayrılan NF- κ B nükleusa transloke olur ve hedef genlerini aktive eder. Hücrelerde NF- κ B yolağının aşırı aktivasyonunun primer prostat kanseri oluşumu ve metastatik kastrasyona dirençli evreye geçişte ilişkili olabileceği çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir [52,54].

AR promotorü üzerindeki çoklu NF- κ B bağlanma bölgelerinin tam uzunluktaki AR ifadenmesinin artışında rolü olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, yüksek NF- κ B sinyalizasyonunun varyant AR oluşumundaki rolü ve AR regülasyonunun bozulması ile metastatik kastrasyona dirençle ilişkisini anlamaya yönelik çalışmalar devam etmektedir. NF- κ B yolağının kemoterapötik ajanlara karşı geliştirilen dirençte de rol oynayabileceği gösterilmiştir [54-56]. Bu nedenlerden dolayı potansiyel bir terapötik hedef olarak görülen NF- κ B sinyal yolağının inhibitörü olarak anti-inflamatuvar ve anti-kanser olarak bilinen BAY11-7082 bu tez çalışmasında kullanılan ajanlardan biridir. BAY11-7082'nin inhibisyon mekanizması, spesifik

olarak IKK (I κ B kinase) aktivitesini ve dolayısı ile I κ B fosforilasyonunu inhibe ederek NF- κ B'nin nükleer translokasyonunu ve hedef genlerinin ifadenmesini önlemek yolu ile olduğu düşünülmektedir. Ayrıca anti-inflamatuvar aktivitesi ile PI3K/Akt gibi çeşitli proliferatif yollara karşı inhibitör özelliği olduğu da rapor edilmiştir [55].

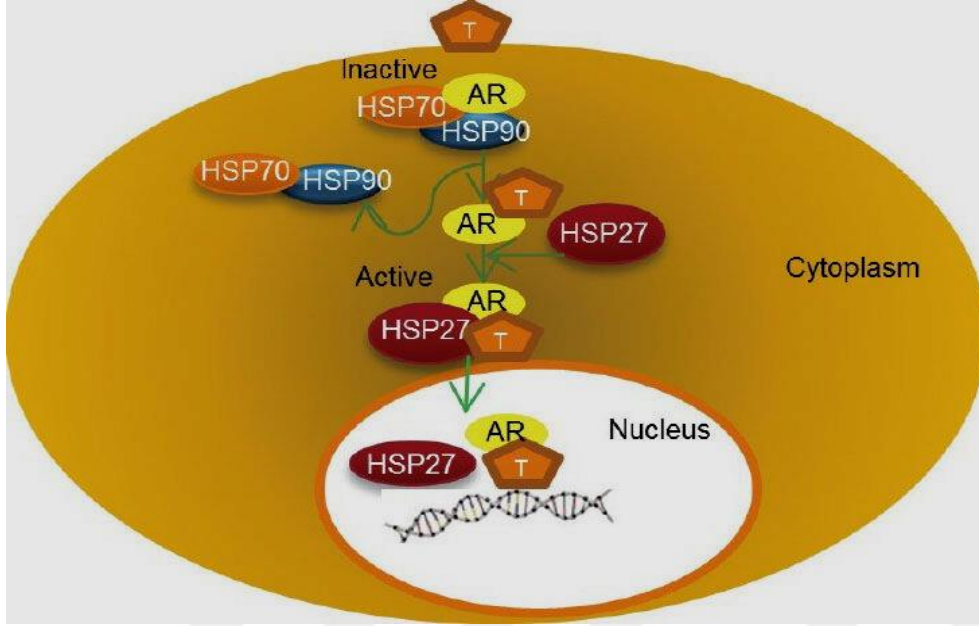


Şekil 2.4. NF- κ B aktivasyonunun şematik gösterimi [53].

2.10. Isı Şok Proteini 27 (HSP-27)

Hormon terapi, radyoterapi, kemoterapi gibi standart kanser terapilerini içeren hücresel streslere yanıt olarak up-regüle olan sitoprotektif şaperon proteinlerin de tedaviye dirençte büyük rol oynadığı bilinmektedir. HSP-27 şaperon proteinleri prostat kanserini de içine alan pek çok kanserde aşırı ifadenmesi belirlenmiştir. HSP'leri, AR gibi pek çok steroid reseptörün katlanmasında, aktivasyonunda, hücre içi trafiğinde ve transkripsiyonel aktivitesinin düzenlenmesinde rol alır. ATP bağımsız çalışan HSP-27, bir kez fosforile olup aktive olduğunda şaperonlayıcı oligomerizasyonu ile hücrede birçok yaşamsal faaliyeti düzenler [57]. Aşırı ekspresyonu kötü prognoz ve kastrasyona direnç süreci ile de ilişkilidir.

HSP-27 gibi şaperonlar AR'nün stabil konumda kalmasında önemli rolleri olan proteinlerdir. AR sinyalizasyondaki rolü son zamanlarda araştırılmaktadır. Yeni jenerasyon inhibitörlerin HSP-27 ekspresyonunu inhibe ederek prostat kanser hücrelerinin gelişimini engellediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [57,58].



Şekil 2.5. Isı şoku proteini-27 (HSP-27) ile androjen reseptörü (AR) arasındaki ilişki [59].

Çalışmamızda kullanılan ikinci ajan KRIBB-3, HSP-27'ye doğrudan bağlanmak yoluyla HSP-27'nin PKC (Protein kinaz-C) bağlı fosforilasyonunu önleyici bir inhibitördür. Yapılan in-vitro ve in-vivo çalışmalarda diğer anti-kanser ajanların etkinliğini artırdığı ve kanser hücrelerinde apoptozu aktive ettiği gösterilmiştir [60,61].

Bu tez çalışmasında, HSP-27 ile NF- κ B yollarının inhibisyonu ve AR-V7 si-RNA aracılı gen susturmasının ilişkili genler olan NF- κ B p65, p-IKK α/β , p-HSP-27, AR, AR-V7 ve AR-V567es genleri üzerindeki etkileri protein düzeyinde prostat kanserli hücre hatlarında incelenmiştir. Çalışmamız, ilk in-vitro aşamada görülen önemli bulgular üzerine, in-vivo olarak da devam etmiştir. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji kliniğine başvuran hastalardan temin edilen total periferik kandan AR, AR-V7 ve AR-V567es genlerinin real-time PCR yöntemi ile RNA düzeyinde ekspresyonları incelenerek hastalığın evresine özgü ifade profillemesi yapılmıştır. NF- κ B yolağı ise

NF- κ B insana-özü ELISA kiti ile incelenmiştir. HSP-27 ekspresyonu da yine HSP-27 ELISA kiti ile protein düzeyinde araştırılmıştır. Metastatik prostat kanserinde gözlenen kemoterapi ve androjen deprivasyon tedavisine direncin altında yatan regülasyonu bozulmuş bu mekanizmaların aydınlatılması, klinikte ve moleküler araştırmalarda önem taşımaktadır.





3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan cihazlar

- Karbondioksitli etüv (Sanyo)
- Laminar kabin (Danlaf)
- Hassas terazi (AND-ER-182A)
- Mikroplaka ELISA okuyucu (Spectramax M3, Molecular Devices)
- Invert mikroskop (Zeiss)
- Cedex hücre sayım cihazı (Innovatis)
- Spektrofotometre (Nanodrop ND-1000), Thermo Scientific)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan)
- Ph metre (WTW 422)
- Elektroforez güç kaynağı (Thermo)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22R)
- Manyetik karıştırıcı (TMA 2071)
- Spin vorteks (Biosan)
- Western Blot aparatları (Biorad)
- Vorteks (Biosan)
- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- Mikropipetler; 10µl, 100µl, 1000µl (Axygen)
- Derin dondurucu -30°C (Sanyo)
- Derin dondurucu -86°C (Sanyo)
- Buzdolabı (Arçelik)

3.1.2. Kullanılan sarf malzemeleri

- Hücre kültürü flaskaları, 25cm² ve 75 cm² (SPL)
- 15ml santrifüj tüpü (SPL)
- 50ml santrifüj tüpü (SPL)
- Hücre kültürü için 96 ve 6 kuyucuklu plate (SPL)

- Hücre dondurma tüpleri (SPL)
- Steril pipet uçları (AXYGEN)

3.1.3. Kullanılan kimyasallar

- Hücre kültürü besiyeri; RPMI 1640 (BIOSERA)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (BIOSERA)
- CS-FBS (BIOSERA)
- Penisilin/Streptomisin antibiyotik (BIOSERA)
- L-Glutamin (Thermo)
- Trypsin (Thermo)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Thermo)
- Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) (SIGMA)
- Etanol (Sigma)
- RIPA Lizis Buffer (SIGMA)
- Phosphate-Buffered Saline (PBS) (Gibco)
- Primerler (AR, AR-V7, AR-V567es, β -aktin) (NZYTECH)
- Trizol Reagent (ABP BIO)
- Amonyum Persülfat (APS) (Amresco)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Amresco)
- Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Amresco)
- Tris base (FISHER)
- Yağsız süt tozu (CST)
- BAY11-7082; NF- κ B inhibitörü -10MG (SANTA CRUZ)
- KRIBB-3; HSP27 inhibitorü (sc-252935) 5 mg (SANTA CRUZ)
- ColorPlus Protein Standardı (NEB)
- BSA Blocking Buffer (BIO WORLD)
- ECL Western Blotting Substrate (THERMO)
- NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) (THERMO)
- PhosSTOP™ 10 tablet (ROCHE)
- PVDF Transfer membrane (SCBT)
- siRNA 0.2 μ mol (DHARMACON)

- siRNA Buffer (FUGENE HD)
- GAPD Control Pool – Human (DHARMACON)
- Transfeksiyon Reagent (THERMO)
- NFkB p65 primer antikor (THERMO)
- Phospho-IKK alpha/beta (Ser180, Ser181) primer antikor (THERMO)
- Phospho-HSP27 (Ser85) primer antikor (THERMO)
- Androgen Receptor primer antikor (THERMO)
- Anti-Androgen Receptor(AR-V7 specific) primer antikor (ABCAM)
- AR-V567es primer antikor (ABCAM)
- β -Aktin primer antikor (CST)
- Bcl-2 primer antikor (THERMO)
- Noxa primer antikor (THERMO)
- Sekonder antikor (CST, THERMO)

3.1.4. Kullanılan kitler

- Hücre Proliferasyon Kiti, WST-1 (Roche)
- Human NF- κ B Elisa kiti (ELABSCIENCE)
- Human HSP-27 Elisa kiti (ELABSCIENCE)
- cDNA Sentez Kiti (WIZBIO)
- Master Mix (WIZBIO)
- BCA Protein Tayin Kiti (Thermo)

3.1.5. Kullanılan solüsyonların hazırlanışı

%10'luk RPMI 1640 besiyerinin hazırlanışı

500 ml' lik besiyeri içerisinde 50 ml çekildi. Ardından sırası ile 50 ml önceden ısı ile inaktive edilmiş FBS, 5 ml 200 mM'lık L-Glutamin, 5 ml 100 μ g/ml'lik antibiyotik karışımı eklendi.

%1'lik RPMI 1640 besiyerinin hazırlanışı

500 ml' lik besiyerinden 5 ml çekildi. Ardından ısı ile inaktive edilmiş 5 ml FBS, 5 ml 200 mM'lık L-Glutamin, 5 ml 100 µg/ml'lik antibiyotik karışımı eklendi.

Hücre lizis solüsyonunun hazırlanışı

10X konsantrasyondaki solüsyondan 1ml alınıp distile su ile 10 ml'e tamamlandı. Bu şekilde 1X'lik çalışma solüsyonu hazırlandı.

PMSF solüsyonu

0,3484 gr PMSF hassas terazide tartıldı ve 10 ml izopropanol içerisinde çözdürüldü.

1,5 M Tris buffer (ph:8,8) (150 ml)

27,23 gr Tris base tartıldıktan sonra 80 ml suda çözdürüldü. pH metre ile ph değeri HCl ile 8,8'e ayarlandı. Daha sonra total hacim distile su ile 150 ml'e tamamlandı. Hazırlanan solüsyon +4°C'de saklandı.

0,5 M Tris buffer (ph:6,8) (100 ml)

6 gr Tris base tartıldıktan sonra 60 ml suda çözdürülüp ph değeri 6,8'e ayarlandıktan sonra total hacim distile su ile 100 ml'e tamamlandı. Hazırlanan solüsyon +4°C'de saklandı.

10X Running buffer (ph:8,3) (1000 ml)

30,3 gr Tris base, 144 gr glisin ve 10 ml %10'luk SDS 500 ml distile su içerisinde çözdürüldü. Ardından, total hacim 1000 ml'e distile su ile tamamlandı.

10x Tris glisin stok solüsyonu

30,3 gr tris base ve 144 gr glisin 1000 ml distile suda çözündürüldü.

Transfer buffer

100 ml 10X konsantrasyondaki Tris glisin stoğundan, 70 ml %7 lik metanolden, ve 7 ml %10 luk SDS karıştırılarak 1000 ml'e distile su ile tamamlandı.

Amonyum persülfat (APS) solüsyonu

100 mg APS, 1 ml suda çözülerek hazırlandı. Her çalışma öncesi yeni APS hazırlandı.

10X TBS solüsyonu

12,1 gr tris base ve 40 gr NaCl 500 ml suda çözündürüldü.

Primer antikorların hazırlanışı

10X konsantrasyondaki TBS 1X'e dilüe edildi. Ardından 10 ml alındı. Daha sonra %5 lik 0,5 gr BSA ve %0,05'lik 5 µl sodyum azid çözeltisi ile karıştırıldı. Bu solüsyon ile primer antikor 1:1000 oranında dilüe edildi.

Sekonder antikorların hazırlanışı

1X TBS, %0,1 tween20 ve yağsız süt tozu ile en az 1:5000 oranında hazırlandı.

Membran bloklama solüsyonu

10 ml 1X TBS içerisinde %1 Tween20, ve %5 lik 0,5 gr BSA ile taze hazırlandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre kültürü

LNCaP, PC-3 ve 22Rv1 prostat kanseri hücre hatları, inaktive edilmiş %10 FBS, 200 mM L-glutamin, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ile desteklenmiş RPMI-1640 besi yerinde, 37 C inkübatörde ve %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş ortamda ilaç uygulamaları gerçekleştirilene kadar kültüre edilmişlerdir. 22Rv1 hücreleri ayrıca androjen deprime bir ortam yaratmak için ilaçların uygulanmasından önceki 7-10 gün boyunca cs-FBS (charcocal stripped-FBS) ile desteklenmiş besiyerinde kültüre edildi.

LNCaP hücreleri, 50 yaşında erkek hastanın sol supraklaviküler lenf düğümündeki metastatik bir lezyonun iğne aspirasyon biyopsisinden elde edilen küçük doku parçalarından geliştirilmiştir. Bu hasta, hormonal tedaviye minimal ve geçici yanıt veren ve kemoterapiye cevap vermeyen, progresif bir prostat kanseri hastası idi. Bu hücreler günümüzde halen birçok prelinik çalışmada kullanılmaktadır. LNCaP hücreleri, prostata özgü genlerin çoğunu eksprese eder ve AR pozitifdir.

PC-3 hücreleri, 62 yaşındaki bir hastadan elde edilen 4. derece prostatik bir adenokarsinomdan oluşturulmuştur. Hücreler agar içinde büyür ve nude farelerde tümör üretme kapasitesine sahiptir. Düşük asit fosfataz ve testosteron-5-α redüktaz aktivitesi gösterir. Ayrıca AR negatiftir ve bu amaçla androjenden bağımsız model olarak çalışılmaktadır.

Çalışmamızda kullanılan üçüncü hücre hattı 22Rv1, CWR22R insan prostatik karsinoma ksenograft hattından türetilmiş olup PSA eksprese eder. DHT tarafından hafif olarak uyarılır ve AR ekspresyonu bakımından pozitifdir. Büyüme, epidermal büyüme faktörü tarafından uyarılır ancak transforme büyüme faktörü-beta1 (TGF-B1) ile inhibe edilmez. Yapılan çalışmalarda, AR varyantları bakımından da pozitif olduğu gösterildiği için, ileride anlatılacak AR-V7 siRNA ile baskılama deneyleri için bu hücre hattı seçilmiştir.

3.2.2. İlaç uygulamaları

NFKB inhibitörü BAY11-7082 ve/veya HSP27 inhibitörü KRIBB3 ajanları optimal dozun belirlenebilmesi için uygun doz aralıklarında ve zamanlarda hücrelere uygulanmıştır.

LNCaP hücrelerine, BAY 11-7082'nin 1-20uM aralığındaki dozları 24 ve 48 saat sürelerinde uygulanmıştır. KRIBB-3 ise yine 24 ve 48 saat boyunca 0,1-10uM doz aralığında uygulanmıştır.

PC-3 hücrelerine, BAY 11-7082'nin 1-15uM aralığındaki dozları 24 ve 48 saat sürelerinde uygulanmıştır. KRIBB-3 ise 24 ve 48 saat boyunca 0,1-10uM doz aralığında uygulanmıştır.

22Rv1 hücrelerine, BAY 11-7082'nin 1-20uM aralığındaki dozları 24 ve 48 saat sürelerinde uygulanmıştır. KRIBB-3 de tekli olarak 24 ve 48 saat boyunca 0,1-10uM doz aralığında uygulanmıştır.

Her üç hücre hattına da bu ilaçların kombine dozları ise yalnızca 24 saat süresince uygulanmıştır. Çözücü kontrolü olarak DMSO kullanıldı ve aynı süreler için hücreler inkübe edildi. İnkübasyonun ardından ilaçların her bir dozu için sitotoksik etkiler belirlendi. Her bir konsantrasyon değeri için birbirinden 3 ayrı kültür yapılarak deney tekrarlandı.

3.2.3. Hücre canlılığının belirlenmesi

Belirtilen inkübasyon sürelerinin dolmasının ardından, kullanılan inhibitörlerin hücrelerin canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesinde WST-1 yöntemi kullanılmıştır. WST-1 yöntemi, kültüre edilmiş hücrelerde hücre çoğalmasını, hücre canlılığını ve sitotoksisiteyi spektrofotometrik olarak gösteren basit ve hızlı bir yöntemdir. WST-1 protokolü, WST-1 tetrazolyum tuzunun formazan'a hücresel mitokondriyal dehidrojenazlarla ayrılmasına dayanır. Canlı hücrelerin sayısı arttıkça, mitokondriyal dehidrojenazların aktivitesi artar ve sonuçta oluşan formazan boyası miktarı artar.

LNCaP, PC-3 ve 22Rv1 hücrelerinde BAY 11-7082, KRIBB-3 ve bunların kombine dozlarının hücrelerin canlılıkları üzerine olan etkileri WST-1 yöntemi ile belirlendi. Kültüre edilen LNCaP, PC-3 ve 22Rv1 hücreleri, T-75 hücre flasklarının yaklaşık olarak %70 yoğunluğa ulaştığında besiyerleri çekildi. Ardından yaklaşık 5-10 ml PBS ile flasklar yıkandı. Daha sonra hücreler yaklaşık 5 ml Tripsin ile muamele edilerek hücrelerin birbirlerinden ve flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. Flasklar içerisine bir miktar besiyeri eklendikten sonra hücrelerin tamamı çekilip 15 ml'lik falkon tüpleri içerisine alındı ve 1700 rpm, 10 dk santrifüjden sonra hücre pelleti üzerine %1'lik besiyerinden 1 ml eklendi. Ardından hücreler tripan mavisini ile karıştırılıp Cedex hücre sayım cihazında sayıldı. Daha sonra 96 kuyulu hücre kültür kaplarına her bir kuyucuğa yaklaşık 5000 hücre gelecek şekilde hesaplanıp 100 µl %1 FBS içeren besiyeri ile yeni ekim yapıldı. Hücreler bir gece boyunca flask yüzeyine yapışmaları için 37°C ısıda %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı. Belirtilen dozlarda LNCaP, PC-3 ve 22Rv1 hücrelerine sırası ile BAY 11-7082, KRIBB-3 ve bunların kombine dozları belirtilen miktarlarda ve süreler boyunca uygulandı ve etüvde inkübasyona bırakıldılar. Bu sürelerin sonunda 96 kuyucuklu flaskdan her bir kuyucuktaki hücrelerden ilaçlı besiyerleri çekildi. Ardından 100 µl fenol kırmızısı içermeyen RPMI 1640 besiyeri ve 10 µl WST-1 her bir kuyucuğa kondu. Etüve tekrar alınan hücreler, yaklaşık 3 saatin sonunda çıkarıldı ve ELISA okuyucusunda 540 nm dalga boyunda okutulduktan sonra hücre canlılığı hesaplamaları excel programı üzerinde yapıldı.

3.2.4. RNAi ile baskılama

22Rv1 hücreleri, 6 kuyucuklu flasklarda kuyucuk başına 4×10^5 hücre yoğunluğu olacak şekilde ekildi. AR-V7' ye özgü siRNA stoğu, 1xsiRNA buffer içerisinde seyreltilerek -80 C'de saklanmıştır. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda, FuGENE HD Transfeksiyon Reaktifi kullanılarak AR-V7'ye özgü siRNA (hedef sekans; GACCAGACCCUGAAGAAAG) ve hedefleme yapmayan kontrol havuzu ile 22Rv1 hücreleri transfekte edildi. Transfeksiyondan yaklaşık 72 saat sonra protein izolasyonu yapıldı ve western blotlama ile hedef proteinler analiz edildi.

3.2.5. Protein izolasyonu, miktar tayini ve Western blot yöntemi

İlk aşamada siRNA baskılama uygulanmamış 22Rv1 hücreleri ile LNCaP hücrelerinde belirtilen ajanların tekli veya kombine dozlarının uygulanmasının ardından inkübasyon süreleri beklendikten sonra hücrelerden RIPA buffer aracılığı ile uygun protokol adımları takip edilerek total protein izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra baskılama uygulanmış fakat ilaç/ilaçlar verilmemiş 22Rv1 hücrelerinden protein izolasyonu yapılmıştır. Üçüncü olarak hem siRNA baskılama hem de ilaç/ilaçlar uygulanmış 22Rv1 hücrelerinden protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyonun ardından miktar tayini için BCA protein assay kiti kullanılmıştır. BCA protein ölçüm kiti ile aşağıdaki basamaklara göre gerçekleştirildi.

- 1- BCA kitinde yer alan bovine serum albumin (BSA) ile 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125; 0,025 ve 0 µg/ml konsantrasyon değerlerinde standart tüpler hazırlandı.
- 2- Hazırlanan bu standart tüplerden ve protein örneklerinden 96 kuyucuklu plakanın her birine 25'er µl eklendi.
- 3- Kit içerisinde bulunan Reaktif B ve A solüsyonları 1:50 oranda olacak şekilde hazırlandı.
- 4- Bu reaktif karışımından her bir kuyucuğa 200'er µl eklendi.
- 5- 37°C lik inkübatörde yarım saat kadar inkübasyondan sonra mikropilaka ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda plaka okutuldu ve çıkan sonuca göre excel programında standart eğri çizilerek western blot jel yüklemesinde gereken protein miktarları hesaplandı.

Protein düzeyinde ifadenme ve çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar Western Blot yöntemi ile belirlenmiştir. Eşit miktarda protein SDS-PAGE'de yürütüldükten sonra PVDF membranına wet blotting ile aktarılmıştır. Membran %5'lik yağsız süt tozu ile bloklandıktan sonra NFκB-p65, p-IKK α/β, p-HSP27, AR, AR-V7 ve AR-V567es hedef genlerine ait primer antikorla sonrasında ise sekonder antikorla muamele edilmiştir. Kemilüminesan kullanılarak proteinler membran üzerinde görünür hale getirilmiş ve imaging cihazı ile görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Protein yükleme kontrolü olarak β-Aktin kullanılmıştır.

3.2.6. Hasta ve kontrol grubu

Çalışmaya 25 adet sağlıklı kontrol, 25 adet prostat kanserli hasta ve 40 adet metastatik evredeki prostat kanserli hasta dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen kan örnekleri, kontrol ve prostat kanseri grubu Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Polikliniğine başvurmuş hastalardan, metastatik evredeki prostat kanserli hasta grubu ise Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Polikliniğine başvurmuş hastalardan onay alınarak temin edilmiştir. Üroloji polikliniğine başvuran hastalardan prostat kanseri tanısı alanlar için gerekli tetkikler önceden gerçekleştirildiğinden, skrolama verileri de hastaların dosyasında kaydedilmiştir. Çalışmaya alınan hastalardan hiçbir cerrahi operasyon geçirmemiş ve ilaç almamış olanlar ile metastatik prostat kanseri tanısı konmuş hasta kanları çalışmaya dahil edilmiştir. Alınan kan örnekleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında muhafaza edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların klinikopatolojik karakteristikleri Çizelge 3.1 ve 3.2.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Prostat kanseri hastalarının klinikopatolojik karakteristikleri

PCa	Lokal PCa N	Lokal ileri PCa N
İlk tanı PSA <10	13	6
10-20	3	2
>20	-	1
T evre		
T2	15	-
T3	1	9
Gleason Skoru		
6	7	3
7	8	3
8	1	2
9	-	-
10	-	1

Çizelge 3.2. Metastatik prostat kanseri hastalarının klinikopatolojik karakteristikleri

Metastatik PCa	N
İlk tanı PSA <20	11
>20	29
T evre	
T3	12
T4	6
T3-T4	22
N evre	
N1	24
N0	16
M evre	
M0	3
M1a	5
M1b	28
M1c	4
Gleason Skoru	
8	10
9	17
10	13

3.2.7. Periferik kan örneklerinden serum eldesi

Serum ayırma tüplerine alınan kan örneği bu tüplerde oda ısısında 1 saat beklendikten sonra uygun miktarda santrifüj edilip serum kısmı yeni tüplere alınmıştır. Örnekler kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.2.8. Tam kandan RNA izolasyonu ve Real-Time PCR

Trizol RNA izolasyon kiti içerisinde yer alan protokole göre tam kan örneklerinden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve Nanodrop cihazında miktar ve saflık ölçümleri yapılmıştır. cDNA sentez kiti ile cDNA eldesi gerçekleştirilerek AR, AR-V7 ve AR-V567es hedef genlerine ait aşağıda dizileri verilmiş primer ve probalar ile reaksiyon karışımı hazırlanarak RT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyonlar 20 µl toplam tepkime hacmi içerisinde cDNA, mRNA'ya özgün primerler ve probalar, master mix ve distile su kullanılarak gerçekleştirilmiştir. AR, AR-V7, AR- V567es, hedef genlerine ait primer diziler aşağıdaki gibidir; kontrol amaçlı housekeeping gen olarak β -Aktin kullanılmıştır.

•AR

Forward 5'-CCTGGCTTCCGCAACTTACAC-3'
Reverse 5'-GGAATTGTGCATGCGGTACTCA-3'

•AR-V7

Forward 5'-CCATCTTGTCGTCTTCGGAAATGTTATGAAGC-3'
Reverse 5'-TTTGAATGAGGCAAGTCAGCCTTTCT-3'

•AR-V567es

Forward 5'-CCAAGGCCTTGCCTGATTGC-3'
Reverse 5'-TTGGGCACTTGCACAGAGAT-3'

• β -Aktin

Forward 5'-CCTGCACCACTGCTTA-3'.
Reverse 5'-GGCCATCCACAGTCTTCTGAG-3

3.2.9. ELISA yöntemi

Kan örneklerinden elde edilen serum örneklerinde NF- κ B aktivitesini belirlemek için kolorimetrik NF- κ B Transcription Factor Elisa Kiti kullanılmıştır. Bu yöntemde NF- κ B bağlanma bölgesini bulunduran primer antibody 96 kuyucuklu plakaya immobilize edilmiştir. Nükleer veya tüm hücre ekstraktlarında bulunan aktif NF- κ B, oligonükleotide spesifik olarak bağlanır ve üzerindeki epitopu tanıyan primer antikolar tarafından yalnızca NF- κ B etkinleştirildiğinde ve bağlandığı zaman erişilebilir olarak tespit edilir. HSP-27 ifadenmesi de yine aynı metod ile Human

HSP-27 ELISA kitinde incelenmiştir. Son olarak HRP-konjuge sekonder antikor ile OD 450 nm'de ELISA reader cihazında okutularak sonuçlar alınmıştır.

3.2.10. İstatistiksel analiz

Hücre canlılığı istatistiksel test yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Veriler “SPSS 15.0” istatistik programı kullanılarak analiz edilmiştir. Anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir. Western blot yönteminden elde edilen bant görüntüleri ImageJ programı kullanılarak kantitatif olarak analiz edilmiştir. mRNA düzeyinde analiz için RT-PCR sonucunda elde edilen ct değerleri REST 2009 V2.0.13 programı ile analiz edilmiştir. REST istatistik programı, Pfaffl eşitliği olarak bilinen bir denklem ile, kantitatif ekspresyon değerlerinin (ct value) kontrol ve hasta grubunda karşılaştırmasını gerçekleştiren bir programdır.



4. BULGULAR

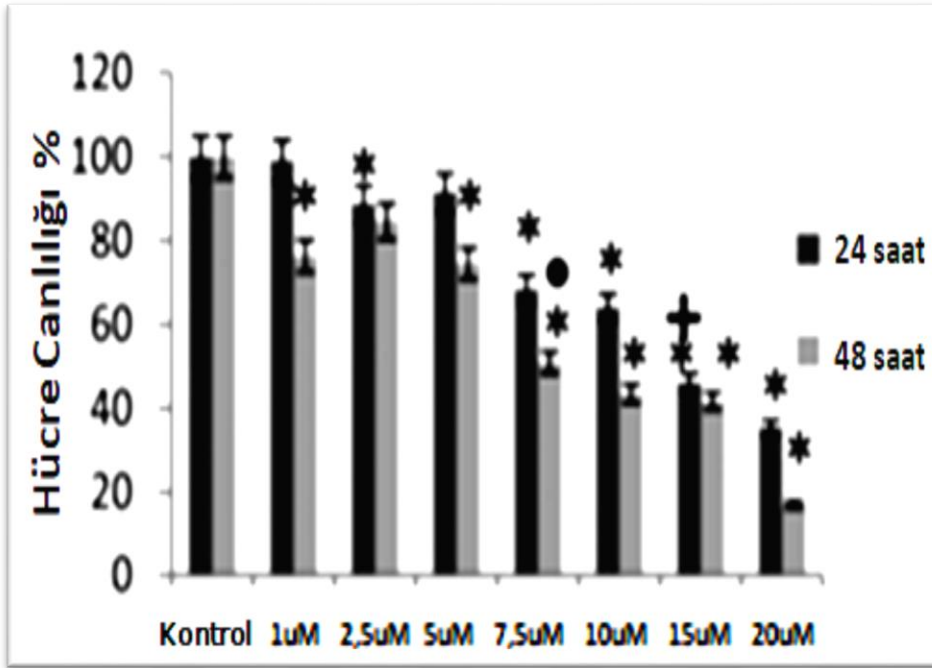
4.1. NF-K β İnhibitörü BAY11-7082 ve HSP-27 İnhibitörü KRIBB-3'ün Prostat Kanseri Hücre Hatlarının Canlılıkları ve Proliferasyonları Üzerine Etkisinin İncelenmesi

BAY11-7082 ve KRIBB-3'ün anti-proliferatif etkisini belirlemek için, LNCaP hücrelerine BAY11-7082 'nin 1-20 μ M aralığındaki doz değerleri 24 ve 48 saat olarak uygulandı. KRIBB-3 ise yine 24 ve 48 saat sürede 0,1-10 μ M doz aralıklarında uygulandı. Bu inhibitörlerin kombine dozları ise Şekil 4.3'de belirtilen dozlarda 24 saat olarak uygulanmıştır.

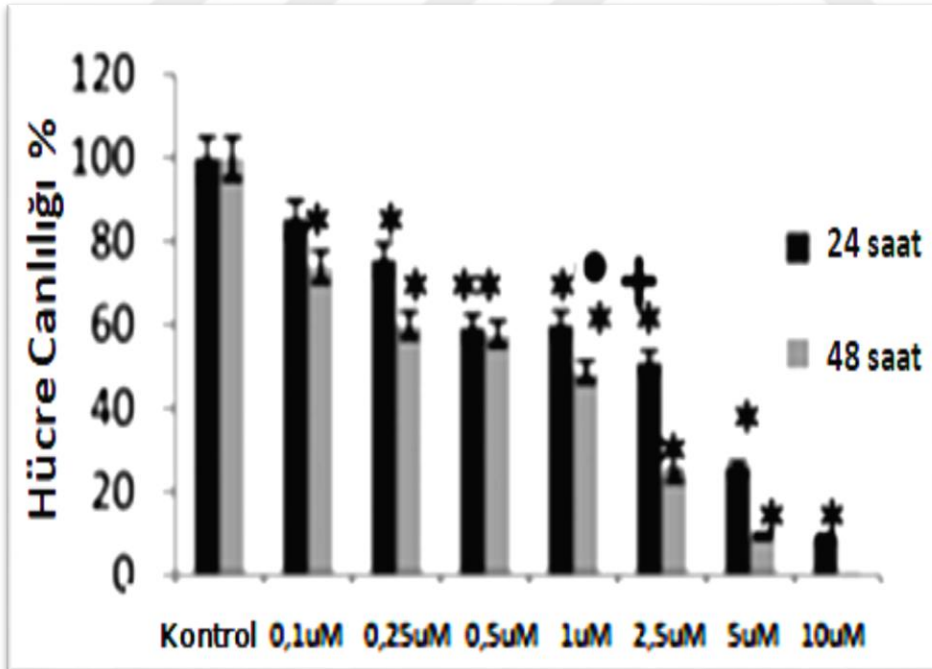
Sonuçlarımıza göre, 24 ve 48 saatlik BAY11-7082 uygulamasından sonra LNCaP hücrelerinde, hücrelerin yarısı için ölümcül doz olan IC₅₀ değerleri sırasıyla, 15 μ M ve 7,5 μ M olarak bulundu. İlk dozlarda proliferasyon düzeyinde anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, özellikle 7,5 μ M dozdan sonra hücre canlılığı anlamlı olarak azalmaya başlamıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.1).

KRIBB-3 uygulamasında ise, 24 ve 48 saatlik IC₅₀ değerleri sırasıyla 2,5 μ M ve 1 μ M olarak bulunmuştur. KRIBB-3, hücre proliferasyonunun inhibisyonu açısından, BAY11-7082 'den doz oranı bakımından daha potent olarak görüldü. En yüksek uygulama dozu olan 10 μ M değerinde hücre canlılığı sıfıra yakın olarak gözlemlendi (Şekil 4.2).

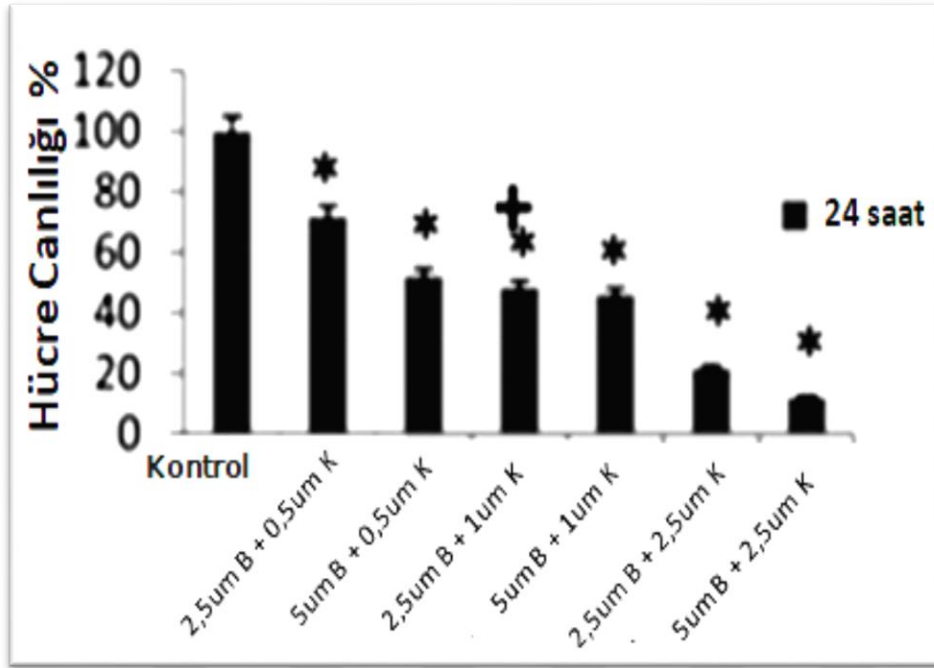
Bu inhibitörlerin LNCaP hücrelerine 24 saatlik kombine dozlarının uygulanması sonucunda ise, IC₅₀ değeri 2,5 μ M BAY11-7082 ve 1 μ M KRIBB-3 kombinasyonu olarak bulundu. (Şekil 4.3). Tekli ve kombine dozlarda zamana ve doza bağımlı olarak azalan bir proliferasyon oranı izlendi.



Şekil 4.1. LNCaP hücrelerinin (5000hücre/kuyu) BAY11-7082 ile belirtilen dozlarda 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *; $p < 0.05$, +; 24 saat uygulamada görülen IC_{50} değeri, •; 48 saat uygulamada görülen IC_{50} değeri.



Şekil 4.2. LNCaP hücrelerinin (5000hücre/kuyu) KRIBB-3 ile belirtilen dozlarda 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *; $p < 0.05$, +; 24 saat uygulamada görülen IC_{50} değeri, •; 48 saat uygulamada görülen IC_{50} değeri.



Şekil 4.3. LNCaP hücrelerinin (5000hücre/kuyu) BAY11-7082 ve KRIBB-3 kombinasyonu ile belirtilen dozlarda 24 saatlik inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *; $p < 0.05$, +; 24 saat uygulamada görülen IC_{50} değeri.

Çalışmamızda kullandığımız bir diğer hücre hattı olan PC-3 hücrelerinde BAY11-7082 ve KRIBB-3'ün anti-proliferatif etkisini belirlemek için, BAY11-7082 'nin 1-15 μM aralığındaki doz değerleri 24 ve 48 saat sürede uygulandı.

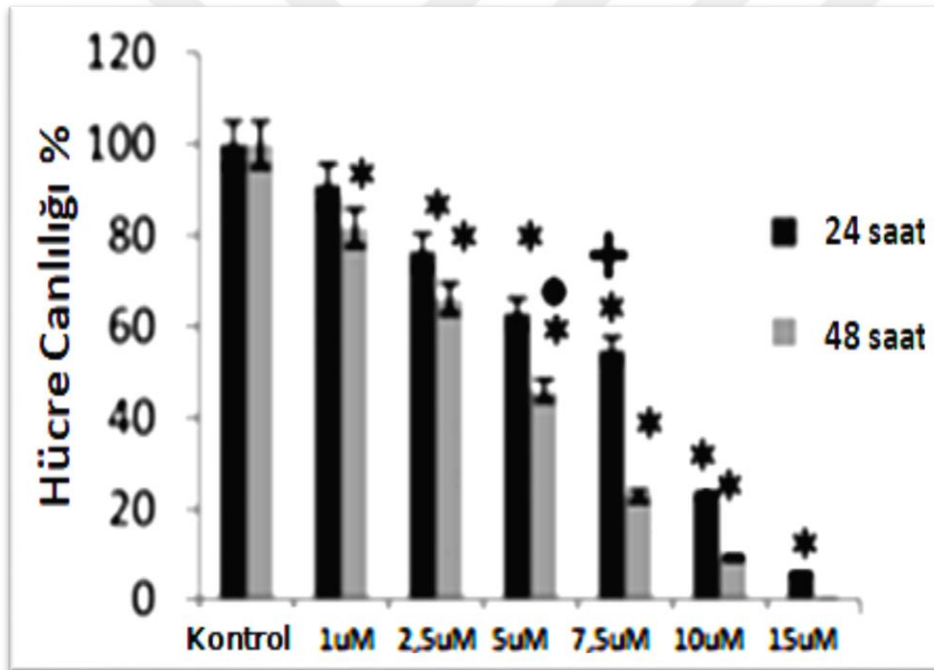
KRIBB-3 ise yine 24 ve 48 saat sürede 0,1-10 μM doz aralıklarında uygulandı. Bu inhibitörlerin kombine dozları ise Şekil 4.6'da belirtilen dozlarda 24 saat olarak uygulanmıştır.

Sonuçlarımıza göre, PC-3 hücrelerinde, 24 ve 48 saat sürede BAY11-7082 uygulamasından sonra IC_{50} değerleri sırasıyla yaklaşık 15 μM ve 5 μM olarak bulundu. Hücre proliferasyonu 2,5 μM dozdan itibaren anlamlı olarak azalmaya başlarken ($p < 0,05$), yüksek oranda azalmaya başladığı doz 24 saatte 10 μM , 48 saatlik uygulamada ise 7,5 μM değerleridir. (Şekil 4.4).

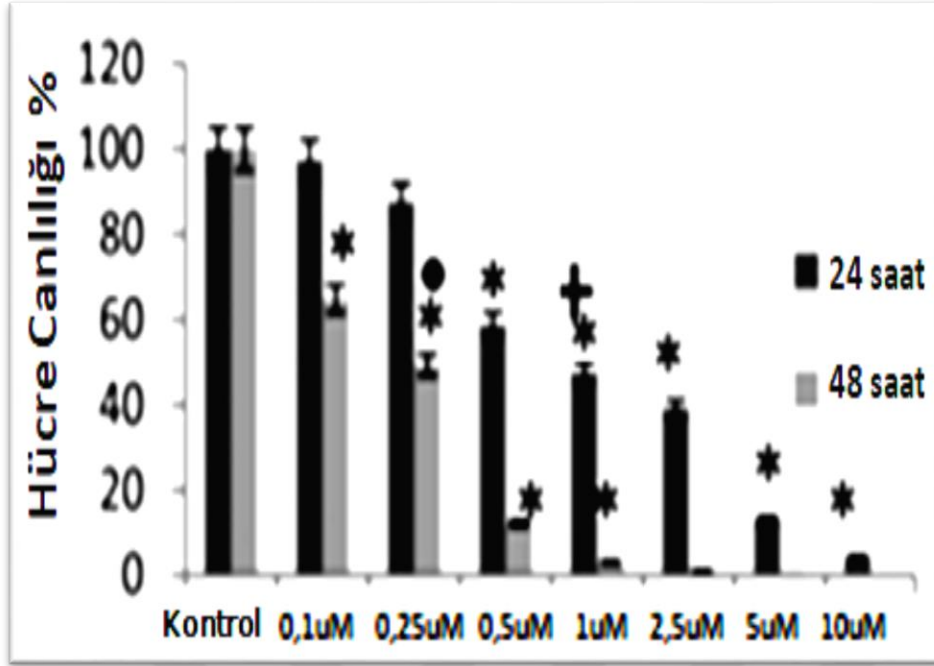
KRIBB-3 uygulanmasında ise, 24 ve 48 saatlik IC_{50} değerleri sırasıyla 1 μM ve 0,25 μM olarak gözlemlendi.

LNCaP hücrelerinde olduğu gibi PC-3 hücrelerinde de KRIBB-3'ün hücre proliferasyonunun azaltılmasında BAY11-7082 'den daha etkili olduğu görüldü. PC-3 hücre hattında farklı olarak, 2,5-10 μM doz aralıklarında 48 saatlik uygulamalarda hücre canlılığı sıfır düzeyine yakındı (Şekil 4.5).

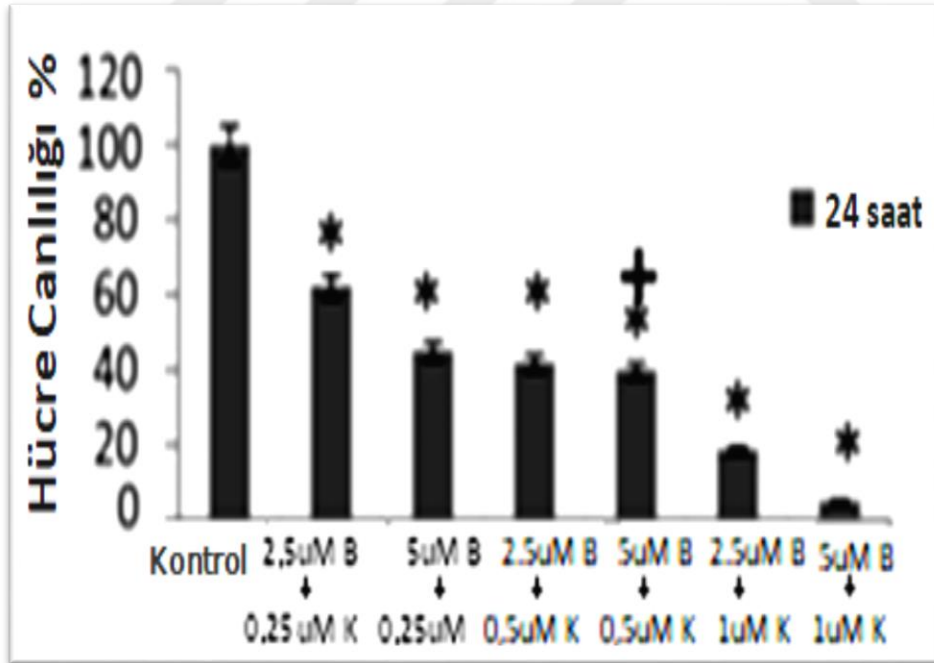
Bu ilaçların kombine dozlarının 24 saatlik uygulanmasında ise, IC_{50} değeri 5 μM BAY11-7082 ve 0,5 μM KRIBB-3 olarak bulundu. (Şekil 4.6). Tekli ve kombine dozlarda zamana ve doza bağımlı olarak azalan bir proliferasyon oranı PC-3 hücrelerinde oldukça belirgin gözlemlenmiştir. Sonuçlarımız, PC-3 hücre hattının, LNCaP ve 22Rv1 hücrelerine kıyasla inhibitör uygulamasına karşı en duyarlı hücre hattı olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.4. PC-3 hücrelerinin (5000hücre/kuyu) BAY11-7082 ile belirtilen dozlarda 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *; $p < 0.05$, +; 24 saat uygulamada görülen IC_{50} değeri, •; 48 saat uygulamada görülen IC_{50} değeri.



Şekil 4.5. PC-3 hücrelerinin (5000hücre/kuyu) KIRBB-3 ile belirtilen dozlarda 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *; $p < 0.05$, +; 24 saat uygulamada görülen IC_{50} değeri, •; 48 saat uygulamada görülen IC_{50} değeri.



Şekil 4.6. PC-3 hücrelerinin (5000hücre/kuyu) BAY11-7082 ve KIRBB-3 kombinasyonu ile belirtilen dozlarda 24 saatlik inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *; $p < 0.05$, +; 24 saat uygulamada görülen IC_{50} değeri.

Çalışmamızda kullanılan üçüncü hücre hattı olan 22Rv1 hücrelerinde BAY11-7082 ve KRIBB-3'ün anti-proliferatif etkisini belirlemek için, BAY11-7082 'nin 1-20 μM aralığındaki doz değerleri 24 ve 48 saat süreli olarak uygulandı. KRIBB-3 ise yine 24 ve 48 saat olarak 0,1-10 μM doz aralıklarında uygulandı. Bu inhibitörlerin kombine dozları ise Şekil 4.9'da belirtilen dozlarda 24 saat sürede uygulanmıştır. Sonuçlarımıza göre, 22Rv1 hücrelerinde, 24 ve 48 saat sürede BAY11-7082 uygulamasından sonra IC_{50} değerleri sırasıyla yaklaşık 10 μM ve 5 μM olarak bulundu.

BAY11-7082'nin hücre proliferasyonunu azaltıcı etkisi genel olarak LNCaP hücrelerine benzer bir profil gösterirken, LNCaP hücrelerinden farklı olarak 1 μM gibi düşük dozlardan itibaren anlamlı olarak bir azalma görüldü. ($p < 0,05$) (Şekil 4.7).

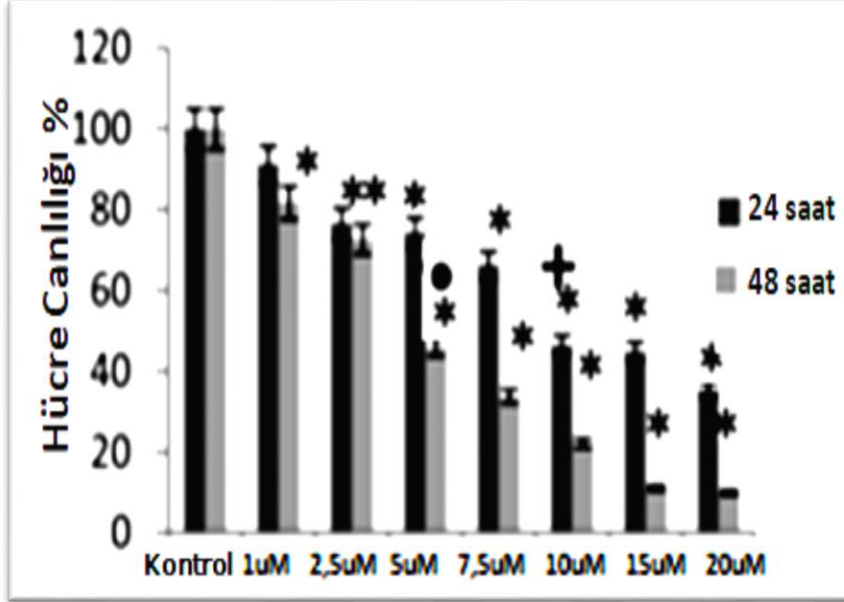
KRIBB-3 uygulanmasında ise, 24 ve 48 saatlik IC_{50} değerleri sırasıyla 2,5 μM ve 1 μM olarak gözlemlendi ki bu değer LNCaP hücrelerinde bulunan değerle aynı idi. Diğer hücre hatlarında olduğu gibi 22Rv1 hücrelerinde de KRIBB-3'ün hücre proliferasyonunun azaltılmasında BAY11-7082 'den daha etkili olduğu görüldü. Ancak 22Rv1 hücre hattında farklı olarak, 15 ve 20 μM gibi yüksek doz aralıklarında gerek 24 gerekse de 48 saatlik uygulamalarda hücre canlılığı oldukça az da olsa sıfır düzeyin üstünde izlendi. (Şekil 4.8). Bu bakımdan, 22Rv1 hücreleri inhibitörlere diğer hücre hatlarından daha dirençli olarak gözlemlenmiştir.

Bu ilaçların kombine dozlarının 24 saatlik uygulanmasında ise, IC_{50} değeri 7,5 μM BAY11-7082 ve 1 μM KRIBB-3 olarak bulundu. (Şekil 4.9).

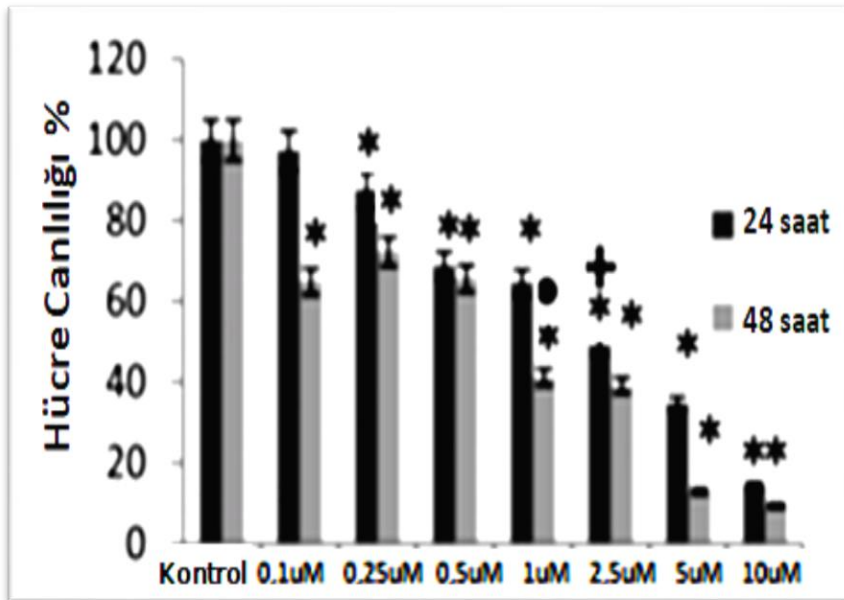
Tekli ve kombine dozlarda zamana ve doza bağımlı olarak azalan bir proliferasyon oranı 22Rv1 hücrelerinde de gözlemlenmiştir. Ancak, tekli dozlarda olduğu gibi kombine dozlarda da diğer hücre hatlarına kıyasla proliferasyon düzeyi düşük dozlarda yüksek miktarda azalma göstermemiştir.

Sonuçlarımız, 22Rv1 hücre hattının, inhibitör uygulamasına karşı anlamlı düzeylerde proliferasyon azaltıcı etkisini göstermekle birlikte, LNCaP ve PC-3 hücrelerine kıyasla inhibitör uygulamasına karşı en dirençli hücre hattı olduğunu göstermiştir. Her üç hücre hattında gözlemlediğimiz sonuçlar, bu inhibitörlerin

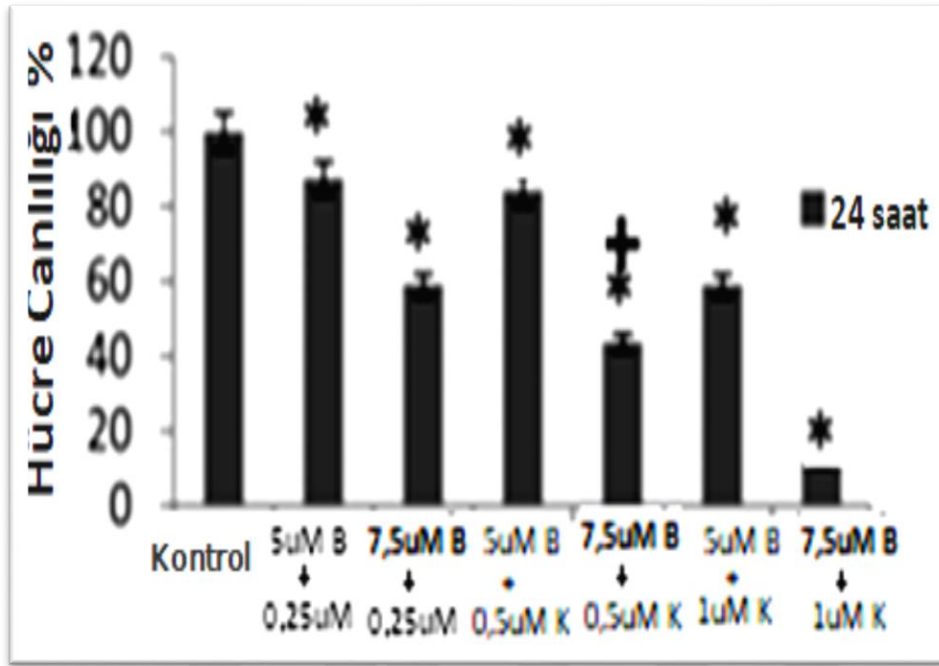
uygulama zamanı içinde canlılığı tekli ve kombine uygulamada doza bağlı bir şekilde anlamlı olarak azalttığını göstermiştir.



Şekil 4.7. 22Rv1 hücrelerinin (5000hücre/kuyu) BAY11-7082 ile belirtilen dozlarda 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *; $p < 0.05$, +; 24 saat uygulamada görülen IC_{50} değeri, •; 48 saat uygulamada görülen IC_{50} değeri.



Şekil 4.8. 22Rv1 hücrelerinin (5000hücre/kuyu) KRIBB-3 ile belirtilen dozlarda 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *; $p < 0.05$, +; 24 saat uygulamada görülen IC_{50} değeri, •; 48 saat uygulamada görülen IC_{50} değeri.



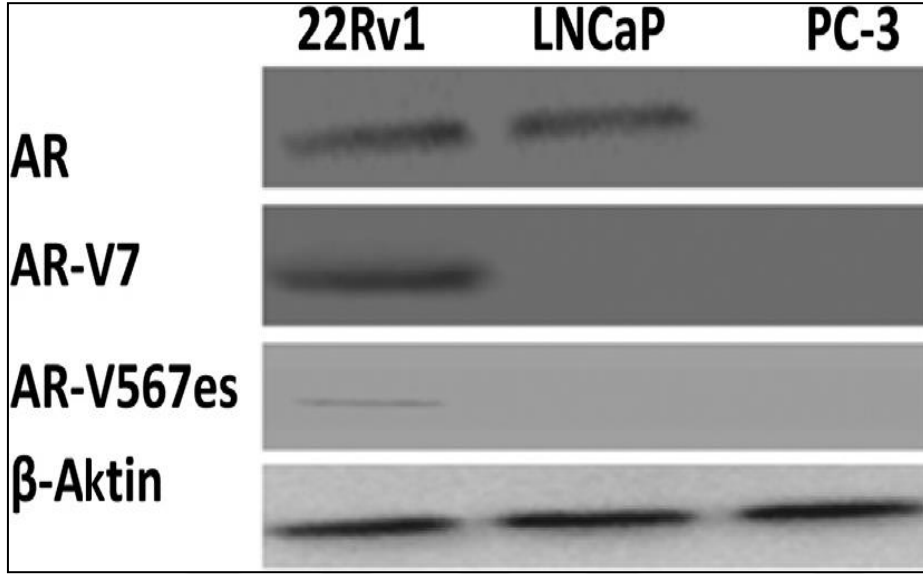
Şekil 4.9. 22Rv1 hücrelerinin (5000hücre/kuyu) BAY11-7082 ve KRIBB-3 kombinasyonu ile belirtilen dozlarda 24 saatlik inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *; $p < 0.05$, +; 24 saat uygulamada görülen IC_{50} değeri.

4.2. AR, AR-V7 ve AR-V567es'in Bazal İfade Seviyelerinin Protein Düzeyinde İncelenmesi

Çalışmamızda prostat kanserli hücre hatlarında AR, AR-V7 ve AR-V567es'in protein düzeyinde bazal ekspresyon seviyelerini belirlemek için inhibitör uygulanmamış LNCaP, PC-3 ve 22Rv1 hücrelerinden total protein izole edildi. Şekil.4.10'da görüldüğü gibi, 22Rv1 ve LNCaP hücreleri tam uzunluktaki AR'nü ifade etmektedirler. AR-V7 ekspresyonu incelendiğinde ise, 22Rv1 hücreleri pozitif iken, LNCaP hücreleri varyant ifadelenmesi göstermemiştir.

Literatürde, 22Rv1 hücrelerinin AR-V567es'i RNA ve protein düzeyinde ifade ettiği belirtilmiştir. Bu amaçla biz de AR-V7 ve ilişkili yolların inhibe edilmesinin AR-V567es üzerine etkisini de araştırabilmek için öncelikle AR-V567es ifadelenmesini inhibitör almamış 22Rv1 hücrelerinde inceledik. Ancak 22Rv1 hücreleri beklediğimiz gibi yüksek düzeyde AR-V567es ifadelenmesi göstermedi. Bu nedenle, sonraki deneylerin sonuçları yalnızca AR-V7 üzerinden yorumlanmıştır.

PC-3 hücreleri ise beklendiği gibi hem tam uzunluktaki AR ekspresyonu hem de varyant AR ekspresyonu bakımından negatif olarak gözlenmiştir. Sonuç olarak, üç hücre hattının hepsinde AR-V7 ekspresyonu açısından, sadece 22Rv1 hücrelerinin AR-V7 pozitif olduğunu doğruladık ve bu nedenle siRNA baskılama deneylerini 22Rv1 hücrelerinde gerçekleştirdik.



Şekil 4.10. İnhibitör uygulanmamış 22Rv1, LNCaP ve PC-3 hücre hatlarında AR, AR-V7 ve AR-V567es'in protein düzeyindeki içsel ekspresyon seviyeleri.

4.3. BAY11-7082 ve KRIBB-3'ün AR, AR-V7, P65, Fosforile IKK α/β ve Fosforile HSP-27'nin İfadelemeleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

22Rv1 hücrelerine, tekli doz olarak 10uM BAY11-7082 ve 2.5uM KRIBB-3; kombine doz olarak ise 7.5uM BAY11-7082 ile 1uM KRIBB-3 uygulanmıştır. 6, 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra uygun protokol adımlarıyla protein izolasyonu gerçekleştirildi. siRNA baskılaması bu aşamada uygulanmamıştır, ilaçların sadece zamana bağlı etkileri incelenmiştir.

Sonuçlarımıza göre, AR ekspresyon seviyesinin azalması, 48 saatlik KRIBB-3 dozunda, kombine dozda maksimum düşüş ile birlikte gözlemlendi. Diğer doz ve sürelerde belirgin bir değişim bulunmadı. Benzer şekilde, AR-V7'nin ekspresyon seviyesi 48 saatlik KRIBB-3 dozunda maksimum bir düşüş gösterdi, ancak kombine dozda hiçbir değişiklik görülmedi.

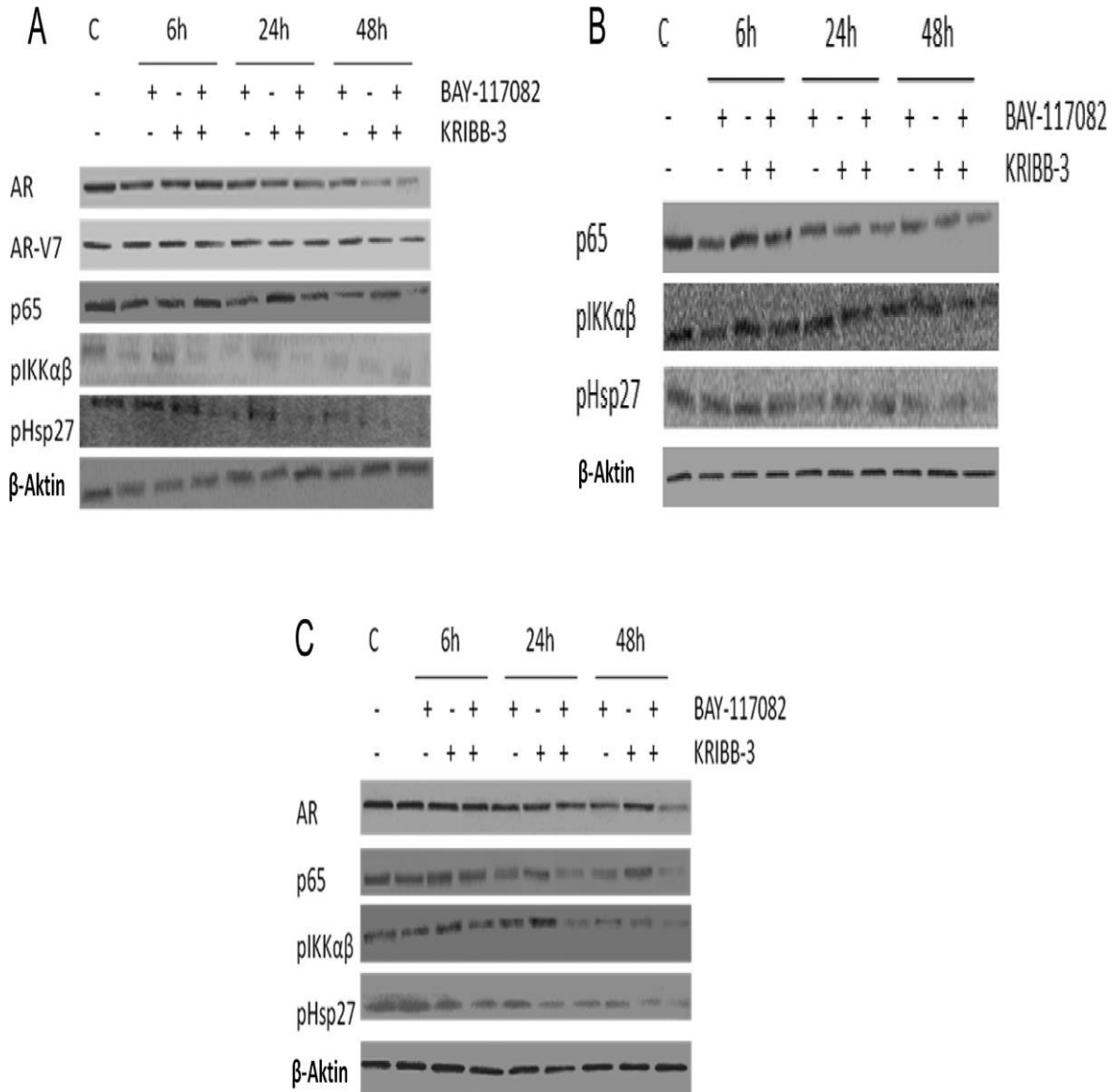
p65'in ekspresyon seviyesindeki düşüş, BAY11-7082 'nin 48 saatlik dozunda gözlemlendi. Bununla birlikte, 48 saatlik KRIBB-3 dozunda bir değişiklik bulunmadı. p65 ekspresyon seviyesinin 48 saatlik kombine doz uygulamasında oldukça azaldığı gözlemlendi.

p-IKK α / β ifadesi, 6 saatlik BAY11-7082 dozunda azalmaya başlarken, diğer dozlarda ve zamanlarda hiçbir değişiklik gözlenmedi. Hsp-27 fosforilasyonu ise, 48 saatlik kombine inhibitör dozunda neredeyse görülemeyecek kadar bir azalma meydana gelmiştir. Ayrıca, 6 ve 24 saatlik dozlarda fosforile proteinler dışındaki diğer proteinlerde herhangi bir ekspresyon değişikliği gözlenmemiştir.

PC-3 hücreleri 6, 24 ve 48 saat boyunca tekli doz 7,5 μ M BAY11-7082 ve 1 μ M KRIBB-3 ve kombine olarak 2.5 μ M BAY11-7082 ve 1 μ M KRIBB-3 ile muamele edilmiştir. Bu hücrelerde gözlenen en dikkat çekici sonuç, kombine dozlarda p65 ekspresyon seviyesinin azalması ve 48 saatlik kombine dozda HSP-27 fosforilasyonunun neredeyse tamamen kaybı idi.

LNCaP hücreleri, tekli doz 15 μ M BAY11-7082 ve 2.5 μ M KRIBB-3 ve kombine doz olarak da 2.5 μ M BAY11-7082 ve 1 μ M KRIBB-3 ile muamele edildi ve protein izolasyonu; 6, 24 ve 48 saat inkübasyon sonra uygun protokol adımları ile yapıldı. 22Rv1 hücrelerine benzer şekilde, LNCaP hücrelerinde BAY11-7082 ve KRIBB3'ün 48 saatlik kombine doz uygulamasında AR ifadesinde bir azalma gözlemlendi. Azalmış p65 ekspresyonu 24 saatlik BAY11-7082 dozunda gözlemlendi, ancak bu azalma kombine dozda daha fazla görüldü.

IKK α / β fosforilasyonundaki ilk düşüş 24 saatlik kombine dozda gözlenirken, 48 saatlik dozda bir değişiklik olmadı. Hsp-27 fosforilasyonundaki maksimum azalma, 48 saatlik kombine dozda gözlemlendi.



Şekil 4.11. 22Rv1 (A), PC-3 (B) ve LNCaP (C) hücre hatlarında BAY11-7082 ve KRIBB-3'ün AR, AR-V7, p65, fosfo-IKK α / β ve fosfo-Hsp-27'nin ifadenmeleri üzerine etkileri.

4.4. AR-V7 siRNA Baskılamanın İnhibitörler ile Kombinasyonunun 22Rv1 Hücrelerindeki Protein İfadenmesine Etkileri

AR-V7'ye özgü siRNA baskılama, üretici firmanın protokolüne göre 22Rv1 hücrelerinde gerçekleştirildi ve hücreler 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldıktan sonra protein izolasyonu gerçekleştirildi. 2.5 μ M KRIBB-3 ve 10 μ M BAY11-7082 kombinasyonu, inkübasyon süresinin bitiminden 6 saat önce siRNA baskılama yapılmış hücrelere uygulandı. Bu işlemlerden sonra protein izolasyonu ve western blot gerçekleştirildi.

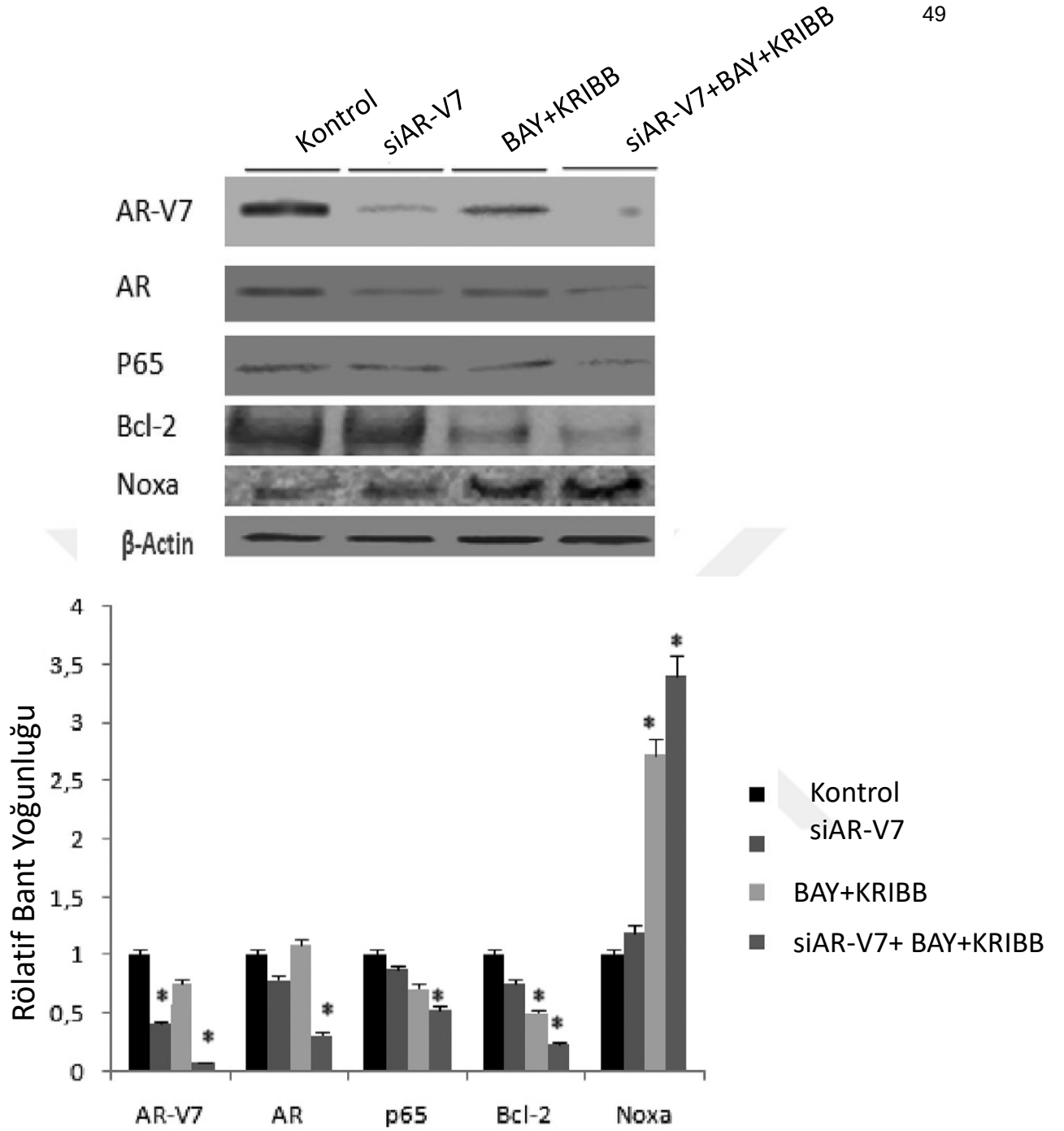
ARV7 baskılaması sonucunda, beklenen bir sonuç olan AR-V7 ifadenin azalması, AR ifadesinde yaklaşık 1,2 katlık bir azalma ile birlikte gözlemlendi. Fakat, AR ifadenin azalması istatistiksel olarak anlamlı değil idi ($p = 0.06$). Ayrıca p65 ve Noxa seviyelerinde de anlamlı bir değişiklik bulunmadı (sırasıyla $p = 0.05$ ve $p=0.07$).

Bcl-2 ekspresyonu incelendiğinde ise yaklaşık 1.3 katlık bir azalma gözlemlendi fakat yine istatistiksel olarak anlamlı olmayan ($p = 0.052$) bir sonuç gözlemlendi. 2,5 μ M KRIBB-3 ve 10 μ M BAY11-7082 kombinasyonu 6 saat süre ile siRNA baskılama yapılmamış 22Rv1 hücrelerine uygulandığında, AR-V7 ekspresyonu yaklaşık 1.4 kat azaldı ($p= 0.05$). Ayrıca, AR ifadesinde de herhangi bir değişiklik olmadı ($p= 0.31$).

p65'in ifadesinde ise, yaklaşık 1,5 katlık anlamlı olmayan bir azalma gözlemlendi ($p=0.05$). Bcl-2 ifadesi yaklaşık 2 kat azalırken, Noxa ifadesinde 2.8 katlık bir artış gözlemlendi ve bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p= 0.022$ ve $p=0.01$).

22Rv1 hücrelerinde, AR-V7 siRNA baskılama ve inhibitörlerin kombinasyonunu uyguladıktan sonra elde ettiğimiz sonuçlar ise oldukça anlamlı idi. Bu kombinasyon sonucu, ARV7 ekspresyonu kontrole kıyasla 12.5 katlık oldukça anlamlı bir düşüş gösterdi ($p= 0,01$).

Her ne kadar AR ifadesi kontrol ile karşılaştırıldığında azalmış olsa da, bu azalma AR-V7'de gözlemlenen kadar yüksek düzeyde değil idi (yaklaşık 3,1 kat; $p= 0,02$). p65 ekspresyonu da kontrole kıyasla yaklaşık 2 kat azalma göstermiştir ($p = 0,03$). Bcl-2 ifadesi kontrole kıyasla yaklaşık 5 kat azalırken ($p= 0.01$), Noxa yaklaşık 3.5 kat artış göstermiştir ($p= 0.02$).



Şekil 4.12. 22Rv1 hücre hatlarında AR-V7'ye özgü siRNA baskılamanın inhibitörler ile kombinasyonunun hedef proteinlerin ifadenmesi üzerine etkileri. *; $p < 0.05$.

4.5. AR, AR-V7 ve AR- V567es'nin Kontrol, Prostat Kanserli ve Metastatik Prostat Kanserli Hastaların Tam Kan Örneklerinde mRNA Düzeyinde İfadenme Seviyeleri

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz Real-Time PCR sonuçlarında elde edilen rölatif gen ifadenme sonuçları REST programı kullanılarak Pfaffl tarafından

$$R = \frac{E(\text{hedef})^{\Delta Ct(\text{kontrol-hasta})}}{E(\text{referans})^{\Delta Ct(\text{kontrol-hasta})}}$$

Burada belirtilen Ct değeri, tepkime sırasında oluşan floresan sinyalin eşik değeri (threshold value) geçtiği andaki döngü sayısını ifade eder. Bu değer, tepkime başında mevcut olan cDNA miktarı ile ters orantılıdır. ΔCt değeri ise kontrol ile örneklerin Ct değerleri arasındaki farkı göstermektedir. E değeri; PCR reaksiyonunun etkinliğini belirtir.

Sonuçlarımıza göre (Şekil 4.13), AR mRNA ifadenmesi prostat kanseri (PCa) hasta grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 1,6 katlık bir artış göstermiş olup bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

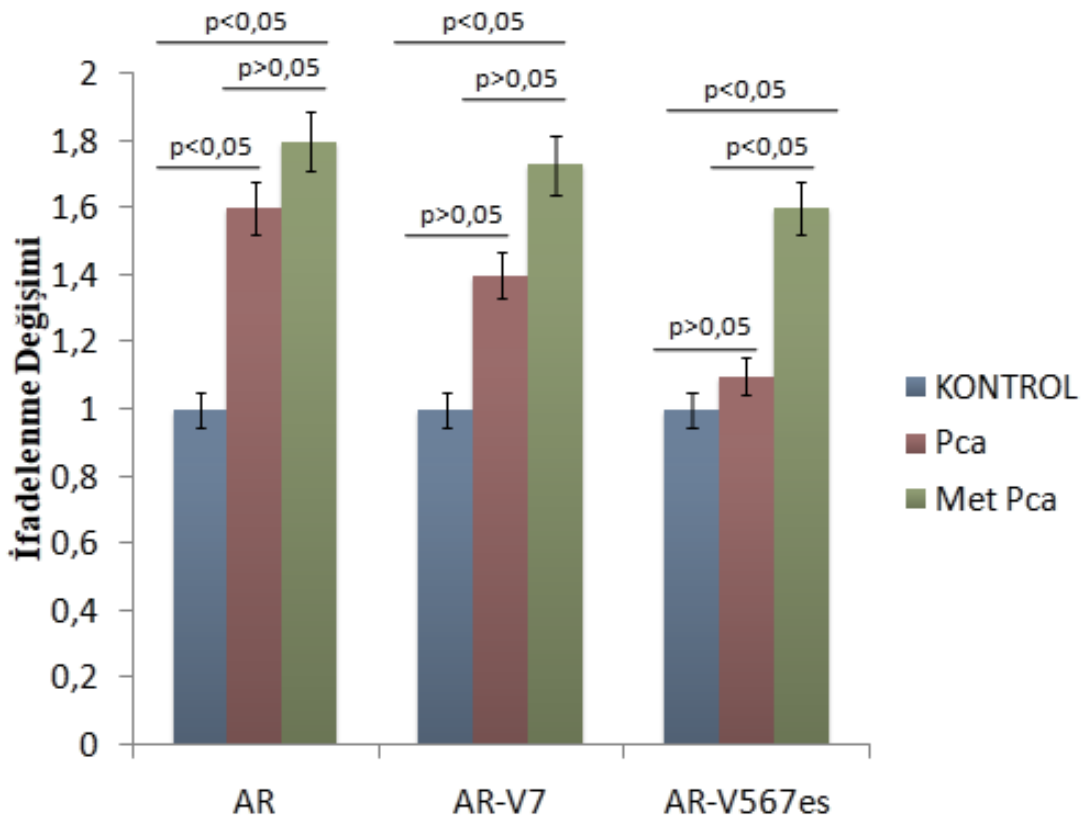
Metastatik prostat kanserli (Met-PCa) hasta grubunda ise AR ifadenmesi kontrol gruba göre yaklaşık 1,8 kat gibi istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. PCa ve Met-PCa hasta grupları karşılaştırıldığında ise AR ifadenmesinde, Met-PCa grubunda hafif bir artış görülmesine karşın, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

AR-V7 mRNA ifadenmesi PCa hasta grubunda kontrol gruba göre yaklaşık 1,4 kat artış göstermiştir fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Met-PCa hasta grubunda ise AR-V7 ifadenmesi kontrol gruba göre yaklaşık 1,7 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Yine Met-PCa hasta grubunda AR-V7 ifadenmesi, PCa hasta grubuna göre artmış gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$), fakat AR-V7 ifadenmesindeki değişim, AR'den daha fazla gözlenmiştir.

AR-V567es varyant mRNA ifadenmesi, PCa hasta grubunda kontrol gruba göre yaklaşık 1,1 kat artış göstermiştir ($p > 0,05$). Met-PCa hasta grubunda AR-V567es ifadenmesi kontrol gruba göre yaklaşık 1,6 katlık anlamlı bir artış göstermiştir

($p<0,05$). Ayrıca, Met-PCa hasta grubunda PCa grubuna göre AR-V567es ifadenmesi anlamlı düzeyde artış göstermiştir. ($p<0,05$).

Pca ve Met-PCa hasta grupları arasındaki en büyük farklılık AR-V567es varyantında görülmüştür. Sonuçlarımıza göre, hastalığın evresi ile hem tam uzunluktaki AR hem de AR varyantlarının (AR-V7 ve AR-V567es) ekspresyon düzeyleri ilişkili gözlenmiştir.



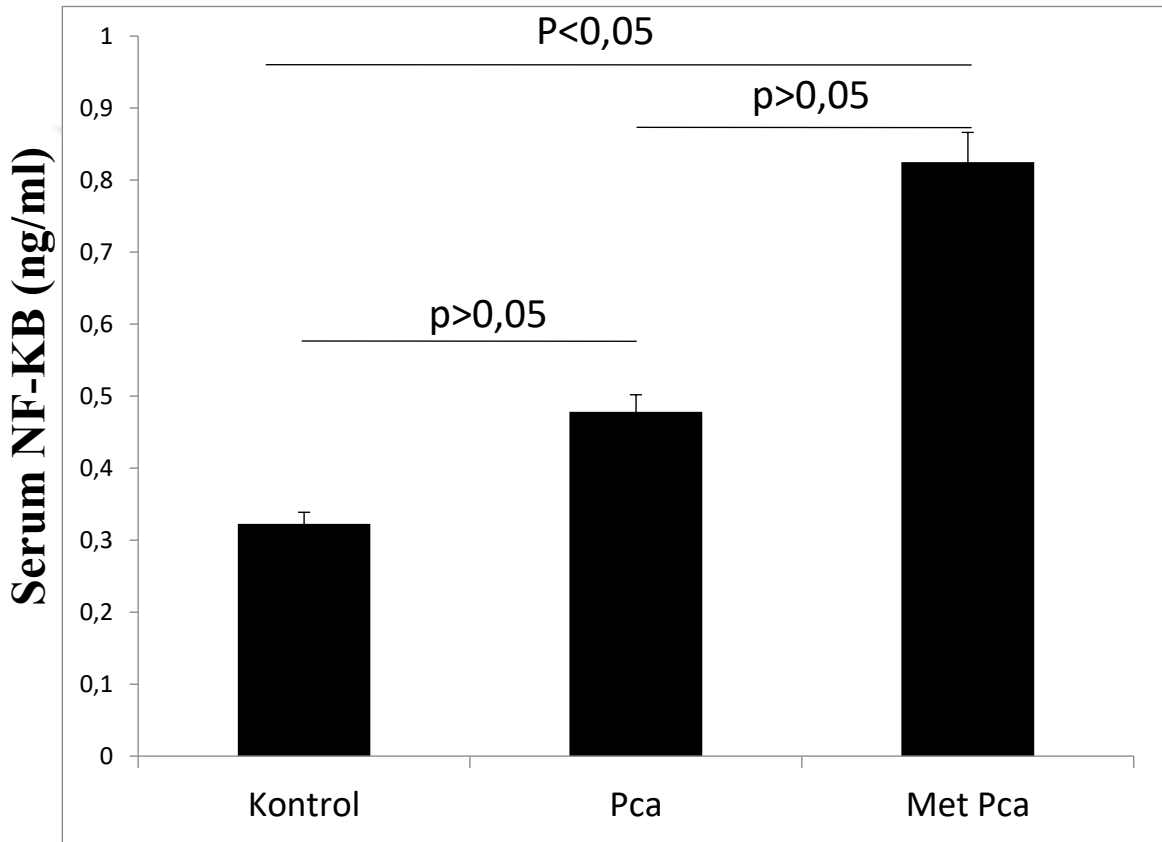
Şekil 4.13. AR ile AR-V7 ve AR-V567es AR varyantlarının kontrol, prostat kanseri (PCa) ve metastatik prostat kanserli (Met-PCa) hasta kanlarındaki mRNA düzeyinde ifadenme değişiklikleri.

4.6. NF- κ B ve HSP-27'nin Kontrol, Prostat Kanseri (PCa) ve Metastatik Prostat Kanseri (Met-PCa) Hastaların Serum Örneklerinde Protein Düzeyinde İfadeleme Düzeyleri

Çalışmamızda hasta örnekleri ile gerçekleştirdiğimiz ikinci aşamasında ise yine aynı kontrol ve hasta serum örneklerinden NF- κ B ve HSP-27 ifadenmesi protein

düzeyinde insana özgü ELISA kitleri ile araştırılmıştır. Sonuçlarımıza göre, PCa grubunda kontrol örneklerine göre yaklaşık 1,5 katlık artmış NF- κ B aktivitesi bulunmasına rağmen, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

NF- κ B düzeyinde Met-PCa hastalarında, kontrol grubuna göre yaklaşık 2,5 katlık anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$). Met-PCa hastalarında, Pca hasta gruplarına göre NF- κ B düzeyinde 1,7 kat gibi önemli miktarda bir artış görülmüştür. (Şekil 4.14)

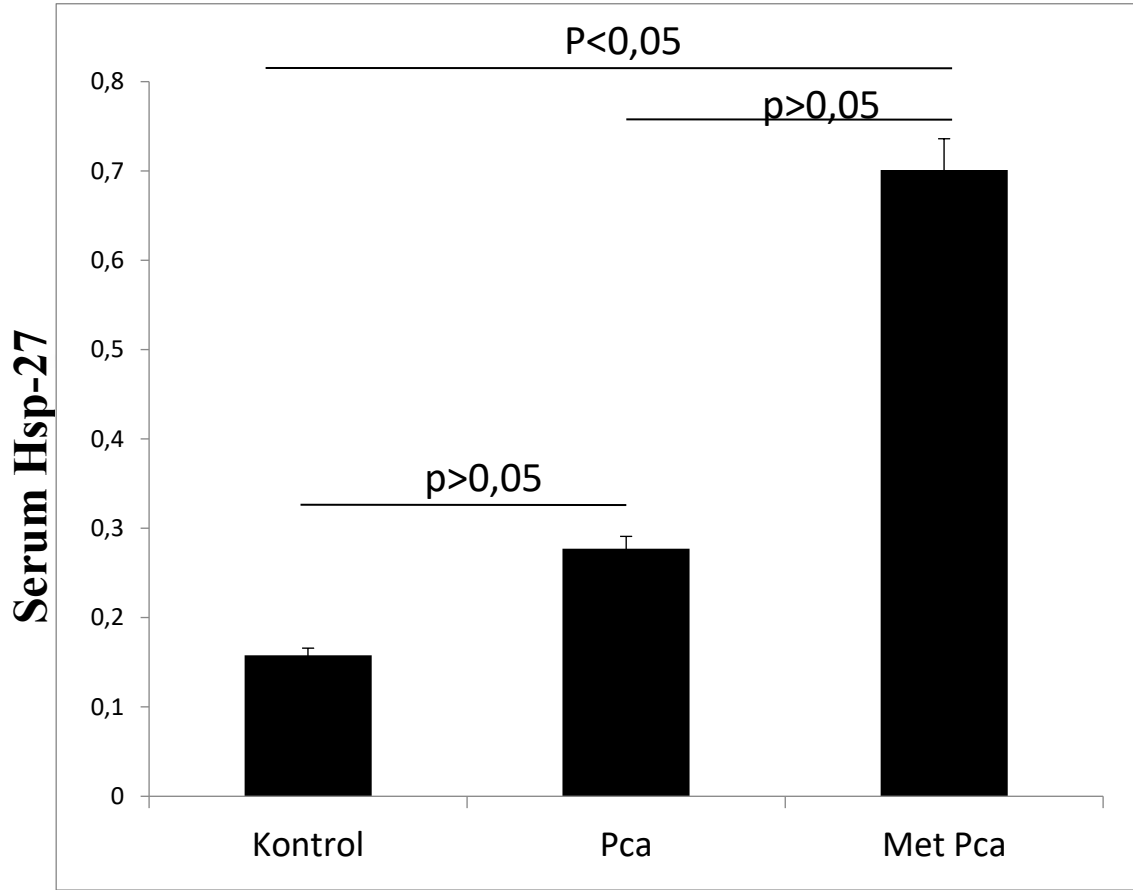


Şekil 4.14: Kontrol, prostat kanseri (PCa) ve metastatik prostat kanserli (Met-PCa) hasta serum örneklerinde NF- κ B ifadelenme düzeyleri.

Hsp-27 serum düzeyi de yine en fazla metastatik PCa hastalarında gözlenmiş olup istatistiksel olarak da anlamlıdır ($p<0,05$). Met-Pca hasta grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 4,6 kat artış gözlenmiştir. Kontrol grubundaki Hsp-27 serum düzeyinin NF- κ B düzeyine göre düşük olması da önemli bir sonuç olarak görülmüştür.

PCa hasta grubunda, kontrol gruba göre yaklaşık 1,7 kat fazla Hsp-27 ifadelenmesi gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir ($p>0,05$). PCa ve

Met-PCa hasta serum HSP-27 düzeylerinde ise, yine metastatik grupta oldukça artmış aktivite görülmesine karşın, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Kontrol, prostat kanseri (PCa) ve metastatik prostat kanserli (Met-PCa) hasta serum örneklerinde Hsp-27 ifadenme düzeyleri.

Hsp-27 serum düzeyi, NF- κ B ile karşılaştırıldığında metastatik hastalarda prostat kanserli hastalara göre daha yüksek farklılık göstermiştir. Ayrıca, kontrol grubuna göre prostat kanseri örneklerinde ekspresyon artışı yine NF- κ B serum düzeyinden daha farklı görünmektedir. Bununla birlikte, kontrol grubunda bulunan Hsp-27 serum düzeyi, NF- κ B serum düzeyinden yaklaşık iki kat daha az miktarda bulunmuştur. Bu bulgu, Hsp-27'nin ileri evre prostat kanserli vakalarda önemli bir serum biyobelirteci olma potansiyelini de artırır niteliktedir.

NF- κ B ve Hsp-27'nin serum seviyeleri, AR ve AR varyantlarında görüldüğü gibi hastalığın evresi ile ilişkili artan bir ifadenme göstermiştir. Ayrıca, NF- κ B ve HSP-27 protein düzeylerinin ve varyant AR'lerinin metastatik prostat kanserli hastalarda

yüksek düzeyde ifadelenme göstermesi, bu proteinler ile androjen reseptörünün genel olarak düzenlenmesi ve aktivitesi arasındaki etkileşimi ortaya koyması açısından da önemli bulgular olarak karşımıza çıkmıştır.



5. TARTIŞMA

Prostat kanseri, batı ülkelerinde erkeklerde en sık görülen malignitedir ve kanser ilişkili ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir. Tarama ve tanıdaki ilerlemeler, teşhis edilen vakaların yaklaşık %85'inde hastalığın erken evrelerinde, terapötik seçeneklerin küratif olduğu ve cerrahi, radyasyon ve bazı durumlarda sadece aktif sürveyansı içerdiği aşamalarda tespit edilmesini sağlamıştır. Bununla birlikte, geç evrede yayılmış hastalık için mevcut tedaviler sadece palyatiftir [62].

Androjen reseptörü, prostat kanserinin başlamasını ve ilerlemesini destekleyen başlıca faktörlerden biri olarak bilinmektedir. AR fonksiyonunun inaktivasyonu, yeni bir kemoterapi yaklaşımı olmasına rağmen, prostat kanseri hastaları için ortaya çıkan yararlar geçici gibi görünmekte ve artan sıklıkla kemorezistans oluşmaktadır [62,63].

AR'nün üzerinde N-terminal kısmı, DNA'ya bağlanan kısım ve hormona bağlanan kısım olmak üzere 3 bölümü vardır. Androjene bağımlı gen ekspresyonu ve hücre gelişimi tam uzunluktaki AR tarafından, androjenden bağımsız transkripsiyonel aktivite ve hücre gelişimi ise karboksi ucu kesilmiş, liganda bağlanan domain içermeyen AR varyantları (AR-V7, 567es) tarafından sürdürülmektedir [64]. Tam uzunluktaki androjen reseptöründen splicing mekanizması ile oluşan androjen reseptörü varyant-7 (AR-V7) ileri evre prostat kanserinde abiraterone, enzalutamid gibi anti-androjen ilaçlara direnç ve kötü prognoz nedeni olarak belirtilmeye başlanmıştır [65,66].

PCa'de anormal AR varyantlarının artan ekspresyonuna aracılık eden mekanizmalar halen büyük ölçüde bilinmemektedir. Hatalı kesimlenmenin olası bir nedeni, KDPK'nde AR lokusunun genomik yeniden düzenlenmesi ve / veya intragenik delesyonların varlığıdır. Alternatif olarak, PCa hücrelerinde belirli kesimleme faktörlerinin anormal ekspresyonu, AR genindeki kriptik ekzonların dengesiz kesimlenmesi ve anormal olarak tanınmasına katkıda bulunabilir. AR varyantlarının üretiminin moleküler mekanizmalarını anlamak, androjen deprivasyonunun etkinliğini arttırmak ve muhtemelen KDPK ilerlemesini tedavi

etmek ve hastanın sağkalımını uzatmak için bu mekanizmaya dayalı inhibitörlerin tasarımı açısından önem taşımaktadır [67].

Bu çalışmada, HSP-27 ve NF- κ B sinyal yollarının prostat kanseri hücre hatları üzerindeki inhibisyonu ile prostat kanseri ilerlemesinde rol aldığı bilinen anormal artmış AR / AR varyantı ekspresyonunu sağlayan moleküler mekanizmaları araştırılmıştır. Ayrıca AR-V7'nin siRNA aracılı susturulmasının bu yollar üzerindeki etkileri incelenmiştir. NF- κ B sinyal yolağı, kanserdeki kronik enflamatuvar yanıtta önemli bir rol oynar. Prostat kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde NF- κ B 'nin anormal aktivasyonu, çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Prostat kanseri ilerlemesi sürecinde, NF- κ B hücresel sağkalımı, tümör invazyonunu ve metastazı artırmaktadır. NF- κ B aktivasyonu, AR sinyalizasyonu ile birlikte kastrasyona dirençli prostat kanseri gelişiminin ilerlemesinde büyük rol oynar Bu nedenle NF- κ B sinyalizasyonu, prostat kanseri tedavisinde kompleks onkogenetik rolü nedeniyle önemli bir terapötik hedef olarak görülmektedir [68,69]. Abirateron veya enzalutamid gibi anti-androjenlere dirençte artık önemli bir faktör olarak kabul edilen AR-V7'yi göz önünde bulundurarak, ileri evre prostat kanserinde NF- κ B inhibisyonunun terapötik potansiyeli hakkında daha fazla bilgi edinmek için, prostat kanserinde AR-V7 ve NF- κ B arasındaki etkileşimi araştırmak bu nedenle önemlidir.

Zhang ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, hücre ve hayvan modellerini kullanarak AR'nün NF- κ B ile regülasyonunun moleküler mekanizmalarını araştırmışlardır. Bu araştırmacılar, NF- κ B 'nin, insan prostat kanseri hücrelerinin AR ekspresyonunu, aktivitesini ve proliferasyonunu doğrudan düzenleyebildiğini göstermişlerdir. Sonuçları, NF- κ B ve AR sinyalizasyonunun prostat kanserindeki önemli bağlantılarını göstermiştir. Ayrıca, NF- κ B inhibitörleri uygulanmasının AR ekspresyonunu ve prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, NF- κ B alt birimlerinin, insan AR promotörü içindeki konsensüs NF- κ B bağlanma bölgelerine spesifik olarak bağlandığını belirtmişlerdir. Sonuçları, NF- κ B sinyal yolağının prostat kanserinde AR ekspresyonunu düzenleyebileceğini ve NF- κ B inhibitörlerinin terapötik potansiyele sahip olabileceğini göstermiştir [70].

NF- κ B yolağının aktivasyonu, hem inflamasyon hem de liganddan bağımsız prostat kanseri progresyonu ile bağlantılıdır. Austin ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, kanonik NF- κ B sinyalizasyonunun, ileri evre BPH vakalarında yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir. Doku örneklerinde gerçekleştirdikleri bu çalışmada, ileri BPH örneklerinde AR-V7 ifadesi yüksek bulunurken, diğer AR varyantlarında ifadenin bulunmadığı görülmüştür. Ayrıca artmış NF- κ B sinyalizasyonu, hastalığın progresyonu ile bağlantılı olarak androjen reseptörü varyantı ekspresyonu ile de ilişkili olarak bulunmuştur [71].

Isı şoku proteinleri (HSP), karmaşık bir etkileşim halinde çalışan, tüm hücrelerde ve tüm hücre bölmelerinde bulunan şaperon proteinlerinin bir üst ailesini oluşturur. Bu moleküller, prostat kanseri hücrelerinin ortaya çıkmasına eşlik eden tümörögenезin şaperonları olarak işlev görür, hastalık agresifliği ve anti-kanser tedavilerine direnç ile birlikte faydalı moleküller belirteçler olarak bilinmektedirler. Ayrıca, hormon tedavisi, radyoterapi, kemoterapi gibi tedaviler için hedef olarak kullanılabilirler. Bu moleküllerden HSP-27'nin anormal ekspresyonu, prostat kanseri de dahil olmak üzere çeşitli klinik araştırmalarda metastatik progresyon ile ilişkilendirilmiştir. Ek olarak, HSP-27'nin prostat kanseri için kötü klinik sonuçların bağımsız bir prediktörü olduğu gösterilmiştir [72].

Zoubeidi ve arkadaşları, HSP-27'nin AR'nin hücresel sinyalizasyonu, aktivasyonu, stabilizasyonu ve transkripsiyonel regülasyonu için önemli bir regülatör olduğunu yaptıkları çalışmada belirtmişlerdir. Çalışmada, HSP-27 inhibitörü OGX-427 adı verilen ve klinik denemeleri hala devam eden bir antisense oligonükleotidi hücre hatlarında ve hayvan modelinde kullanmışlardır. Sonuçlarına göre, AR ve HSP-27'nin varlığı, prostat kanseri hücrelerini apoptotik stresden koruduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, HSP-27 ekspresyonunun baskılanması sonucu, proteazom aracılı yolla AR yıkımını indüklediğini göstermişlerdir. [73].

Stope ve arkadaşları, HSP-27'nin önemli bir terapötik hedef olmasını sağlayan hormona bağımlı evreden kastrasyona dirençli hücrelere ilerlemedeki rolü nedeniyle, AR sinyalizasyon ağının önemli bir bileşeni olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında, AR-pozitif LNCaP hücrelerinin HSP27'ye özgü siRNA ile baskılanması sonucu, AR seviyesinin hem mRNA hem de protein düzeyinde

azaldığını göstermişlerdir. İlginç bir şekilde, fonksiyonel bir AR proteini üretemeyen PC-3 hücrelerinde, HSP27'nin aşırı ekspresyonu, bu hücrelerin AR mRNA üretiminde önemli bir artışa yol açmıştır. [74].

HSP-27 aktivasyonu ayrıca büyük ölçüde fosforilasyon yolu ile düzenlenir. Yapılan çalışmalarda anormal HSP-27 fosforilasyon durumunun kanser gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. HSP-27'nin transkripsiyonel aktivitesini düzenleyen, dolayısıyla hücre döngüsü düzenlemesinde bir etkiye sahip olan p53 ile etkileşime girdiği bilinmektedir. Fosforile formdaki HSP-27, hücreleri ısı şokuna, apoptoz efektörlerine, oksidatif strese ve iskemiye karşı koruyarak apoptozu önlemektedir. HSP-27 ayrıca Bax proapoptotik proteinini etkisiz hale getirerek Smac ve sitokrom C salınımını bloke edebilir. Bu noktada, farklı yollarda etkili olan apoptotik efektörler tarafından apoptoz düzenlenmesi gerçekleştirilen hücrelerde, HSP-27'nin lokalizasyon kaybı, değişmiş oligomerik boyutları ve negatif olan fosforilasyon durumlarına sahip olması önemlidir. [75].

Çalışmamızda prostat kanseri hücre hatlarına NF- κ B ve HSP-27 inhibitörleri uygulanması sonucunda hücre canlılığı, her üç hücre hattında da 24 saatlik kombine dozda önemli ölçüde azalma göstermiştir. Bununla birlikte, PC-3 hücre hattı, ilaçlara karşı LNCaP ve 22Rv1 hücre hatlarına göre daha yüksek duyarlılık göstermiştir. Bu duyarlılığın kaynağı büyük ölçüde HSP-27 inhibitörü KRIBB-3'ten kaynaklanmıştır. Ayrıca KRIBB-3, BAY11-7082'nin anti-proliferatif etkisini büyük ölçüde artırmıştır. Çalışmada kullanılan PC-3 hücre hattı androjenden bağımsız iken, LNCaP ve 22Rv1 hücre hatları androjen-bağımlıdır. Bu durum hücrelerin inhibitöre tepkilerindeki farklılıklarını da büyük ölçüde açıklamaktadır.

Voll ve arkadaşlarının androjenden bağımsız hücre hatları ile yaptıkları bir çalışmada, HSP-27 inhibisyonunun, hücre gelişimini ve tümör oluşumunu azalttığını ve HSP-27'nin androjen bağımsız evreye ilerlemede önemli bir rolü olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, tümör büyümesinin yanı sıra metastazını da artırdığını göstermişlerdir. [76]. HSP-27 inhibisyonunun bu nedenle PC-3 hücrelerinde, diğer hücre hatlarına kıyasla daha yüksek bir inhibitör etki göstermiş olabileceği düşünülmektedir.

22Rv1 hücreleri inhibitörlere diğer hücre hatlarına nazaran daha dirençli olarak gözlemlenmiştir. Bu sonuç AR-V7 ifadelenmesinin etkisini açıklaması açısından oldukça önemlidir. 22Rv1 hücreleri, AR-V7 ekspresyonunu protein seviyesinde yüksek olarak gösterdiğinden, ilaçlara direncin nedenini bu durum büyük ölçüde açıklamaktadır.

Sonuçlarımıza göre, p65 ekspresyonunda ve IKK α / β fosforilasyonundaki azalma, her üç hücre hattında da kombine dozda gözlenmiştir. Burada, BAY11-7082 ve KRIBB-3 bu etkiyi sinerjistik olarak göstermiştir. Kombine uygulamada, IKK α / β fosforilasyonundaki azalma, IKK ekspresyonundaki azaltmayı engellediğinden dolayı NF- κ B yolağını inhibe etmiştir. Bununla birlikte, PC-3 hücrelerinde bu azalma, LNCaP ve 22Rv1 hücre hatlarına nispeten daha az gözlenmiştir. Bu etkinin, muhtemelen PC-3 hücre hattının metastatik doğasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Önemli bir sonuç olarak, HSP-27 fosforilasyonunun, her üç hücre hattında da kombine dozda oldukça azaldığı gözlenmiştir. Bu durum, HSP-27 inhibisyonunun, NF- κ B yolağının inhibisyonu ile yüksek düzeyde bağlantılı olduğunu göstermesi açısından önemlidir.

22Rv1 hücre hattında AR ve AR-V7 ekspresyonunda önemli bir azalma, 48 saatlik kombine dozlarda gözlenmiştir. Ek olarak, 22Rv1 hücrelerinde AR ekspresyonundaki bu azalma aynı zamanda bu ilaçların AR ve varyant AR formasyonu üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olması açısından önemli bir sonuç olarak karşımıza çıkmıştır. Bu açıdan sonuçlarımız, daha önceki çalışmalarda belirtilen AR'nin varyant AR ile birlikte çalıştığı gözlemleriyle tutarlılık göstermiştir [77]. Bu ileri doğrulama sonucunda, AR ifadesi 22Rv1 hücrelerinde AR-V7 siRNA baskılamasından sonra azalma göstermiştir.

22Rv1 hücrelerine siRNA ile birlikte düşük doz ve sürede ilaç kombinasyonunun uygulanmasından sonra, AR ve AR-V7 ekspresyonu belirgin şekilde azalış göstermiştir. Ayrıca bununla bağlantılı olarak, AR /AR-V7 ekseninin inhibisyonu, p65 ekspresyonunda bir azalmayla sonuçlanmıştır. p65 ekspresyon seviyesinde meydana gelen bu azalma, NF- κ B transkripsiyon faktörlerinin birlikte nükleusa transportunu engelleyerek yolağın inhibisyonunun yanında, AR promotor bağlantısını da engelleyeceği için önemli bir sonuçtur.

siRNA baskılamanın ilaçlarla kombinasyonu sonucu Noxa ekspresyonunda artış ve Bcl-2 ekspresyonunda azalış olarak görülen apoptotik yanıt, AR-V7 inhibisyonuna ek olarak önemli bir sonuçtur. Nunes ve diğerlerinin prostat kanseri hücre hatları ile yaptıkları bir çalışmada, NF- κ B inhibisyonunun, AR-V7'nin proteazom aracılı degradasyonunu uyarırken apoptoz aktivasyonunu da indüklediği gösterilmiştir. Bunun yanında, AR ekspresyonunda da önemli azalma bulmuşlardır [78].

Sonuçlarımızda, bahsedilen çalışmalardan farklı olarak AR-V7 siRNA baskılama ve NF- κ B inhibisyonunu ile HSP-27 inhibisyonunun kombinasyonu, AR yolağını daha yüksek düzeyde inhibe ederken apoptotik aktivasyon da gözlenmiştir. Buna ek olarak, bir AR varyantı şaperonu olarak HSP-27, doğrudan AR NTD bölgesine bağlanır ve bu durum, Hsp-27'nin prostat kanseri tedavi direnci ve hücre sağkalımı arasında önemli bir bağlantısı olduğunu göstermektedir [79].

Li ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, AR membran taşınmasının mikrotübüler bağımlı olduğunu ve HSP-27'nin, bu transportu kolaylaştırarak AR'nün nükleusa translokasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Bu çalışmada, HSP-27'nin aktivasyonu sonucu, membran ilişkili AR'nün, nükleer AR transkripsiyonel aktivitesini artırdığını göstermişlerdir. Ayrıca, AR membran translokasyonunun bozulmasının, prostat kanserinde terapötik olarak AR sinyalini hedeflemeye yönelik potansiyel bir strateji olabileceğini belirtmişlerdir. [80]. KRIBB-3 ile yapılan daha önceki çalışmalar, HSP-27 fosforilasyonunun bir inhibitörü olmasının yanı sıra mikrotübül inhibitörü olduğunu da göstermiştir [58,80]. Çalışmamızda, KRIBB-3 uygulaması sonucu AR ve AR-V7 ekspresyonunu oldukça azalmış olarak görmemizin nedeni de muhtemelen AR'nün nükleus içi transportu bozulduğu için sitoplazmada kalan AR'nün, proteolitik yolak sonucu degrade edilmiş ve aktivitesini yitirmiş olmasıdır.

HSP-27 ve NF- κ B inhibisyonu sonucu AR ve AR-V7 ekspresyonu önemli derecede azalırken, tersi şekilde AR-V7 ekspresyonu baskılandığında da bu yolların inhibe olduğu bulunmuştur. Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen bu sonuçlar, androjen reseptörünün ve varyantlarının HSP-27 ve NF- κ B sinyal yolağı ile bağlantısını gösteren önemli veriler ortaya koyduğundan, in-vitro aşamadan sonra çalışmaya in-vivo olarak devam edilmiştir.

İleri evre prostat kanserinde metastatik dokuya erişimin zor olması ve elde edilen kanserli hücrelerdeki genetik heterojenite direnç mekanizmalarının altında yatan nedenin belirlenememesindeki en önemli zorluklardandır. Literatürde AR mutasyonları, AR gen amplifikasyonu ve varyant AR aşırı ekspresyonu ve AR'nün diğer sinyal transdüksiyon yollarıyla aşırı aktivasyonunu gösteren çalışmalar mevcuttur [62,63].

Androjen deprivasyon tedavisi sırasında ileri evre tumor örneklerinde AR/varyant AR ekspresyonunda belirgin bir artışa işaret eden AR proteinin daha yüksek seviyeleri, tedavi direncinde de kritik bir noktadır. Doku örneği eldesi invaziv bir aşama olduğundan ve örneklerdeki heterojeniteden dolayı hastalardan periferik kan eldesi uygun bir yöntemdir. Bu amaçla, Gazi Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalına başvurmuş hastalardan onay alınarak sağlıklı kontrol ve prostat kanserli hastalardan kan örnekleri temin edilmiştir. Takip eden deneysel yöntemler; kandan serum eldesi, RNA izolasyonu, Real-Time PCR yöntemi ve ELISA yöntemi olarak gerçekleştirilmiştir.

Kwan ve arkadaşlarının yaptıkları yeni bir çalışmada metastatik kastrasyona dirençli prostat kanserinde tam kandan androjen reseptör tabanlı gen imzasının prognostik yararlılığının olduğunu, güncel sistemik tedavilere başlayan mKDPK hastalarında göstermişlerdir. Bu çalışmada, AR-V7 ekspresyonu ile diğer AR tarafından regüle edilen GRHL2, HOXB13, ve FOXA1 genlerinin ekspresyonlarının korele olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca AR ilişkili önemli genlerin ekspresyonunun, ileri evre prostat kanserli erkeklerin, güncel ilaç tedavilerine başladıktan sonra ne kadar süre hayatta kalacağını belirlemeye yardımcı olduğunu belirtmişlerdir [82].

Seitz ve arkadaşları, KDPK hastaların periferik tam kanında AR-V7 ekspresyonu ile anti-androjen terapi yanıtı ile ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında, yüksek AR-V7 ekspresyonunun düşük sağkalımla ilişkili olduğunu ve ilaç direncine neden olduğunu belirtmişlerdir. AR-V7 mRNA seviyelerinin tam kanda test edilmesinin, anti-androjen alan mKDPK hastalarında tedavi sonucunu tahmin etmek için basit ve ümit verici bir yaklaşım olduğunu belirtmişlerdir [83].

Todenhöfer ve arkadaşlarının yine AR-V7 ekspresyonu ile anti-androjen terapi yanıtı ile ilişkisini araştırdıkları bir başka çalışmada AR varyantı varlığının yüksek prediktif bir değeri olduğu, ekspresyon seviyesi ile hastalık evresinde pozitif bir korelasyon olduğunu ve yüksek varyant ekspresyonu ile ilaç direnci ve düşük sağkalım arasında da kuvvetli bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada, abirateron sonuçlarını AR-V7'nin tam kan ekspresyonu ve diğer prostat kanseri ile ilişkili transkriptler ile ilişkilendirmek için dolaşımsal tümör hücresi (CTC) zenginleştirmesi gerektirmeyen hassas, tam kandan ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu yaklaşımını kullanmışlardır. [84].

Liu ve arkadaşlarının prostat kanserli hastalarda AR-V7 ve AR-V567es varyantlarının tam kanda ekspresyon durumlarını araştırdıkları çalışmalarında tam kan yaklaşımının AR varyantlarını saptamaya uygun olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bizim çalışmamızda da olduğu gibi ekspresyon düzeyini real-time PCR yöntemi ile araştırmışlardır. Sonuçlarında, AR varyant pozitifliğinin güçlü bir ikinci hat hormonal tedavi geçmişi ile ilişkisi olduğunu ve ileri evre hastalıkta bu pozitifliğin arttığını belirtmişlerdir. Bu çalışmanın daha da önemli bir başka yönü ise AR-V567es ve AR-V7 varyantlarını metastatik hastaların önemli bir bölümünde tespit eden, tam kan kullanılarak yapılan ilk çalışma olmasıdır. Ayrıca, bu araştırmacılar, CTC seçim sürecini ortadan kaldırarak, uygulama süresini kısalttıklarını ve testin hassasiyetinin daha da arttığını ve böylece daha fazla hastanın bu testlerden faydalanmasını sağlayacağını belirtmişlerdir. Nitekim, bu çalışmada AR-V7 ifadesi yüksek hasta yüzdesi, CTC tabanlı testten daha yüksek bulunmuştur. [85].

Bununla birlikte To ve arkadaşlarının tam kandaki AR varyantı 7 veya 9'un ekspresyonunu araştırdıkları çalışmalarında, metastatik KDPK'de androjen yolağını hedefleyen ajanlara yanıt tahmin edemediğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca progresyonsuz sağkalım oranının varyant pozitif ve varyant negatif hastalar arasında anlamlı bir farklılık olmadığını da belirtmişlerdir. Bu sonucu, ARMOR3-SV adı verilen klinik araştırmadaki bulgulara dayandırarak, verilerinin bazal AR varyant ekspresyonunun abirateron veya enzalutamid alan mKDPK hastalarındaki sonuçları öngörmediğini göstermişlerdir. ARMOR3-SV, 2016'da tamamlanmış AR-V7 mRNA düzeyinde ifade eden metastatik hastalarda enzalutamid ile galeteron etkinliğini karşılaştıran çok merkezli bir klinik denemedir. [86].

Takeuchi ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada da tam kanda AR-V7 mRNA'nın saptanmasının, yeni endokrin ilaçların kastrasyona dirençli prostat kanseri için etkinliğini öngöremeyeceğini belirtmişlerdir. Ayrıca AR-V7 ekspresyonu yüksekliği ile klinik parametreler arasında da anlamlı bir ilişki olmadığını da belirtmişlerdir [87].

Çalışmamıza 25 adet kontrol, 25 adet PCa ve 40 adet metastatik PCa tanısı almış hasta dahil edilmiştir. Sonuçlarımıza göre, AR ekspresyonu PCa ve metastatik PCa grubunda artış göstermiştir. Metastatik grupta ise PCa grubuna göre daha yüksek AR ekspresyonu görülmesi, ileri evre prostat kanserinde görülen yüksek AR aktivitesi ile uyumludur. Ayrıca, AR-V7 ve AR-V567es ifadenmesinin metastatik PCa grubunda anlamlı olarak yüksek ifadenme göstermesi bahsedilen çalışmalarla uyumlu olarak hastalık evresi ile ekspresyon düzeyinin ilişkili olduğunu göstermiştir.

Literatürde mevcut bu çalışmalarda, varyant ekspresyonunun bir mekanizma ile bağlantısı gösterilmemiştir. Sadece varyant ekspresyonu varlığı veya yokluğu araştırılarak ilaca direncin öngörülmesi yeterli değildir. Ayrıca mevcut çalışmalarda da bu konuda araştırmacıların hemfikir olmadığı görülmektedir. Bununla birlikte, çalışmaların sonuçları hasta seçimi, çalışmada kullanılan yöntem, yorumlanma farklılıkları gibi pek çok etmenden dolayı değişkenlik gösterebilmektedir.

Bilindiği gibi, androjen reseptörü etkinliği pek çok sinyalizasyon mekanizması ile birlikte düzenlenir. Bu mekanizmalar, prostat kanseri progresyonunda da rol oynayan onkojenik yolaklardır. Genel bilgiler kısmında da bahsedildiği gibi, prostat kanseri progresyonunda ve AR'nün düzenlenmesinde bu yolakların önemi oldukça fazladır. HSP-27 ve NF- κ B sinyal yolağı ile AR/varyant AR ekspresyonunun ilişkisinin hasta kan örneklerinde incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan çalışmamız özgün bir değer taşımaktadır.

Varyant ifadenmesinin yüksek görüldüğü metastatik grupta, HSP-27 ve NF- κ B aktivitesi de protein düzeyinde yüksek ifadenme göstermiştir. Bu durum, HSP-27 ve NF- κ B sinyal yolaklarının terapötik hedef potansiyelini artırır niteliktedir. Bu sonuçlara göre, HSP-27 ve NF- κ B sinyalizasyonu, ileri evre prostat kanserinde varyant ekspresyonunu düzenleyen önemli faktörler olarak görülmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanserojenez sürecini anlamak için kanser hücrelerinde aktif yaşamsal sinyalleri hedefleyerek proliferasyonu azaltmak önemli bir stratejidir. Prostat kanserinin tümöröenez, metastatik progresyon ve tedavi direncinde rol oynayan bir çok sinyal yolağında defektler mevcuttur. Bu nedenle androjen reseptörü gibi regülasyonu bozulmuş yolakları hedeflemeye yönelik uzun yıllardır uygun ajanlar geliştirilmeye ve kliniğe uyarlanmaya çalışılmaktadır. Özellikle tek başına anti-androjen tedavilerinden verimli yanıt alınamaması ve nüks prostat kanserinin moleküler biyolojisini anlamada araştırmacıları yeni yollar aramaya itmiştir. Androjen reseptörü, prostat kanserinin başlamasını ve ilerlemesini destekleyen başlıca faktörlerden biri olarak büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında, HSP-27 inhibitörü KRIBB-3 ile NF- κ B yolağı inhibitörü BAY-117082'nin prostat kanserli hücre hatları PC-3, LNCaP ve 22Rv1 üzerindeki anti-proliferatif ve anti-apoptotik etkileri incelendi. Ayrıca, AR-V7 eksprese eden 22Rv1 hücre hattı üzerinde bu inhibitörlerin ve AR-V7 siRNA gen susturmasının kombinasyonu ile ilişkili genler olan NF- κ B-p65, p-IKK α/β , p-HSP-27, AR, AR-V7 ve AR-V567es genleri üzerindeki etkileri protein düzeyinde incelenmiştir. Çalışmanın in-vivo kısmında ise, Üroloji kliniğine başvuran hastalardan temin edilen total periferik kan örneklerinden AR, AR-V7 ve AR-V567es genlerinin real-time PCR yöntemi ile RNA düzeyinde ekspresyonları incelenerek hastalığın evresine özgü ifade profillemesi yapılmıştır. Daha sonra, bu kanlardan elde edilen serum örneklerinde NF- κ B yolağı ve HSP-27 aktivitesi insana özgü ELISA kitleri ile protein düzeyinde araştırılmıştır.

Prostat kanserli hücre hatlarında Hsp-27 ile NF-KB yolağının inhibitörlerinin kombinasyonu sinerjistik olarak hücrelerin proliferasyonunu azaltmakla birlikte, bu yolakların aktivitesini de inhibe etmiştir. Bununla birlikte, bu ilaçların kombinasyonu sonucu AR ekspresyonunda da anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Ayrıca, 22Rv1 hücrelerinde AR ile birlikte AR-V7 ekspresyonunda da gözlenen azalmış ifadenme düzeyi, AR ve AR-V7'nin birlikte çalıştığını destekleyen bir sonuç olması açısından oldukça önemlidir. 22Rv1 hücrelerinde AR-V7'nin siRNA baskılanmasından sonra

AR ifadesinde görülen azalma da bu sonucu destekleyen önemli bir bulgudur. AR-V7 siRNA baskılamanın düşük doz ve süreli olarak inhibitörlerle kombinasyonu da apoptotik uyarım olarak protein düzeyinde gözlenmiştir.

AR sinyalizasyonu ve NF- κ B ile HSP-27 protein düzeylerinin metastatik hasta grubunda anlamlı derecede yüksek düzeyde olması, bu sinyal yolları ile androjen reseptörünün düzenlenmesi ve aktivitesi arasındaki etkileşimi ortaya koyması açısından oldukça önemli sonuçlar olarak karşımıza çıkmıştır. Bu sonuçlara göre, ileri evre prostat kanseri vakalarında güncel yaklaşım olan androjen reseptörleri blokajının yanı sıra, NFKB sinyal yolağını ve AR regülatörü olduğu daha önceki çalışmalarda ortaya konan HSP-27 proteinini hedefleyen terapilerin de önemli olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Gerdes, M. J., Sood, A., Sevinsky, C., Pris, A. D., Zavodszky, M. I., and Ginty, F. (2014 Dec). Emerging understanding of multiscale tumor heterogeneity. *Frontiers in Oncology*, 18;4:366.
2. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer :the next generation. *Cell*, 144:646–74.
3. Gulam, W., and Haseeb, A. (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis*, 5: 14.
4. Casey, S. C., Vaccari, M., Al-Mulla, F., Al-Temaimi, R., Amedei, A., and Felsher, D. W. (2015 Jun). The effect of environmental chemicals on the tumor microenvironment. *Carcinogenesis*, 36(Suppl 1): S160–S183.
5. Bertolaso, M., Dieli, A. M. (2017 Oct). Cancer and intercellular cooperation. *Royal Society Open Science*, 4;4(10):170470
6. İnternet: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> Son Erişim Tarihi: 13.06.2019.
7. İnternet: World Health Organization - Cancer Country Profiles, 2014. Web: https://www.who.int/cancer/country-profiles/tur_en.pdf Son Erişim Tarihi: 13.06.2019.
8. İnternet: American Cancer Society. Cancer Facts & Figures (2018). Atlanta: American Cancer Society. Web: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2018/cancer-facts-and-figures-2018.pdf> adresinden 13 Haziran 2019'da alınmıştır.
9. İnternet: T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Türkiye Kanser İstatistikleri. Web: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/2014-RAPOR._uzuuun.pdf adresinden 13 Haziran 2019'da alınmıştır.
10. Taitt, H. E. (2018 Nov). Global Trends and Prostate Cancer: A Review of Incidence, Detection, and Mortality as Influenced by Race, Ethnicity, and Geographic Location. *American Journal of Men's Health*, 12(6): 1807–1823.
11. Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. J. (2015 Mar). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2):87-108.
12. Giri, V.N., and Beebe-Dimmer, J. L. (2016 Oct). Familial prostate cancer. *Seminars in Oncology*, 43(5):560-565.
13. Chen, H., Griffin, A. R, Wu, Y. Q, Tomsho, L. P, Zuhlke, K. A, Lange, E. M, Gruber, S. B, and Cooney, K. A. (2003 Mar). RNASEL mutations in hereditary prostate cancer. *Journal of Medical Genetics*, 40(3):e21.

14. Lavalette, C., Trétarre, B., Rebillard, X., Lamy, P. J., Cénée, S., and Menegaux, F. (2018 Oct). Abdominal obesity and prostate cancer risk: epidemiological evidence from the EPICAP study. *Oncotarget.*, 2; 9(77): 34485–34494.
15. Aaron, L., Franco, O., and Hayward, S. W. (2016 Aug). Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of BPH. *Urologic Clinics of North America*, 43(3): 279–288.
16. Wilson, A. H. (2014 Aug). The prostate gland: a review of its anatomy, pathology, and treatment. *JAMA.*, 6;312(5):562.
17. Lilja, H., Ulmert, D. and Vickers, A. J. (2010). Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nature Reviews Cancer*, 8: 268-278.
18. DeMarzo, A. M, DeWeese, T. L, Platz, E. A, Meeker, A. K, Nakayama, M. Epstein, J. I, Isaacs, W. B, and Nelson, W. G. (2004). Pathological and molecular mechanisms of prostate carcinogenesis: implications for diagnosis, detection, prevention, and treatment. *Journal of Cellular Biochemistry*, 91: 459–477.
19. Schrecengost, R., and Knudsen, K. E. (2013 Jun). Molecular pathogenesis and progression of prostate cancer. *Seminars in Oncoogy.*, 40(3):244-58.
20. Knudsen, B. S, and Vasioukhin, V. (2010). Mechanisms of prostate cancer initiation and progression. *Advances in cancer research*, 109:1–50.
21. Stanbrough, M., Leav, I., Kwan, P. W, Bubley, G. J, and Balk, S. P. (2001 Sep). Prostatic intraepithelial neoplasia in mice expressing an androgen receptor transgene in prostate epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 11;98(19):10823-8.
22. Zhu, C., Luong, R., Zhuo, M., Johnson, D. T, McKenney, J. K, Cunha, G. R, and Sun, Z. (2011). Conditional expression of the androgen receptor induces oncogenic transformation of the mouse prostate. *The Journal of Biological Chemistry*, 286:33478–33488.
23. McCall, P., Gemmell, L. K., Mukherjee, R., Bartlett, J. M, and Edwards, J. (2008 Mar). Phosphorylation of the androgen receptor is associated with reduced survival in hormone-refractory prostate cancer patients. *British Journal of Cancer*, 25;98(6):1094-101.
24. Tomlins, S. A., Rhodes, D. R., Perner, S., Dhanasekaran, S. M., Mehra, R., and Chinnaiyan, A. M. (2005 Oct). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*, 28;310(5748):644-8.
25. Mertz, K. D., Setlur, S. R., Dhanasekaran, S. M., Demichelis, F., Perner, S., and Rubin, M. A. (2007). Molecular characterization of TMPRSS2-ERG gene fusion in the NCI-H660 prostate cancer cell line: a new perspective for an old model. *Neoplasia*, 9:200–206.

26. Bastus, N. C., Boyd, L. K., Mao, X., Stankiewicz, E., Kudahetti, S. C., Oliver, R. T., Berney, D. M., and Lu, Y. J. (2010 Dec). Androgen-induced TMPRSS2:ERG fusion in nonmalignant prostate epithelial cells. *Cancer Research*, 1;70(23):9544-8.
27. Krohn, A., Diedler, T., Burkhardt, L., Mayer, P. S., De Silva, C., and Schlomm, T. (2012 Aug). Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *The American Journal of Pathology*, 181(2):401-12.
28. Hawksworth, D., Ravindranath, L., Chen, Y., Furusato, B., Sesterhenn, I. A., McLeod, D. G., Srivastava, S., and Petrovics, G. (2010). Overexpression of C-MYC oncogene in prostate cancer predicts biochemical recurrence. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 13:311–315.
29. Shafi, A. A., Yen, A. E., and Weigel, N. L. (2013 Dec). Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 140(3):223-38.
30. Koochekpour, S. (2010 Sep). Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology*, 12(5):639-57.
31. Giovannucci, E., Stampfer, M. J., Krithivas, K., Brown, M., Dahl, D., Brufsky, A., Talcott, J., Hennekens, C. H., and Kantoff, P. W. (1997 Apr). The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1;94(7):3320-3.
32. Gelmann, E. P. (2002 Jul). Molecular biology of the androgen receptor. *Journal of Clinical Oncology*, 1;20(13):3001-15.
33. Kim, Y. S., Alarcon, S. V., Lee, S., Lee, M. J., Giaccone, G., Neckers, L., and Trepel, J. B. (2009). Update on Hsp90 inhibitors in clinical trial. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9(15):1479-92.
34. Wolf, I. M., Heitzer, M. D., Grubisha, M., and DeFranco, D. B. (2008 Aug). Coactivators and nuclear receptor transactivation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1;104(5):1580-6.
35. Cunha, G. R., Cooke, P. S., and Kurita, T. (2004 Dec). Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Archives of Histology and Cytology*, 67(5):417-34.
36. Yu, S. Q., Lai, K. P., Xia, S. J., Chang, H. C., Chang, C., and Yeh, S. (2009 Jan). The diverse and contrasting effects of using human prostate cancer cell lines to study androgen receptor roles in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology*, 11(1):39-48.
37. Toivanen, R., and Shen, M. M. (2017 Apr). Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Development*, 15;144(8):1382-1398.

38. Miller, W. L. (2017 Nov). Steroidogenesis: Unanswered Questions. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(11):771-793.
39. Yuan, X., Cai, C., Chen, S., Chen, S., Yu, Z., and Balk, S. P. (2014 May). Androgen receptor functions in castration-resistant prostate cancer and mechanisms of resistance to new agents targeting the androgen axis. *Oncogene*, 29;33(22):2815-25.
40. Luo, J. (2016 Jul-Aug). Development of AR-V7 as a putative treatment selection marker for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Asian Journal of Andrology*, 18(4):580-5.
41. Scher, H.I., Halabi, S., Tannock, I., Morris, M., Sternberg, C. N, and Hussain, M. (2008). Design and end pointsof clinical trials for patients with progressive prostate cancer and castrate levels of testosterone: recommendations of the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group. *Journal of Clinical Oncology*, 26: 1148–59.
42. Ryan, C. J., Smith, M. R., de Bono, J. S., Molina, A., Logothetis, C. J., and Rathkopf, D. E. (2013). Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy. *The New England Journal of Medicine*, 368: 138–48.
43. de Bono, J. S., Logothetis, C. J., Molina, A., Fizazi, K., North, S., and Scher, H. I. (2011). Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, 364: 1995–2005.
44. Beer, T. M., and Tombal, B. (2014). Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *The New England Journal of Medicine*, 371:1755–6.
45. Scher, H. I., Fizazi, K., Saad, F., Taplin, M. E., Sternberg, C. N., and de Bono, J. S. (2012). Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *The New England Journal of Medicine*, 367: 1187–97.
46. Nakazawa, M., Antonarakis, E. S., and Luo, J. (2014). Androgen receptor splice variants in the era of enzalutamide and abiraterone. *Hormones and Cancer*, 5: 265–73.
47. Ferraldeschi, R., Welti, J., Luo, J., Attard, G., and de Bono, J. S. (2014). Targeting the androgen receptor pathway in castration resistant prostate cancer: progresses and prospects. *Oncogene.*, 34: 1745–57.
48. Ware, K. E., Garcia Blanco, M. A. Armstrong, A. J., and Dehm, S. M. (2014). Biologic and clinical significance of androgen receptor variants in castration resistant prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 21: T87–103.
49. Lai, K. P., Huang, C. K., Chang, Y. J., Chung, C. Y., Yamashita, S., Li, L., Lee, S. O., Yeh, S., and Chang, C. (2013 Feb). New therapeutic approach to suppress castration-resistant prostate cancer using ASC-J9 via targeting androgen receptor in selective prostate cells. *The American Journal of Pathology*, 182(2):460-73.

50. Chandrasekar, T., Yang, J. C., Gao, A. C., and Evans, C. P. (2015 Jun). Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Translational Andrology and Urology*, 4(3):365-80.
51. Liu, L. L., Xie, N., Sun, S., Plymate, S., Mostaghel, E., and Dong, X. (2014 Jun). Mechanisms of the androgen receptor splicing in prostate cancer cells. *Oncogene*, 12;33(24):3140-50.
52. Karin, M. (2009). NF- κ B as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1:a000141.
53. Jost, P. J., and Ruland, J. (2007). Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood*, 109(7):2700-7.
54. Nadiminty, N., Lou, W., Sun, M., Chen, J., Yue, J., Kung, H. J., Evans, C. P., Zhou, Q., Gao, A. C. (2010). Aberrant activation of the androgen receptor by NF- κ B2/p52 in prostate cancer cells. *Cancer Research*, 70:3309–19.
55. Babaev, V. R., Ding, L., Zhang, Y., May, J. M., Lin, P. C., Fazio, S., and Linton, M. F. (2016 Apr). Macrophage IKK α Deficiency Suppresses Akt Phosphorylation, Reduces Cell Survival, and Decreases Early Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(4):598-607.
56. Ware, K. E, Garcia-Blanco, M. A., Armstrong, A. J., and Dehm, S. M. (2014 Aug). Biologic and clinical significance of androgen receptor variants in castration resistant prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 21(4):T87-T103.
57. Rocchi, P., So, A., Kojima, S., Signaevsky, M., Beraldi, E., Fazli, L., Hurtado-Coll, A., Yamanaka, K., and Gleave, M. (2004). Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Research*, 64:6595-6602.
58. Weiss, M., Burchardt, M., and Stope, M. B. (2014). Master of puppets in prostate cancer: heat shock protein 27 is pulling androgen receptor's strings. *Cancer Cell & Microenvironment*, 1: e287.
59. Albany, C. and Hahn, N. M. (2014). Heat shock and other apoptosis-related proteins as therapeutic targets in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology*, 16(3):359-63.
60. Shin, K. D., Yoon, Y. J., Kang, Y. R., Son, K. H., Kim, H. M., Kwon, B. M., and Han, D. C. (2008 Jan). KRIBB3, a novel microtubule inhibitor, induces mitotic arrest and apoptosis in human cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 15;75(2):383-94.
61. Nosareva, O. L., Ryazantseva, N. V., Stepovaya, E. A., Shakhristova, E. V., Stepanova, E. A., and Gulaya, V. S. (2016 Nov). The role of heat shock proteins 27 and 70 in redox-dependent regulation of apoptosis in Jurkat tumor cells. *Biomeditsinskaya Khimiya*, 62(6):670-673.

62. Amaral, T. M., Macedo, D., Fernandes, I., and Costa, L. (2012). Castration-resistant prostate cancer: mechanisms, targets, and treatment. *Prostate Cancer*, 2012:327253.
63. Attar, R. M., Takimoto, C. H., and Gottardis, M. M. (2009 May). Castration-resistant prostate cancer: locking up the molecular escape routes. *Clinical Cancer Research*, 15;15(10):3251-5.
64. Hu, R, Lu, C., Mostaghel, E. A., Yegnasubramanian, S., Gurel, M., Tannahill, C., Edwards, J., Isaacs, W. B., Nelson, P. S., Bluemn, E., Plymate, S. R., and Luo, J. (2012 Jul). Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Research*, 15;72(14):3457-62.
65. Farooqi, A. A., Sarkar, F. H. (2015 Feb). Overview on the complexity of androgen receptor-targeted therapy for prostate cancer. *Cancer Cell International*, 4;15:7.
66. Cao, B., Qi, Y., Zhang, G., Xu, D., Zhan, Y., Alvarez, X., Guo, Z., Fu, X., Plymate, S. R., Sartor, O., Zhang, H., and Dong, Y. (2014 Mar). Androgen receptor splice variants activating the full-length receptor in mediating resistance to androgen-directed therapy. *Oncotarget.*, 30;5(6):1646-56.
67. Tummala, R., and Nadiminty, N. (2015). Androgen Receptor Splice Variants in Prostate Cancer. *Journal of Cancer Prevention & Current Research*, 3(2): 00073.
68. Verzella, D., Fischietti, M., Capece, D., Vecchiotti, D., Del Vecchio, F., Ciciarelli, G., Mastroiaco, V., Tessitore, A., Alesse, E., and Zazzeroni, F. (2016). Targeting the NF- κ B pathway in prostate cancer: a promising therapeutic approach? *Current Drug Targets*, 17(3):311-20.
69. Stark, T., Livas, L., and Kyprianou, N. (2015 Aug). Inflammation in prostate cancer progression and therapeutic targeting. *The Translational Andrology and Urology*, 4(4):455-63.
70. Zhang, L., Altuwaijri, S., Deng, F., Chen, L., Lal, P., Bhanot, U. K., Korets, R., Wenske, S., Lilja, H. G., Chang, C., Scher, H. I., and Gerald, W. L. (2009 Aug). NF-kappaB regulates androgen receptor expression and prostate cancer growth. *The American Journal of Pathology*, 175(2):489-99.
71. Austin, D. C., Strand, D. W., Love, H. L., Franco, O. E., Jang, A., Grabowska, M. M., Miller, N. L., Hameed, O., Clark, P. E., Fowke, J. H., Matusik, R. J., Jin, R. J., Hayward, S. W. NF- κ B and androgen receptor variant expression correlate with human BPH progression. *Prostate*. 2016 Apr;76(5):491-511.
72. Ciocca, D. R., Fanelli, M. A., Cuello-Carrion, F. D., and Castro, G. N. (2010). Heat shock proteins in prostate cancer: from tumorigenesis to the clinic. *International Journal of Hyperthermia*, 26(8):737-47.

73. Zoubeidi, A., Zardan, A., Beraldi, E., Fazli, L., Sowery, R., Rennie, P., Nelson, C., and Gleave, M. (2007 Nov). Cooperative interactions between androgen receptor (AR) and heat-shock protein 27 facilitate AR transcriptional activity. *Cancer Research*, 1;67(21):10455-65.
74. Stope, M. B., Schubert, T., Staar, D., Rönna, C., Streitböcker, A., Kroeger, N., Kubisch, C., Zimmermann, U., Walther, R., and Burchardt, M. (2012 Jun). Effect of the heat shock protein HSP27 on androgen receptor expression and function in prostate cancer cells. *World Journal of Urology*, 30(3):327-31.
75. Katsogiannou, M., Andrieu, C., and Rocchi, P. (2014 Oct). Heat shock protein 27 phosphorylation state is associated with cancer progression. *Frontiers in Genetics*, 6;5:346.
76. Voll, E. A., Ogden, I. M., Pavese, J. M., Huang, X., Xu, L., Jovanovic, B. D., and Bergan, R.C. (2014 May). Heat shock protein 27 regulates human prostate cancer cell motility and metastatic progression. *Oncotarget*, 15;5(9):2648-63.
77. Ho, Y., and Dehm, S. M. (2017 Jun). Androgen Receptor Rearrangement and Splicing Variants in Resistance to Endocrine Therapies in Prostate Cancer. *Endocrinology*, 1;158(6):1533-1542.
78. Nunes, J. J., Pandey, S. K., Yadav, A., Goel, S., and Ateeq, B. (2017 Apr). Targeting NF-kappa B Signaling by Artesunate Restores Sensitivity of Castrate-Resistant Prostate Cancer Cells to Antiandrogens. *Neoplasia*, 19(4):333-345.
79. Gillis, J. L., Selth, L. A., Centenera, M. M., Townley, S. L., Sun, S., Plymate, S. R., Tilley, W. D., and Butler, L. M. (2013 May). Constitutively-active androgen receptor variants function independently of the HSP90 chaperone but do not confer resistance to HSP90 inhibitors. *Oncotarget*, 4(5):691-704.
80. Li, J., Fu, X., Cao, S., Li, J., Xing, S., Li, D., Dong, Y., Cardin, D., Park, H. W., Mauvais-Jarvis, F., and Zhang, H. (2018 Aug). Membrane-associated androgen receptor (AR) potentiates its transcriptional activities by activating heat shock protein 27 (HSP27). *Journal of Biological Chemistry*, 17;293(33):12719-12729.
81. Lee, S., Kim, J. N., Lee, H. K., Yoon, K. S., Shin, K. D., Kwon, B. M., and Han, D. C. (2011 Feb). Biological evaluation of KRIBB3 analogs as a microtubule polymerization inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1;21(3):977-9.
82. Kwan, E. M., Fettke, H., Docanto, M. M., To, S. Q., Bukczynska, P., and Azad, A. A. (2019 May). Prognostic Utility of a Whole-blood Androgen Receptor-based Gene Signature in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *European Urology Focus*, 15. pii: S2405-4569(19)30139-7.
83. Seitz, A. K., Thoene, S., Bietenbeck, A., Nawroth, R., Tauber, R., and Heck, M. M. (2017 Nov). AR-V7 in Peripheral Whole Blood of Patients with Castration-resistant Prostate Cancer: Association with Treatment-specific Outcome Under Abiraterone and Enzalutamide. *European Urology*, 72(5):828-834.

84. Todenhöfer, T., Azad, A., Stewart, C., Gao, J., Eigl, B. J., Gleave, M. E., Joshua, A. M., Black, P. C., and Chi, K. N. (2017 Jan). AR-V7 Transcripts in Whole Blood RNA of Patients with Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer Correlate with Response to Abiraterone Acetate. *The Journal of Urology*, 197(1):135-142.
85. Liu, X., Ledet, E., Li, D., Dotiwala, A., Steinberger, A., Feibus, A., Li, J., Qi, Y., Silberstein, J., Lee, B., Dong, Y., Sartor, O., and Zhang, H. (2016 Dec). A Whole Blood Assay for AR-V7 and ARv567es in Patients with Prostate Cancer. *The Journal of Urology*, 196(6):1758-1763.
86. To, S. Q., Kwan, E. M., Fettke, H. C., Mant, A., Docanto, M. M., and Azad, A. A. (2018 Jun). Expression of Androgen Receptor Splice Variant 7 or 9 in Whole Blood Does Not Predict Response to Androgen-Axis-targeting Agents in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *European Urology*, 73(6):818-821.
87. Takeuchi, T., Okuno, Y., Hattori-Kato, M., Zaitzu, M., and Mikami, K. (2016 Jan). Detection of AR-V7 mRNA in whole blood may not predict the effectiveness of novel endocrine drugs for castration-resistant prostate cancer. *Research and Reports in Urology*, 28;8:21-5.





EK-1. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kararları

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU GİRİŞİMSİZ OLMAYAN ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU									
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu							
	AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06580 Beşevler/Ankara							
	TELEFON	0312 202 69 58							
	FAKS	0312 202 46 73							
	E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr							
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Prostat Kanseri Hastalarında Androjen Receptörü ve İlişkili Sinyal Yollarının Araştırılması							
	KOORDİNATÖR/SÖRÜMLÜ ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ece KONAÇ							
	KOORDİNATÖR/SÖRÜMLÜ ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI/BULUNDUĞU MERKEZ	Tıbbi Biyoloji AD - G.Ü.T.F.							
	DESTEKLEYİCİ (Varı)								
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Kan, idrar, doku, myelomik grüvün gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyasyon koleksiyon materyalleriyle veya vücut mayene içtik tahlil ve tedavi işlemleri sırasında (inceden) elde edilmiş materyallerle yapılacak araştırmalar. Tanımlanmaya yönelik olarak genetik materyallerle yapılacak araştırmalar (Gen tıbbi) klinik araştırmaları ve farmogenetik çalışmalar dışında kalan) direkt ve araştırmaya yönelik							
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ	ÇOK MERKEZLİ	ULUSAL	ULUSLARARASI				
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarhi	Ver.No	Dil					
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	27.06.2018	1	Türkçe	İngilizce	Diger			
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	27.06.2018	1	Türkçe	İngilizce	Diger			
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı				Açıklama				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒							
	BIYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU	☐							
	DİĞER	☐							
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:	579			Toplantı tarihi: 10.09.2018				
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşımları ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve "bütçesi dışında" uygun bulunmuş olup, araştırma dosyasında belirtilen merkez/merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına, G.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir. Etik Kurulun kararı, projenin bütçesi BAP tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, BAP kararının Kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.								
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU									
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Olanların Klinik Araştırmaları Hakkında Yönerge, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu								
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Canan ULUOĞLU								
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Çinayet	Araştırma ile ilgili	Kararın	İmza			
Prof. Dr. Canan ULUOĞLU BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji A.D.	G.Ü.T.F.	☐	☒	☐	☒	☐	☐	
Prof. Dr. Burak DEMİREL BAŞKAN YARD	Adli Tıp AD	G.Ü.T.F.	☒	☐	☐	☒	☐	☐	Katılmadı

EK-1. (devam) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kararları

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU						
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU						
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu				
	AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara				
	TELEFON	0312 202 69 58				
	FAKS	0312 202 46 73				
	E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr				
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Prostat Kanseri Gelişiminde Dolaşım Halindeki Hücreleri				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/ SOYADI	Doç.Dr. Ece KONAÇ				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI/ BULUNDUĞU MERKEZ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D./ G.Ü.T.F.				
	DESTEKLEYİCİ (Varsa)					
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Kan, idrar, dokü, mikrobiyolojik gıda gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji kolleksiyon materyalleriyle veya ailede tıbbi tıbbi ve tedavi işlemleri sırasında (inciden) elde edilmiş materyallerle yapılacak araştırmalar- Doktora Tezi				
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐	
	DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Ver.No	Dili	
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ		19.01.2015	1	Türkçe ☒	İngilizce ☐ Diğer ☐	
AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU		19.01.2015	1	Türkçe ☒	İngilizce ☐ Diğer ☐	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ		☒			
	BIYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU		☐			
	DİĞER		☐			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 51	Toplantı tarihi: 26.01.2015				
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe anaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, araştırma dosyasında belirtilen merkez/merkezlere gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına, G.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.					
GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU						
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik (13.04.2013), 14 Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof.Dr.Canan ULUOĞLU				
Unvanı/Adı/Soyadı	Ünvanlı Alan	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma De-İşki	Karar *	İmza
Prof.Dr.Canan ULUOĞLU BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji A.D	G.Ü.T.F.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>C. Uluoğlu</i>
Prof.Dr. Arzu BAKIRTAŞ BAŞKAN YARD.	Ornak Sağlığı ve Hast.A.D	G.Ü.T.F.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>A. Bakırtaş</i>
Prof.Dr.Gökçe AKSİLİT RAPORTÖR	Fizyoloji A.D	G.Ü.T.F.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	Katılmıştır
Prof.Dr.Dilek BOYACI (YF)	Kardiyoloji A.D	G.Ü.T.F.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>D. Boyacı</i>
				Cetali OZEN		Fakülte Sekreteri

ÖZGEÇMİŞ**Kişisel Bilgiler**

Soyadı, adı : KILIÇCIOĞLU, İlker
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 12/08/1989, Ankara
Medeni hali : Bekâr
Telefon : 0 (537) 651 84 29
e-posta : ilkerkiliccioglu@gazi.edu.tr



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bil. Ens. Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.	Devam ediyor
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi Sağlık Bil. Ens. Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.	2014
Lisans	Ege Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü/ Moleküler Biyoloji Dalı	2011

İş Deneyimi
Yıl**Çalıştığı Yer****Görev**

2012- Halen

Gazi Üniversitesi

Araştırma Görevlisi

Yabancı Dili
İngilizce

YAYINLAR

ULUSLARARASI HAKEMLİ DERGİLERDE YAYIMLANAN MAKALELER

1. **Kiliccioglu I** , Konac E., Varol N., Gurocak S.ve Bilen C.Y., “Apoptotic Effects of Proteasome and Histon Deacetylase Inhibitors in Prostate Cancer Cell Lines”, *Genetics and Molecular Research*, 13(2), 3721-3731 (2014).
2. Konac E, Varol N, **Kiliccioglu I** ve C.Y. Bilen, “Synergistic effects of Cisplatin and proteasome inhibitor Bortezomib on human bladder cancer cells”, *Oncology Letters*, 10, 560-564 (2015).
3. Konac E., **Kiliccioglu I.** , Sogutdelen E., Ugras Dikmen A., Albayrak G. ve Bilen C. Y., “Do the expressions of epithelial-mesenchymal transition proteins, periostin, integrin- α 4 and fibronectin correlate with clinico-pathological features and prognosis of metastatic castration-resistant prostate cancer?”, *Exp Biol Med* (Maywood). 2017 Dec;242(18):1795-1801.
4. Dilci A., N. Varol, **I. Kiliccioglu**, E. Konac, U. Aydil, Y. Kızıl ve S.S. Uslu, “Expression Profiles of CD11b, Galectin-1, Beclin 1 and Caspase-3 in Nasal Polyposis”, *Turk J Med Sci*. 2017 Dec 19;47(6):1757-1764. doi: 10.3906/sag-1705-108.
5. **Kiliccioglu I**, Konac E, Dikmen AU, Sozen S, Bilen CY. “Hsp-27 and NF- κ B pathway is associated with AR/AR-V7 expression in prostate cancer cells.” *Gene*. 2019 May 20;697:138-143.

ULUSAL HAKEMLİ DERGİLERDE YAYIMLANAN MAKALELER

1. **Kiliccioglu I.**, E. Konac, G. Albayrak, Ç. Dönmez ve C.Y. Bilen, “Combination of Metformin and Dichloroacetate Inhibits Proliferation and Induce Intrinsic Pathway of Apoptosis in PC-3 Human Prostate Cancer Cells”, *Gazi Medical Journal*, 26 (4A), 212-214 (2015).

2. Kiliccioglu I., E. Konac, N. Varol ve C.Y. Bilen, “Proteasome and HDAC Inhibition Changes the Expression Levels of Bcl-2, Bcl-XL, Bim and Bik Proteins in Androgen-Independent PC-3 Cell Line”, *Gazi Medical Journal*, 26 (4), 155-157 (2015).

3. Kiliccioglu I, Konac E, Sozen S, “Genomic Evaluation of Testicular Germ Cell Tumors and its Role in Treatment Planning” *Bulletin of Urooncology* 2018;17:138-142.

ULUSAL BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE BİLDİRİ KİTAPLARINDA BASILAN BİLDİRİLER:

1. E Konaç, İ Kılıçcioğlu, E Söğütdelen, AUğraş Dikmen,G Albayrak, CY Bilen, “Epitelyal- mezenkimal geçiş proteinleri, periostin, integrin- α 4 ve fibronektin ifadeleri, mKDPK'nin klinik-patolojik özellikleri ve prognozu ile ilişkili midir? XV. *Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi*, 26-29 Ekim, Ölüdeniz-Fethiye, 2017.

2. Kılıçcioğlu İ., E. Konaç, G. Albayrak, Ç. Dönmez ve C.Y. Bilen, “Metformin ve Dikloroasetat Kombinasyonu İle PC-3 İnsan Prostat Kanseri Hücrelerinin Proliferasyonunun İnhibisyonu ve İçsel Apoptotik Yolağın Uyarımı”, *XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi*, 27-30 Ekim, Ölüdeniz-Fethiye, 2015.

3. Dilci A., N. Varol, İ. Kılıçcioğlu, E. Konaç, U. Aydil, Y. Kızıl ve S. Uslu, “Nazal polip dokusunda CD11b, Beclin-1, Galectin-1 ve Caspase-3 proteinlerinin mRNA ve protein düzeyindeki ifadenme profilleri”, *11. Türk Rinoloji Kongresi*, 16-19 Nisan, Antalya, 2015.

4. Kılıçcioğlu İ., E. Konaç, N. Varol, S. Gürocak ve C.Y. Bilen, “LNCAP ve PC3 Hücre Hatlarında Proteozom ve Histon Deasetilaz İnhibisyonunun NF κ B Yolağı Üzerine Etkisinin Araştırılması”, *2. Ulusal Ürolojik Cerrahi Kongresi*, 05-09 Kasım, Antalya, 2014.

5. Konaç E., N. Varol, İ. Kılıçcioğlu ve C.Y. Bilen, “Sisplatin ve Proteozom İnhibitörü Bortezomib'in İnsan Mesane Kanseri Hücrelerindeki Sinerjistik Etkisi”, *2. Ulusal Ürolojik Cerrahi Kongresi*, 05-09 Kasım, Antalya, 2014.

6. Kılıçcioğlu I., E. Konaç, N. Varol, S. Gürocak ve C.Y. Bilen, “Proteazom ve Histon Deasetilaz İnhibitörlerinin Prostat Kanseri Hücre Hattındaki Apoptotik Etkileri”, *XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, 27-30 Ekim, Kuşadası-Aydın, 2013.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

