

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**İLERİ EVRE PROSTAT KANSERİ HÜCRE
HATLARINDA *TRAIL*'A DİRENÇLİLİK
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU

Doktora Tezi

Antalya, 2005

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**İLERİ EVRE PROSTAT KANSERİ HÜCRE
HATLARINDA *TRAIL*'A DİRENÇLİLİK
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU

Doktora Tezi

Tez Danışmanları
Doç.Dr. Salih ŞANLIOĞLU
Dr. Bahri KARAÇAY

**Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından desteklenmiştir.
(Proje No: 2004.03.0122.003)**

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2005

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim dalında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır.

- 1) Adenovirus-mediated IKK β KA expression sensitized prostate carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis. **Ahter D. Sanlioglu**, I. Turker Koksall, Bahri Karacay, Mehmet Baykara, Guven Luleci, Salih Sanlioglu. *Cancer Gene Therapy* dergisinde basım aşamasında.
- 2) Surface TRAIL decoy receptor-4 expression is correlated with TRAIL resistance in MCF7 breast cancer cells. **Ahter D. Sanlioglu**, Ercument Dirice, Cigdem Aydin, Nuray Erin, Sadi Koksoy, Salih Sanlioglu. *BMC Cancer* Vol 5(1):54, 2005.
- 3) Current progress in adenovirus mediated gene therapy for patients with prostate carcinoma. **Ahter D. Sanlioglu**, Turker Koksall, Mehmet Baykara, Guven Luleci, Bahri Karacay, Salih Sanlioglu. *Gene Ther Mol Biol* Vol 7, 113-133, 2003.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Programında doktora (PhD) tezi olarak kabul edilmiştir. 20 / 06 / 2005

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Salih ŞANLIOĞLU

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Güven LÜLECİ

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Engin YILMAZ

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. İbrahim KESER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Türker KÖKSAL

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Üroloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun / / 2005 tarih ve / sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Ramazan DEMİR
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Adenoviral yolla aktarılan TRAIL aracılı gen tedavi yaklaşımları, ileri evre prostat kanserlerinde apoptozisi indükleyici güçlü potansiyel terapötik yaklaşımlar olarak değerlendirilmektedir. Ancak bazı prostat kanser hücrelerinin TRAIL aracılı apoptozise dirençli olduğunun gözlenmesi nedeniyle, TRAIL dirençlilik mekanizmalarının araştırılması ve bu dirençliliği kıracak yeni yaklaşımların geliştirilmesi, TRAIL'ın ileride etkili bir tedavi yaklaşımı olarak kliniğe kazandırılması açısından oldukça önemlidir.

Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda üç farklı ileri evre prostat kanser hücre hattında (DU145, PC3, LNCaP) TRAIL'a dirençlilikten sorumlu olabilecek mekanizmalardan olan hücre içi bazal ve TRAIL aracılığıyla indüklenen NF- κ B aktivitesinin, ve TRAIL ölüm ve yalancı reseptör sentez oranlarının hücrelerde TRAIL duyarlılığı ile ilişkisi araştırıldı. Bunun yanında, prostat kanserlerinde ilk kez denenen Ad5hTRAIL ve AdIKK β KA ikili vektör sisteminin hücrelerde gözlenen TRAIL dirençliliğini kırmadaki etkinliği araştırıldı.

Sonuçlarımız, TRAIL yalancı reseptör kompozisyonunun ve hücre içi NF- κ B aktivitesinin prostat kanser hücrelerinde TRAIL dirençliliğine katkıda bulunan iki önemli faktör olduğunu göstermiştir. Bunun yanında, IKK β KA aracılı IKK inhibe edici stratejilerin, hücrelerde TRAIL dirençliliğini kırmada, dirençlilik mekanizmasına bağımlı olmaksızın etkili olduğu görülmüştür. Araştırmamız, prostat kanser hücrelerinde TRAIL yalancı reseptörlerinin sentez seviyesi ile TRAIL dirençliliği arasında anlamlı bir ilişki açığa çıkarmıştır. Bulgularımız, Ad5hTRAIL ve AdIKK β KA ikili vektör sistemi ile prostat kanser hücrelerinde TRAIL dirençliliğinin kırılabilceğini gösteren ilk çalışma olması açısından da önemlidir. Bu bulgular ışığında, IKK inhibisyonu altında adenoviral yolla TRAIL gen aktarımı, ileri evre prostat kanserinde TRAIL'ın terapötik indeksini genişletmede değerli bir yaklaşım olacaktır.

Anahtar Kelimeler: TRAIL, prostat kanseri, gen tedavisi, NF- κ B, adenoviral vektörler.

ABSTRACT

Adenovirus-mediated gene therapy approaches using TRAIL arose as powerful potential therapy modalities in advanced prostate carcinoma. However, as TRAIL resistance was reported in some prostate cancer cells, investigation of resistance mechanisms to TRAIL in advanced prostate carcinoma cells and development of new therapeutic approaches are crucial for TRAIL to be used efficiently in clinical settings in the future.

For this reason, unstimulated and TRAIL-induced NF- κ B activities and TRAIL death and decoy receptor patterns were investigated as possible resistance mechanisms to TRAIL in three different advanced prostate carcinoma cell lines (DU145, PC3, LNCaP). Furthermore, efficiency of a dual vector approach including Ad5hTRAIL and AdIKK β KA in breaking down the TRAIL resistance in cells was investigated.

Our results revealed that TRAIL decoy receptor composition and intracellular NF- κ B activity are two important factors leading to TRAIL resistance in advanced prostate cancer cells. Furthermore, IKK β KA-mediated IKK inhibiting strategies were efficient in breaking down the resistance to TRAIL in cells independent of the resistance mechanisms. Our investigation has shown a significant correlation between decoy receptor expression levels and TRAIL resistance in advanced prostate cancer cells. Furthermore, this is the first study showing that a dual vector strategy with Ad5hTRAIL and AdIKK β KA is efficient in eliminating TRAIL resistance in advanced prostate cancer cells. Consequently, this dual vector approach appears to be a novel potential treatment modality to increase the therapeutic index of TRAIL in advanced prostate cancers.

Key Words: TRAIL, prostate cancer, gene therapy, NF- κ B, adenoviral vectors.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca yol göstericiliği ve desteği için, ve tez çalışmamda üniversitemiz Tıp Fakültesi Hastanesi'nde kurmuş olduğu Gen Tedavi Ünitesi'nin imkanlarından yararlanmamı sağladığı için sayın danışman hocam Doç.Dr. Salih ŞANLIOĞLU'na,

Çalışmada ikinci danışmanım olarak görev aldığı süre boyunca verdiği destek ve tezime katkıları için sayın Dr. Bahri KARAÇAY'a,

Tez çalışmama önerileri ile katkıda bulunan ve destek ve ilgisini esirgemeyen sayın hocam Prof.Dr. Güven LÜLECİ'ye,

Tez çalışmamın klinik bilgi gerektiren konularında danışmanlığı ve her zaman yakın ilgisi ve desteği için sayın Doç.Dr. Türker KÖKSAL'a,

Tez savunma sınavımda jüri üyeliği yapan sayın hocalarım Prof. Dr. Engin YILMAZ'a ve Doç. Dr. İbrahim KESER'e, ve yedek jüri üyeleri olan sayın hocalarım Prof. Dr. Uğur ÖZBEK ve Doç.Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM'e,

Doktora tez çalışmam ile ilgili resmi işlemleri yürüten Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Çalışmam süresince destekleri ve yardımları için Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Gen Tedavi Ünitesi elemanlarına ve Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı ekibine,

Yoğun çalışma gerektiren doktora sürecinde inançları ve göstermiş oldukları sabır ve destek için sevgili eşime ve tüm aileme içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
 GENEL BİLGİLER	 2
2.1. Prostat Bezinin Yapısı	2
2.2. Prostat Kanserinin Tanımı ve Sınıflandırılması	3
2.3. Prostat Kanserinin Epidemiyolojisi	6
2.3.1 Yaş	6
2.3.2. Coğrafya ve Çevresel Faktörler	6
2.3.3. Ailesel Yatkınlık	6
2.3.4. Steroid Hormonların Rolü	7
2.4. Prostat Kanserinde Tanı Yöntemleri	7
2.5. Prostat Kanserinin Gelişiminde Moleküler Mekanizmalar	8
2.5.1. Prostat Kanserinin Erken Evreleri	8
2.5.2. Prostat Kanserinin Progresyonu	9
2.5.3. Metastatik Hastalığa Geçiş	10
2.6. Prostat Kanserinin Tedavisinde Kullanılan Mevcut Yaklaşımlar	11
2.7. Prostat Kanserinde Gen Tedavisi	11
2.7.1. Adenoviral Vektörler	12
2.7.2. Kanser Gen Tedavisinde Ölüm Ligantlarının Kullanımı	15
 MATERYAL ve METODLAR	 23
3.1. Hücre Kültürü	23
3.2. Rekombinant Adenoviral Vektörlerin Üretimi	24
3.2.1. İnsan 293 Hücrelerinin Enfeksiyonu	24
3.2.2. Adenovirüs Pürifikasyonu	24
3.3. Prostat Kanseri Hücrelerinin Rekombinant Adenoviral Vektörler ile Transdüksiyonu	25
3.4. NF-kB Transkripsiyon Aktivasyon Deneyleri	26
3.5. Hücre Canlılık Oranlarının Belirlenmesi	35
3.6. İnsan TRAIL Reseptörleri için Kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR	27
3.6.1. Total RNA İzolasyonu	27
3.6.2. cDNA Eldesi	27
3.6.3. TaqMan PCR Reaksiyonu	28

3.7. Anneksin V Boyama	29
3.8. Akış Sitometrisi	30
3.9. İstatistiksel Analiz	30
BULGULAR	31
4.1. Prostat Hücrelerinde Bazal NF-kB Aktivasyon Seviyeleri Farklı Bulundu.	31
4.2. Prostat Kanseri Hücreleri, Adenoviral Vektörler Tarafından Eşit Olarak Transdüksiyona Uğratıldı.	31
4.3. Prostat Kanseri Hücreleri Değişken Derecede Adenovirüs Aracılı TRAIL Sitotoksitesisi Gösterdi.	32
4.4. Prostat Kanseri Hücrelerinde Hücre içi NF-kB Aktivitesi, hTRAIL Sentezi ile Artarken, IKK β KA Sentezi ile Azaldı.	32
4.5. IKK β KA Sentezi Yoluyla Fonksiyonel IKK İnhibisyonu, Prostat Kanseri Hücrelerini TRAIL Aracılı Hücre Ölümüne Karşı Duyarlı Hale Getirdi.	32
4.6. Prostat Kanseri Hücrelerinin Yalnızca AdIKK β KA Vektörleri ile Enfeksiyonu Hücre Ölümüne Yol Açmadı.	33
4.7. Ad5hTRAIL ve AdIKK β KA'nın Birlikte Enfeksiyonu Sonucu, Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Apoptotik Ölüm Gerçekleşti.	33
4.8. Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Birbirinden Farklı TRAIL Reseptör Kompozisyonları Belirlendi.	34
TARTIŞMA ve SONUÇLAR	48
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	66

EKLER

Ek-1. Adenovirus-mediated IKK β KA expression sensitized prostate carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis. **Ahter D. Sanlioglu**, I. Turker Koksall, Bahri Karacay, Mehmet Baykara, Guven Luleci, Salih Sanlioglu. *Cancer Gene Therapy* dergisinde basım aşamasında.

Ek-2. Surface TRAIL decoy receptor-4 expression is correlated with TRAIL resistance in MCF7 breast cancer cells. **Ahter D. Sanlioglu**, Ercument Dirice, Cigdem Aydin, Nuray Erin, Sadi Koksoy, Salih Sanlioglu. *BMC Cancer*, Vol 5(1):54, 2005.

Ek-3. Current progress in adenovirus mediated gene therapy for patients with prostate carcinoma. **Ahter D. Sanlioglu**, Turker Koksall, Mehmet Baykara, Guven Luleci, Bahri Karacay, Salih Sanlioglu. *Gene Ther Mol Biol*, Vol 7, 113-133, 2003.

ŞİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AAH	: Atipik Adenomatöz Hiperplazi
AMACR	: Alpha-Methylacyl-GA Racemase
AR	: Androjen Reseptörü
BPH	: Benign Prostatik Hiperplazi
CAPB	: Cancer of Prostate and Brain
CAR	: Cocksackie Adenovirus Receptor
c-FLIP	: Cellular FLICE-Inhibitory Protein
CGH	: Comparative Genomic Hybridization
CMV	: Cytomegalovirus
EGF	: Epidermal Growth Factor
EGFP	: Enhanced Green Fluorescent Protein
ELAC2	: elaC homolog 2 (E.coli)
ETV6	: ETS (Erythroblastosis) Variant 6
FGF	: Fibroblast-derived Growth Factor
FBS	: Fötal Bovine Serum
FISH	: Fluorescent In Situ Hybridization
IAP	: Inhibitors of Apoptosis Protein
IFN-γ	: Interferon-gamma
IGF	: Insulin-like Growth Factor
IKK	: IkB α Kinase
İEPCa	: İleri Evre Prostat Kanseri

HCP1	: High-Affinity cAMP-specific Phosphodiesterase Gene
HKLK3	: Human Glandular Kallikrein 3
NF-kB	: Nuclear Factor-kB
OSPCa	: Organa Sınırlı Prostat Kanseri
PACP	: Prostatic Acid Phosphatase
PIN	: Prostatik Intraepitel Neoplazi
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
PSMA	: Prostat Spesifik Membran Antijeni
PTEN	: Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome Ten
Rb	: Retinoblastoma
RNASEL	: Ribonuclease L
RT-PCR	: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SCID	: Severe Combined Immuno Deficiency
TİB	: Transrektal İğne Biyopsisi
TNF	: Tumor Necrosis Factor
TRAIL	: TNF-Induced Apoptosis Inducing Ligand
TRUS	: Transrektal Ultrason

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. İnsan prostat bezinin şematik gösterimi (sagital kesit).	2
2.2. İnsan prostat bezini oluşturan hücre tiplerinin şematik olarak gösterilmesi.	3
2.3. Prostat kanserinin prostat bezinde yerleşiminin şematik olarak gösterilmesi.	4
2.4. Gleason derecelendirme sistemi.	4
2.5. TNM evrelendirme sistemine göre lokal prostat tümör büyümesinin dört farklı evresi.	5
2.6. İnsan prostat dokusunun histolojik incelemesi.	6
2.7. İnsanda prostat kanseri gelişim basamakları.	8
2.8. Gen tedavisi klinik denemelerinde kullanılan vektörler ve yüzdeleri.	12
2.9. Adenovirüsler.	12
2.10. Adenovirüslerin hayat döngüsü.	14
2.11. Adenoviral DNA'nın yapısı.	14
2.12. TRAIL reseptörlerinin şematik gösterimi.	16
2.13. TRAIL tarafından indüklenen iç ve dış apoptotik yollar.	17
2.14. Prostat kanser hücrelerinde NF-kB sinyal yolunun bloke edilmesi yoluyla TRAIL'a dirençliliği kırmak için geliştirilmiş bir gen tedavi stratejisi.	20
2.15. NF-kB aktivasyon ve inhibisyon yolları.	21
4.1. Prostat kanser hücre hatlarında endojen NF-kB seviyeleri.	35
4.2. Prostat karsinoma hücrelerinin birinci jenerasyon rekombinant adenoviral vektörler ile transdüksiyonu.	36

4.3. Prostat kanser hücrelerinin adenoviral vektörlerle transdüksiyon etkinliklerinin akış sitometri ile değerlendirmesi.	37
4.4. Prostat kanser hücrelerinin TRAIL duyarlılık seviyeleri.	38
4.5. Hücre canlılık deneylerinin kantitatif sonuçları.	39
4.6. Prostat kanser hücrelerinde hTRAIL ve IKKβKA sentezinin NF-kB aktivasyonu üzerine etkisi.	40
4.7. Adenoviral vektörler yoluyla IKKβKA sentezinin, prostat kanser hücre hatlarında TRAIL dirençliliği üzerine etkisi.	41
4.8. IKKβKA sentezinin TRAIL dirençliliği üzerine etkisinin kantitatif olarak değerlendirilmesi.	42
4.9. Tek başına AdIKKβKA enfeksiyonunun prostat kanser hücreleri üzerindeki etkisi.	43
4.10. DU145 prostat kanser hücre hattında TRAIL ve IKKβKA aracılı apoptozisin gösterilmesi.	44
4.11. Prostat karsinoma hücre hatlarında TRAIL reseptör mRNA düzeyleri.	45
4.12. DU145 ve PC3 hücre yüzeylerinde TRAIL reseptörlerinin sentez seviyeleri.	46
4.13. LNCaP hücre hattında TRAIL reseptörlerinin hücre yüzeyindeki sentez seviyeleri.	47

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Prostat kanseri (PCa) gelişimi ile ilgili başlıca yatkınlık genleri.	7
3.1. Çalışmada kullanılan prostat kanser hücrelerinin özellikleri.	23
3.2. Çalışmada kullanılan adenoviral vektörlerin özellikleri.	25

GİRİŞ VE AMAÇ

İleri evre prostat kanserinin tedavisinde kullanılan geleneksel tedavi metodlarından olan kemoterapi, etkinliğini p53 tümör baskılayıcı protein aracılığıyla gerçekleştirir. Ancak ileri evre prostat kanserlerinin önemli bir bölümünde p53 geninde mutasyonlar olduğu bilinmektedir. TNF ailesi üyesi ölüm ligantlarının (TNF- α , FasL, vb.) ise, apoptozisi p53 bağımsız yollarla indükleyebildikleri bildirilmiştir. Bu nedenle, bu ligantların ileri evre prostat kanserinin tedavisinde kullanımları gündeme gelmiştir. Ölüm ligantları aracılığıyla prostat kanser hücrelerinde apoptozisin indüklenmesini amaçlayan başarılı çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, ciddi yan etkilerle karşılaşılması, bu moleküllerin sistemik kullanımlarını sınırlayan önemli bir faktör olmuştur. Bir başka TNF ailesi üyesi olan TRAIL'ın ise, diğerlerinden farklı olarak tümör hücrelerinde apoptozisi indüklerken normal hücrelerde apoptotik etki göstermediği bildirilmiştir. Bu nedenle, TRAIL'ın sistemik kullanımının güvenli olacağı düşünülmüş, ve bu yaklaşımın güvenli olduğu birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. TRAIL ile ilgili tüm bu umut verici gelişmelere rağmen, bazı prostat kanser hücrelerinin TRAIL'a dirençli olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, henüz tam olarak bilinmeyen TRAIL dirençlilik mekanizmalarının açığa kavuşturulması ve dirençliliği kıracak yeni tedavi metodlarının geliştirilmesi, TRAIL'ın prostat gen tedavisine kazandırılabilmesi açısından kritik öneme sahiptir.

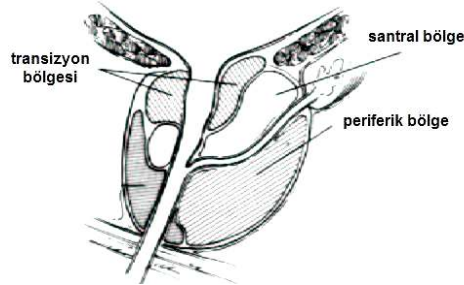
İleri evre prostat kanserinin, hastalığın tedavide en çok zorlanılan aşaması olması nedeniyle, bu çalışmada ileri evre prostat kanser hücre hatları (DU145, PC3, LNCaP) kullanıldı. TRAIL'a dirençli hücre hatlarında, dirençliliğe sebep olabilecek mekanizmalar olan bazal ve TRAIL aracılığıyla indüklenen NF-kB aktivasyon seviyesinin, ve TRAIL ölüm ve yalancı reseptör sentez oranlarının hücrelerde TRAIL duyarlılığı ile ilişkisinin açığa çıkarılması amaçlandı. Bunun yanında, prostat kanserlerinde ilk kez denenen bir ikili vektör (Ad5hTRAIL ve AdIKK β KA) sisteminin, hücrelerde gözlenen TRAIL dirençliliğini kırmadaki etkinliğinin araştırılması hedeflendi.

GENEL BİLGİLER

Prostat kanseri, prostat bezinde çoğunlukla adenokarsinoma olarak ortaya çıkan, heterojen ve genellikle çok odaklı olarak seyreden bir hastalıktır [1]. Batılı ülkelerde erkekler arasında en yaygın kanserdir, ve erkeklerde kanser sebebiyle ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır [2]. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl ortalama 200,000 kişiye prostat kanseri tanısı konmaktadır [3, 4]. Prostat spesifik antijen (PSA) taramaları, dijital rektal muayene, ve lokalize prostat kanserinin erken tedavisi gibi metodlarla son yıllarda prostat kanserinden ölüm oranlarında azalma sağlanmıştır [4]. Ancak tüm çabalara rağmen, bugün yetişkin bir erkek bireyin yaşamı süresince prostat kanserine yakalanma riskinin 5'te 1 olduğu, bu vakalar arasında metastatik prostat kanseri nedeniyle ölüm riskinin ise 30'da 1 olduğu bildirilmiştir [5]. Bu bulgular ışığında, özellikle ileri evre prostat kanserinde hastaların yaşam sürelerini uzatabilmek için mevcut tedavi yöntemlerini tamamlayıcı yeni tedavi stratejileri geliştirilmesi gerekmektedir.

2.1. Prostat Bezinin Yapısı

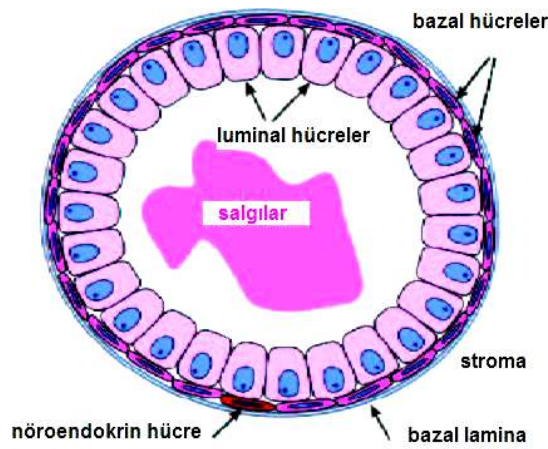
İnsanda prostat bezi, mesanenin hemen altında yer alır. Prostat bezinin orta kısmından, idrar boşaltımında rol alan üretra geçer. Prostata oluşturan hücrelerin yaptığı salgı, seminal sıvının bir bölümünü oluşturur. McNeal, insan prostata içinde beş farklı morfolojik bölge tanımlamıştır: periferik bölge, transizyon bölgesi, santral bölge, preprostatik sfinkter ve anterior fibromusküler stroma [6, 7]. Şekil 2.1'de, bahsedilen farklı bölgelerden üçü gösterilmiştir.



Şekil 2.1. İnsan prostat bezinin şematik gösterimi (sagittal kesit) [8].

Prostat epiteli içinde, morfolojik özellikleri, fonksiyonel durumları ve karsinogenezele ilişkileri açısından en az üç farklı hücre tipi ayırt edilebilir (Şekil 2.2). En yaygın olarak bulunan hücre tipleri, salgı yapan luminal hücrelerdir. Bu hücre tipleri androjen bağımlıdır ve prostatik salgı maddelerini üretir. Moleküler seviyede, luminal hücreler androjen reseptör sentezi, sitokeratin 8 ve 18, ve hücre yüzey belirteçi CD57 ile tanımlanabilir [9-13]. İkinci önemli epitelyal hücre tipi, bazal hücrelerdir. Bu hücreler, luminal hücreler ile bazal membran arasında bulunur,

ve prostat dokusunda luminal hücreleri çevreleyen bir katman oluşturur. Bazal hücreler, sitokeratin 5 ve 14, CD44, ve düşük seviyede androjen salgılar, ancak prostatik salgı proteinlerini üretmezler [9-14]. Bazal hücrelerin aynı zamanda, potansiyel kök hücreler olabilecekleri düşünülmektedir. Bu hücreler, muhtemel kök hücre profiline uygun olarak, DNA hasarına karşı koruyucu moleküller sentezler. Bu moleküllere örnek olarak anti-apoptotik Bcl2 proteini verilebilir [14, 15]. Üçüncü prostatik epitelyal hücre tipi ise, embriyonik kökeni tam olarak bilinmeyen nöroendokrin hücrelerdir. Bu hücrelerin, luminal hücrelerin büyümesini sağlayan parakrin sinyaller ürettikleri düşünülmektedir [16, 17]. Nöroendokrin hücreler, androjen bağımsız hücrelerdir. Bazal katmanda dağınık olarak bulunurlar ve kromogranin A, serotonin, ve çeşitli nöropeptitler sentezlerler [8].

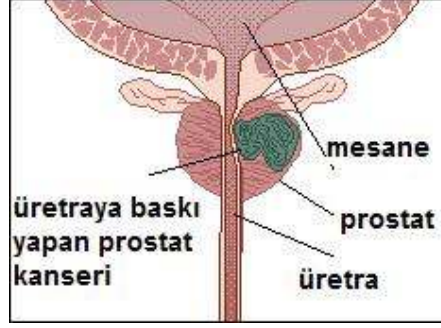


Şekil 2.2. İnsan prostat bezini oluşturan hücre tiplerinin şematik olarak gösterilmesi [8].

Prostat dokusunda tanımlanan farklı hücre tiplerinin köken ilişkilerinin bilinmesi, prostat kanserinin oluşum mekanizmasının açığa çıkarılması açısından önemlidir. Prostat kanser hücreleri genellikle bazal hücrelere spesifik moleküller sentezler. Ancak prostat kanserinde bazal hücre katmanı kaybedilir [18, 19]. Ayrıca, Prostat Spesifik Antijen (PSA) sadece luminal hücreler tarafından salgılandığından, kanser hücreleri en azından kısmen luminal fenotipe sahiptir. Bu duruma muhtemel bir açıklama olarak, neoplastik transformasyonda, luminal hücrelerin bazal hücre fenotipine benzeyen daha az farklılaşmış bir hücre tipine dönüştüğü ileri sürülmüştür [8].

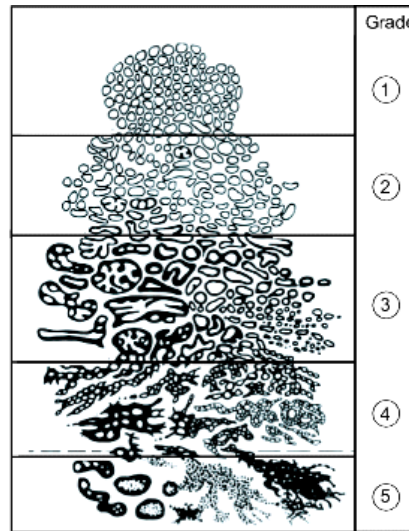
2.2. Prostat Kanserinin Tanımı ve Sınıflandırılması

Prostat kanseri, tümörün baskısı sonucu sık idrara çıkma, hematüri, hematospermi ya da postejakülasyon ağrı gibi semptomlarla ortaya çıkan bir kanserdir (Şekil 2.3). İleri evrede lenf nodlarına, kemiğe ya da diğer organlara metastazı tipiktir.



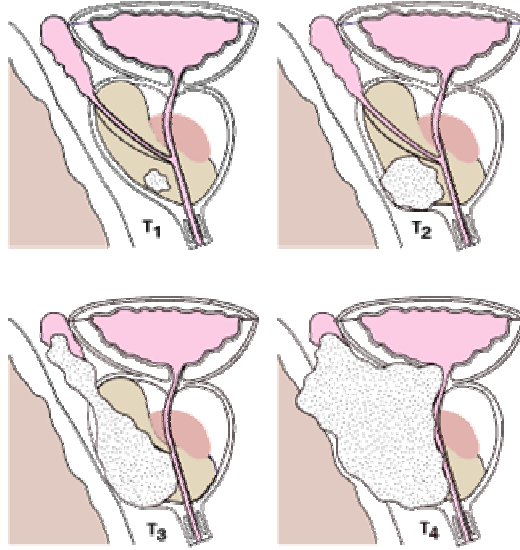
Şekil 2.3. Prostat kanserinin prostat bezinde yerleşiminin şematik olarak gösterilmesi

Prostat tümörleri çoğunlukla adenokarsinomlardır. Prostat adenokarsinoma, prostat bezinin epitel hatlarından köken alır. Radikal prostatektomi örneklerinin incelenmesi, olguların %85'inde çok merkezli gelişim olduğunu göstermiştir. Prostat kanseri oldukça heterojen bir kanserdir. Prostat kanser dokusunun histolojik incelemesi sonucunda, aynı alanda benign bezler, preneoplastik odaklar (PIN), ve farklı derecelerde neoplastik odaklar birarada görülebilir (Şekil 2.6). Bu heterojenite ile ilgili olarak, Gleason bugün iyi bir prognostik indikatör olarak kabul görmüş olan bir derecelendirme sistemi geliştirmiştir [20]. Bu sistemde glandüler yapı değerlendirilir. Gleason dereceleri 1 ile 5 arasında değişmekte olup, en sık görülen derece ile ikinci sıklıkta görülen derecenin toplamı Gleason skor'unu oluşturur (Şekil 2.4). Gleason skor 2 ile 10 arasında değişmektedir. Birinci derece tümörler normale yakın bir özellik gösterirken, 5. derecede herhangi bir glandüler yapı görülmemektedir. Küçük ve iyi diferansiye tümörler (1. ve 2. derece) genelde organa sınırlı iken, büyük (4 cm³'ten büyük) ve kötü diferansiye tümörler (4. ve 5. derece) genellikle lokal ileri evre ya da metastatiktirler. Gleason skor 2-4 iyi diferansiye tümör, Gleason skor 5-7 orta derecede diferansiye tümör, Gleason skor 8-10 ise kötü diferansiye tümörü temsil eder [21].



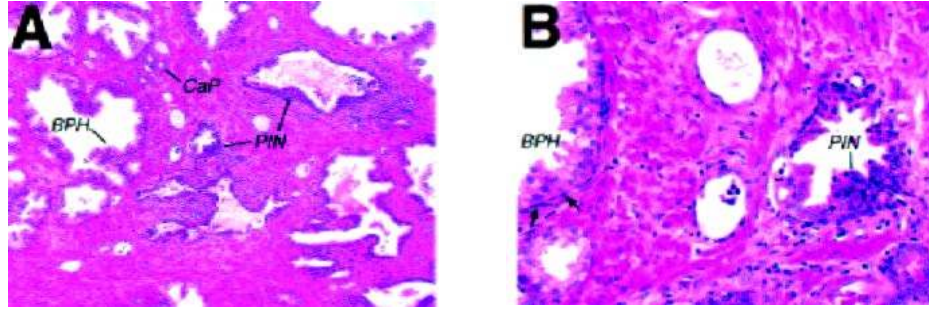
Şekil 2.4. Gleason derecelendirme sistemi [22]

Prostat kanserinin evrelendirilmesinde, Tumor, Nod, Metastaz (TNM) sistemi de sıklıkla kullanılmaktadır. Bu sistemde, lokal tümör büyümesi, T1 ile T4 arasında dört evrede tanımlanır. T1 evresinde tümör dijital rektal muayene veya ultrasonla tespit edilemez, ancak transüretral rezeksiyon veya PSA testi sonrası biyopsi ile tanımlanabilir. T4, tümörün komşu organları tuttuğu ileri evresini temsil eder. Nodal evreler (N0-N1) ve metastatik evreler (M0-M1C), hastalığın sırasıyla lenf nodlarına ve uzak bölgelere klinik yayılımını (metastaz) tanımlar [22].



Şekil 2.5. TNM evrelendirme sistemine göre lokal prostat tümör büyümesinin dört farklı evresi. Noktalı olarak gösterilen kısımlar, tümör dokusunu temsil etmektedir [22].

Prostat kanseri, genel anlamda Organa Sınırlı Prostat Kanseri (OSPCa) ve İleri Evre Prostat Kanseri (İEPCa) olarak sınıflandırılabilir. Prostat kanseri, genellikle periferik bölgede oluşur. İEPCa ise çoğunlukla kemiğe ve lenf noduna olmak üzere metastazla sonuçlanır. Bunun yanında erkeklerde, yaş ilerledikçe sıklığı artan, prostat bezinde büyüme ile karakterize olan iyi huylu bir hastalık olarak ifade edilen Benign Prostatik Hiperplazi (BPH) gelişebilir. BPH genellikle transizyon bölgesinde ortaya çıkar. Bazal katmanın genişlemesi ve stromal hiperproliferasyon ile tipiktir [8].



Şekil 2.6. İnsan prostat dokusunun histolojik incelemesi. A ve B panellerindeki görüntüler hematoxilen-eozin boyama ile elde edilmiştir. (A) Fotoğrafta prostat dokusunun heterojenitesi, aynı alanda bulunan Benign Prostat Hiperplazi (BPH), Prostatik İntraepitel Neoplazi (PIN), ve iyi diferansiye adenokarsinoma (CaP) ile görülebilmektedir. (B) Panel A'dan bir bölgenin mikroskop altında yüksek büyütmede görüntüsü verilmiştir.

2.3. Prostat Kanserin Epidemiyolojisi

2.3.1. Yaş

Prostat kanserinin gelişiminde, yaş çok önemli bir faktördür. Yaşa bağlı olarak prostat kanseri nedeniyle ölüm oranı artar. Erkeklerde 65 ila 70 yaşlarında 100.000'de 358 olan prostat kanseri insidansı, 80 yaş ve üzerinde 100.000'de 1035'e çıkar. Her iki grupta ölüm oranları ise sırasıyla %21.2 ve %40 olarak bildirilmiştir [21].

2.3.2. Coğrafya ve Çevresel Faktörler

Prostat kanseri insidansının coğrafik dağılımı oldukça heterojendir. Örneğin Tayland'ta prostat kanserinden ölüm oranı 100.000'de 0.1 iken, Batı Hindistan'ın bazı bölgelerinde 100.000'de 30'dur. Hastalığın genel insidansı da oldukça çeşitlilik gösterir. Prostat kanserinin görülme sıklığı Çin'de 100.000'de 0.8 iken, Kuzey Amerika'da yaşayan zenci popülasyonda 100.000'de 100'dür. Dünya genelinde gözlenen bu farklılıkların açıklamasında, çevresel faktörlerin ırksal faktörlerden tam olarak ayırt edilemeyeceği açıktır, ancak göç eden toplumlar üzerine yapılan çalışmalar, çevresel faktörlerin ırksal orijinlerden daha önemli olduğunu ortaya koymuştur [21]. Örneğin Asya kökenli ülkelerde prostat kanseri insidansı çok düşükken, Amerika Birleşik Devletleri'nde prostat kanseri insidansı bu ülkelere göre önemli oranda yüksektir. Amerika Birleşik Devletleri'nin Asya kökenli ülkelere göre yüksek oranda göç aldığı bilinmektedir. Bu nedenle, diyet ve çevresel faktörlerin, diğer epitel kanserlerde olduğu gibi, prostat karsinogenezinde de anahtar rol oynadığı kabul edilmektedir [8].

2.3.3. Ailesel Yatkınlık

Kalıtsal faktörler, prostat kanserlerinin oldukça küçük bir yüzdesinden (%10) sorumlu tutulmakta ve erken yaşta ortaya çıkan prostat kanseri ile ilişkilendirilmektedir. Ancak pozitif aile hikayesi, prostat kanseri için en güçlü epidemiyolojik risk faktörleri arasında sayılmaktadır. Birçok kromozomal bölgenin prostat kanserine yatkınlıkta rol aldığı düşünülmektedir [8]. Prostat kanserine

yatkınlığın poligenik mekanizmalar içerdığı, ve Mendelian kalıtımın farklı modelleri, eksik penetrans ve etnik varyasyonlar aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Linkaj analizi yoluyla, 1, 10, ve 17 no.lu kromozomlarda ve X kromozomunda birçok lokus prostat kanserinde ailesel yatkınlık ile ilişkilendirilmiştir. Özellikle 1 no.lu kromozom üzerinde çalışılmıştır. Bu kromozomun muhtemel prostat kanseri yatkınlık genlerini barındırabilecek en az 3 alt bölge (HCP1, PACP, ve CAPB) içerdği ileri sürülmüştür [23]. Tablo 2.1’de prostat kanserine yatkınlık genleri olarak tanımlanan genlerin listesi verilmiştir.

Tablo 2.1. Prostat kanseri (PCa) gelişimi ile ilgili başlıca yatkınlık genleri

Gen ismi	Yatkınlık ile ilgili özellikleri
Andojen Reseptörü (AR)	CAG tekrarlarının PCa’ne yatkınlık ile ilgili olduğu düşünülmektedir
MSR1 (Makrofaj Süpürücü Reseptör)	Yedi önemli gen mutasyonu bulunmuştur
ELAC2	Mutasyon taşıyıcılarında PCa geliştirme riski yüksektir
BRCA2	PCa’nin erken evrelerinde rol aldığı düşünülmektedir
RNASEL (ribonükleaz L’yi kodlayan gen)	Mutant allel açısından heterozigot erkeklerde PCa geliştirme riski %50 artar
ETV6 (tümör supresör gen)	Mutasyonel inaktivasyon PCa ile sonuçlanabilir
AMACR/P504S (alfa metil-CoA Racemase)	Tanımlanan onyedinci dizi varyantı, PCa’ne yüksek riskle ilgili olabilir.

2.3.4. Steroid Hormonların Rolü

Steroid hormon reseptör sinyal yolları, prostat karsinogenezinin her evresinde önemli rol oynamaktadır. Erkeklerde androjen/estrogen oranının yaşla birlikte azalması, prostat kanserinin ortaya çıkmasında önemli bir faktör olarak düşünülmektedir [8].

2.4. Prostat Kanseri Tanı Yöntemleri

Prostat kanseri heterojen bir hastalıktır ve özellikle ileri evrede ve metastatik hastalıkta mevcut tedavi yöntemleri, hastaların yaşam sürelerini uzatmada yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle prostat kanserinin erken teşhisi, tedavide yüksek başarı açısından son derece önemlidir [24]. Bu amaçla farklı tarama metodları kullanılmaktadır [25, 26]:

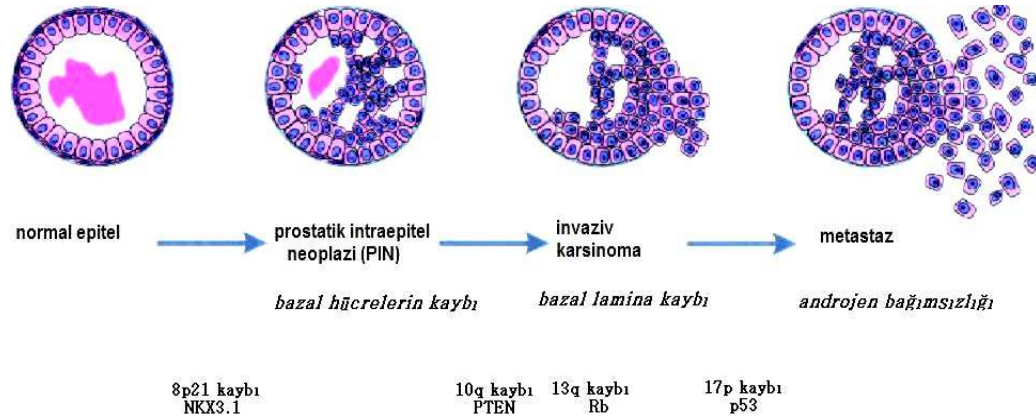
Dijital Rektal Muayene: Dijital rektal muayene, prostat kanseri taramalarında rutin olarak kullanılan bir tekniktir. Şüpheli dijital rektal muayene, serum prostat spesifik antijen (PSA) düzeyleri ile birlikte değerlendirildiğinde taramalarda prostat kanseri tanı oranını yükseltir. Elli yaş üzeri gönüllü erkeklerle yapılan iki çalışmada, dijital rektal muayene, 0,5 m³’ten büyük intrakapsüler tümörlerin teşhis edilme ihtimalini 1,5 ila 2 kat, ekstrakapsüler tümörlerin teşhis edilme ihtimalini ise 3 ila 9 kat artırmıştır [27].

Prostat Spesifik Antijen (PSA): PSA, 33 kDa ağırlığında bir prostatik salgı glikoproteinidir. Kromozom 19 üzerinde hKLLK3 geni tarafından kodlanan, tripsin ve kimotripsin benzeri aktiviteye sahip bir serin esterazdır. PSA sentezi androjen bağımlıdır, ve androjenler yokluğunda azalır. Prostat kanserinde, serum PSA seviyeleri, benign prostatik hiperplazidekine oranla yüksektir [21]. Ancak farklılaşmamış androjen bağımsız prostat kanser hücreleri PSA üretemez. Bu durum, hormona dirençli hastaların bir kısmında PSA artışının görülmemesini açıklamaktadır [28]. Tek başına çok güçlü diagnostik değeri olmamasına rağmen, Gleason skor [29] ve klinik evrelendirme [30] ile birlikte değerlendirildiğinde, PSA seviyesinin ölçülmesi prostat kanserlerinin histolojik derecesini belirlemede değerli bir yöntemdir [31].

Diğer Tanı Yöntemleri: Prostat kanserinin tanısında, dijital rektal muayene ve serum PSA düzeylerine bakılması yanında Transrektal Ultrason (TRUS) ve eşliğinde Transrektal İğne Biyopsisi (TİB) de yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir. Yüksek PSA seviyesi belirlenen veya dijital rektal muayenesinde normal dışı durum gözlenen hastalara, genellikle transrektal ultrason biyopsisi uygulanır [21].

2.5. Prostat Kanserinin Gelişiminde Moleküler Mekanizmalar

Prostat kanserinin ortaya çıkışından ve progresyonundan sorumlu mekanizmalar tamamen açığa çıkarılamamıştır, ancak tümör progresyonunda birçok değişik faktörün (sinyal iletim yollarında, anjiogenez ve adhezyon moleküllerinde değişiklikler gibi) önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. İnsanda prostat kanseri gelişim basamakları. Gelişim aşamaları, spesifik kromozom bölgelerinin ve aday tümör baskılayıcı genlerin kaybı ile gerçekleşir [8].

2.5.1. Prostat Kanserinin Erken Evreleri

Prostat kanserlerinde gerçekleştirilen histopatolojik çalışmalar sonucu, insan prostat kanserinin primer öncüsü olduğuna inanılan spesifik bir lezyon tipi tanımlanmıştır (Şekil 2.6). Prostatik Intraepitelyal Neoplazi (PIN) adı verilen bu lezyon tipi, atipik hücresel özellikler ve nükleer polimorfizm ile belirgindir, ve düşük dereceli ve yüksek dereceli formların arasında bir geçiş formu olarak nitelendirilmektedir. Yüksek dereceli PIN'in, erken invaziv karsinomanın hemen

önceki aşamasını temsil ettiği düşünülür. PIN lezyonları, prostat epitelinde görülen BPH ve Atipik Adenomatöz Hiperplazi (AAH) gibi diğer bazı histopatolojik abnormalitelerinden yapısal ve sitolojik olarak ayırt edilebilmektedir. BPH ve AAH, PIN'in tersine, prostat kanserinin öncü evreleri olarak düşünülmemektedir [32].

Prostat kanserinde sıklıkla görülen moleküler düzeyde değişikliklerden biri, 8. kromozomun spesifik bölgelerinde gerçekleşen delesyonlardır. Bu tür düzensizlikler, FISH, CGH, ve allelik dengesizlik analizi teknikleri ile prostat tümörlerinin %80'inde, bunun yanında kolorektal ve akciğer kanserlerinin belirli bir yüzdesinde de belirlenmiştir [33, 34]. Delesyonların özellikle 8p12-21 ve 8p22'ye karşılık gelen iki bölgede meydana geldiği bildirilmiştir [35]. 8p12-21 kaybının prostat karsinogenezinde erken evrede ortaya çıktığı ve hem PIN hem de erken invaziv karsinomada tanımlandığı bildirilirken, 8p22 delesyonlarının ise geç dönemde meydana geldiği bildirilmiştir. 8p12-21 lokusunda bulunan NKX3.1 homeobox geni, prostat kanseri gelişimi ile ilgili aday gen olarak bildirilmiştir [36].

2.5.2. Prostat Kanserinin Progresyonu

Prostat kanserinin progresyonunda rol oynadığı düşünülen farklı kromozomal düzensizlikler bildirilmiştir. Örneğin 10q kromozomal bölgesinde, daha çok prostat karsinomada tanımlanmış olan, PIN lezyonlarında ise nadir olarak görülen delesyonlar bildirilmiştir. 10q23 bölgesinde bulunan PTEN/MMAC1 tümör baskılayıcı geni, prostat kanser progresyonunda rol aldığı düşünülen genler arasındadır. Prostat kanserlerinin yanında glioblastoma, meme, ve endometrial kanserler gibi birçok farklı kanser türünde 10q23 bölgesinde kayıplar bildirilmiştir [8]. PTEN proteininin kaybının, insan prostat karsinogenezinde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Bu bulgu ile uyumlu olarak, Vliestra ve arkadaşları, birçok prostat kanser hücre hattında ve ksenografta PTEN kaybı olduğunu göstermişlerdir [37].

Prostat kanserinin gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülen bir başka faktör, Retinoblastoma (Rb) geninin bulunduğu 13q kromozomal bölgesinde meydana gelen kayıplardır. Prostat kanserlerinin %50'sinde, 13q bölgesinde delesyonlar bildirilmiştir [38]. Bookstein ve arkadaşları, *Rb* eksikliği olan prostat kanser hücrelerine retrovirüs aracılı gen transferi yoluyla *Rb* proteinini kodlayan gen aktardıklarında tümör oluşumunun engellediğini göstermişlerdir [39]. Sonraki çalışmalarda, organa sınırlı ve ileri evre prostat kanserlerinde de *Rb* proteininin yokluğu bildirilmiştir [40]. *Rb* proteininin, özellikle androjene cevapta prostat hücrelerinde apoptozisi düzenleyici rol oynadığı bildirilmiştir. Ancak bir çok diğer çalışmada *Rb* gen mutasyonları gösterilememiştir [38, 41]. Bu durum, prostat karsinogenezinde, 13q'da *Rb* geni dışında diğer bir genin delesyonunun daha önemli olabileceğini göstermektedir.

Diğer birçok tümörde olduğu gibi, prostat kanserinde de hücre döngüsünün kontrolü ile ilgili genlerde meydana gelen değişikliklerin hastalığın progresyonunda belirgin rol oynadığı düşünülmektedir. Normal şartlarda, prostat epitelinde oldukça düşük oranda gerçekleşen hücre çoğalması, yine düşük oranda gerçekleşen apoptozis ile dengede tutulur [42]. Buna karşın, PIN ve erken invaziv karsinomalarda hücre

çoğalma oranında 7 ila 10 kat artış olduğu, ileri evre ve/veya metastatik prostat kanserlerinde de apoptozis oranında yaklaşık %60 azalma olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, organa sınırlı hastalığın ilerlemesinde hücre döngüsünün kontrolünün kaybedilmesinin önemli rol oynadığı, apoptoziste meydana gelen düzensizliklerin ise ileri evre kanserde daha önemli olduğu düşünülmektedir. Hücre döngüsünü düzenleyici rol oynayan genler arasında, CDK4 inhibitörü olan *p27^{kip1}*, de fonksiyon kaybı, prostat tümörlerinde sıklıkla görülmektedir, ve prognostik belirteç olarak fonksiyon görebileceği bildirilmiştir [8]. *p27^{kip1}* geni, 12p12-13.1 bölgesinde bulunmaktadır [43]. Bu bölgenin ileri evre prostat kanserinde sıklıkla delesyona uğradığı bildirilmiştir [44].

Yüksek dereceli PIN'den erken invaziv karsinomaya geçişte en kritik faktörlerden birinin yaşlanma olduğu bilinmektedir. Yaşlanma ile hastalık ilerleyişi arasındaki bu güçlü ilişki, prostat epitelinin düşük proliferasyon oranından ve transformasyonun oluşabilmesi için geçmesi gereken süreden kaynaklanabilir. PIN lezyonları ve prostatik karsinomada telomer uzunluklarının azaldığı ve telomeraz aktivitesinin arttığı gözlenirken, BPH'ta benzer bir durumdan söz edilmemektedir [45].

2.5.3. Metastatik Hastalığa Geçiş

Prostat kanserinde metastatik hastalığa geçişle birlikte androjen bağımlılığının kaybolması sık görülen bir durumdur. Prostat kanser hücrelerinin başlangıçtaki androjen bağımlılıklarını nasıl kaybettikleri tam olarak açığa kavuşturulmamıştır. Önceleri androjen bağımsız tümör gelişiminin androjen reseptör (AR) mRNA'sının ve proteininin kaybı ile gerçekleştiği düşünülmekteydi [46]. Ancak sonraları, AR proteininin primer tümörlerde, tekrarlayan lokal tümörlerde, ve hatta metastatik tümörlerde oldukça homojen olarak sentezlendiği gözlenmiştir [47-49]. Bu bulgular, kanser hücrelerinin AR sentezinin azaltılmasından bağımsız bir mekanizma ile androjen bağımlılığını kaybettiklerini göstermektedir. Hücrelerin androjen bağımsızlığı edinmesinde birçok mekanizma rol oynayabilir. AR aktivitesinde, fonksiyonunda, ve/veya özgünlüğünde değişiklikler meydana gelebilir. Prostat kanser hücre hatlarında ve primer tümörlerde yapılan çalışmalarda, androjen reseptör geninde hormon bağlama bölgesinde mutasyonlar bildirilmiştir [50, 51]. AR aktivitesini etkileyebilecek diğer mutasyonlara örnek olarak, CAG tekrarlarının amplifikasyonu ve tüm genin amplifikasyonu verilebilir. CAG tekrarlarının uzunluğu, androjen fonksiyonu ile ters orantılıdır [52]. Tüm genin amplifikasyonunun ise, hastalığın tekrarı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Son olarak, androjen kaynağının sınırlı olduğu durumlarda (androjen sentezini inhibe edici tedavi yaklaşımlarında olduğu gibi), hormon bağımlılıklarının, androjen reseptörünün IGF, FGF, ve/veya EGF gibi büyüme faktörleri ile sinerjistik aktiviteleri ile aşılabileceği bildirilmiştir [8, 53].

İleri evre prostat kanserinde ve metastatik hastalıkta, p53 tümör baskılayıcı genini içeren 17p kromozomal bölgesinin delesyonu bildirilmiştir [54, 55]. p53'ün immunositokimyasal lokalizasyonunun belirlendiği veya direk olarak mutasyon analizi yapılan çalışmalarda, ileri evre prostat kanserinde ve tekrarlayan metastatik hastalıkta p53 geninde çeşitli mutasyonlar tanımlanmıştır [8, 56, 57].

2.6. Prostat Kanserinin Tedavisinde Kullanılan Mevcut Yaklaşımlar

Prostat kanserinde tanıda belirlenen histolojik derecelere göre hastalar farklı stratejiler ile tedavi edilmektedir. Hastalığın organa sınırlı olarak seyrettiği erken evrelerde, tedavide genellikle operasyon ve/veya radyasyon tedavisi uygulanır [58, 59]. Tümörün artık prostat bezi ile sınırlı olmadığı, ancak metastatik yayılıma dair belirtiye rastlanılmayan aşama, lokal ileri evre olarak tanımlanır. Lokal ileri evre hastalığın tedavisinde amaç, metastatik yayılım ve doku invazyonu riskini düşürmektir. Bu evrede, tedavide genellikle radyoterapi ve hormon tedavisinin birlikte kullanıldığı yaklaşımlardan yararlanılır. Ancak, hastalık erken evrede teşhis edilemediğinde ya da agresif formlarda, seminal vesiküllerin lokal invazyonu ile karakterize olan ileri evrelere geçiş, ve çoğunlukla kemiğe olmak üzere metastaz gerçekleşir. Metastatik hastalığın tedavisinde amaç, hastanın yaşam süresini uzatabilmek, ve metastazın kemik ağrısı gibi başlıca semptomlarını önleyerek ya da kontrol altına alarak hastanın yaşam kalitesini artırmaktır. Bu evrede hastalara genellikle hormon tedavisi uygulanır [22]. Androjen sentezini bloke edici ajanlarla muamele, hastalığın gelişimini bir süre geriletse de, bu tümörlerin hemen hemen hepsinde androjen yokluğunda tümör progresyonu devam eder [60, 61]. Bu aşamada hastalığın progresyonunu yavaşlatmak amacıyla sitotoksik kemoterapi veya glukokortikoidlerle birlikte uygulanan radyoterapiden yararlanılır [22].

Prostat kanserinin tedavisinde sıklıkla yararlanılan radyoterapi [62] ve kemoterapi [63], kanser hücrelerini apoptozis yoluyla ölüme götürme prensibi ile çalışır. Bu tedavi metodlarının apoptotik etkinliği, p53 tümör baskılayıcı proteininin varlığını gerektirir [64]. Ancak diğer birçok tümörde olduğu gibi, ileri evre prostat kanserlerinde de, p53 geninde ilgili proteinin fonksiyonunu inhibe edici mutasyonlar bildirilmiştir [8, 56, 57]. Sonuç olarak, fonksiyonel bir p53 genine sahip olmayan tümörler, hem kemoterapiye hem de radyoterapiye dirençlilik gösterir [65].

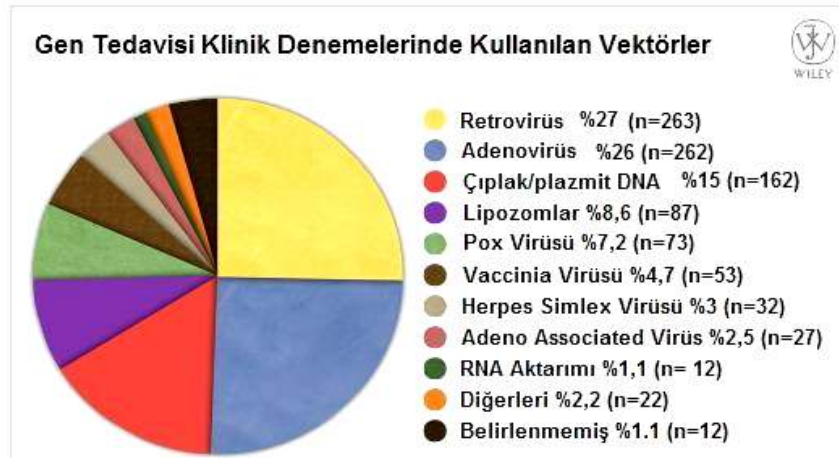
2.7. Prostat Kanserinde Gen Tedavisi

Prostat kanserinde mevcut tedavi yöntemlerinin hastaların yaşam sürelerini uzatmada yeterli olmaması [66], yeni tamamlayıcı tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini gerektirmektedir. Bu sebeplerden dolayı, prostat kanserinde gen tedavisi çalışmaları başlamıştır [67]. Son yıllarda, prostat kanserinde gen tedavisi alanında önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Viral ve viral olmayan yöntemlerle daha etkin gen transferi, doku spesifik DNA promotor mekanizmalarının geliştirilmesi, ve yeni terapötik genlerin keşfi, bu gelişmelere örnek olarak verilebilir [68]. Prostat dokusu, gen tedavi uygulamaları için ideal bir dokudur. Gen transfer vektörlerinin kolay ulaşabileceği bir doku olmasının yanında, kendine özgü antijenlere sahiptir (örn. PSA, PSMA). Prostat kanserinde gen tedavisi için mevcut stratejiler, immunot tedavi ve sitolitik/pro-apoptotik yaklaşımları içermektedir [69]. Bu yaklaşımların başarısında önemli bir faktör, etkin gen transferidir. Viral yöntemler, kanser gen tedavisi çalışmalarında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Birçok diğer kanserde olduğu gibi, prostat kanserine karşı gen tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde de, adenoviral vektörler etkin gen tedavi vektörleri olarak tercih edilmektedir.

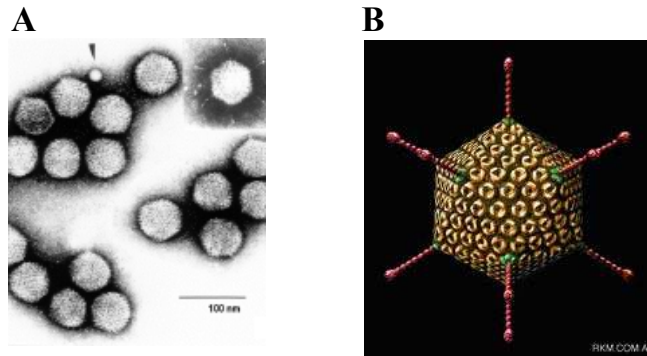
2.7.1. Adenoviral Vektörler

Prostat kanseri gen tedavisi çalışmalarında tedavi edici genlerin hücrelere aktarımı için bugüne kadar çeşitli farklı viral vektörler kullanılmıştır. Bunlara örnek olarak lentivirüsler [70], herpes simplex virüsler [71], adeno associated virüsler [72], ve adenovirüsler [73] verilebilir. Semliki Forest virüsü ve Sindbis virüsü gibi diğer bazı virüs türlerinin de prostat kanser hücrelerine gen aktarımında etkinliği denenmiştir [73]. Ancak bu virüsler, prostat kanser hücrelerini etkin bir şekilde transdüksiyona uğratmakta etkisiz kalmıştır. Antijenik özellikleri ve doku transdüksiyon özellikleri nedeniyle adenovirüsler, kanser gen tedavisi yaklaşımlarında ve klinik denemelerde tercih edilen viral vektörler haline gelmiştir (Şekil 2.8). Bunun yanında, doku spesifik promotörlerin keşfi, adenovirüsleri klinikte kullanım için daha uygun hale getirmiştir [74].

Bugüne kadar 49 farklı Adenovirüs serotipi izole edilmiş ve 6 farklı grup altında toplanmıştır. Gen transfer vektörleri olarak en sık kullanılanlar, C alt grubunun 5 ve 2 numaralı serotipleridir [75].



Şekil 2.8. Gen tedavisi klinik denemelerde kullanılan vektörler ve yüzdeleri [76].

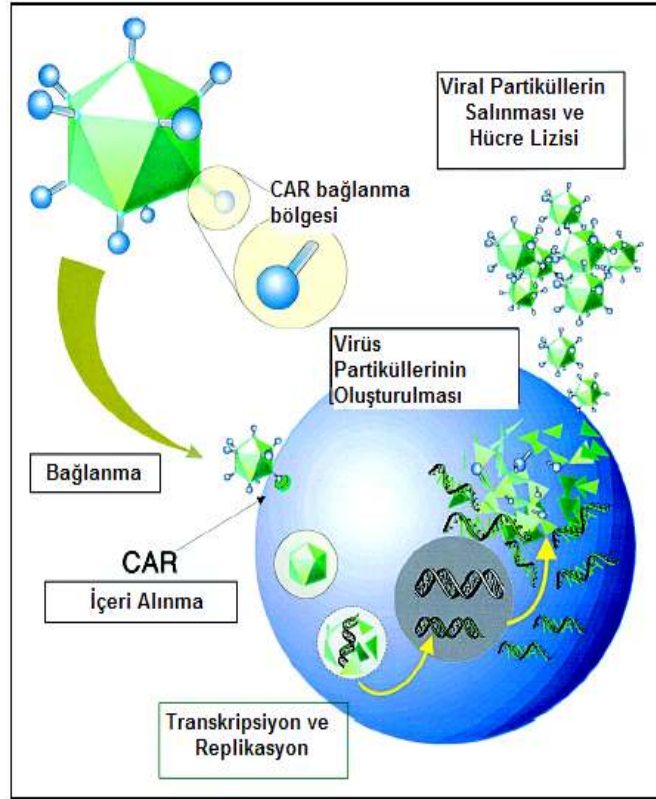


Şekil 2.9. Adenovirüsler. (A) Adenovirüslerin Elektron Mikroskopi altında görüntüsü [77]. (B) Adenovirüsün şematize edilmiş görüntüsü [78].

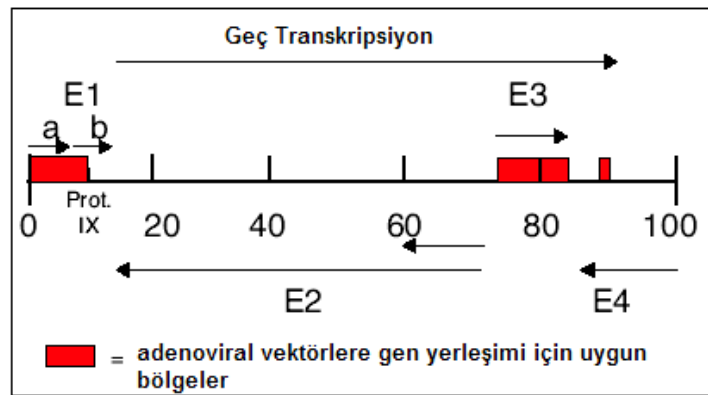
Adenovirüsler, yaklaşık 70-100 nm çaplı bir protein kapsitten, ve kapsid içinde yaklaşık 36 kb uzunluğunda tek kopya çift zincirli DNA'dan oluşur. Adenovirüsler, konakçı hücre yüzeyine Cocksackie Adenovirus Receptor (CAR) reseptörleri aracılığıyla bağlanır. CAR reseptörlerine bağlanan adenovirüsün reseptör aracılı endositoz yoluyla hücre içine alınabilmesi için, aynı zamanda $\alpha\beta$ integrinlere bağlanması gerektiği gösterilmiştir (Şekil 2.10). Hücreye girdikten sonra dış kapsidin ayrışması ile virüs endozomdan kaçır ve sitoplazmaya salınır. Daha sonra viral DNA nükleus içine bırakılır. Viral DNA replikasyonu, enfeksiyondan yaklaşık 7 saat sonra başlar. Adenoviral genom nükleus içine bırakıldıktan sonra, erken adenoviral genlerin (E1-E4) sentezi başlar. Öncelikli olarak sentezlenen proteinler, E1a ve E1b genleri tarafından kodlanan proteinlerdir. Bu proteinler diğer viral genlerin sentezini ve genom replikasyonunu yönetirler. DNA replikasyonu başladıktan sonra viral transkripsiyon geç promotör yoluyla gerçekleştirilir. Tam virüs oluşumu enfeksiyondan sonra 20-24 saat içinde gerçekleşir, ve hücre 2 ila 3 gün içinde lizise uğrar [79].

Yardımcı virüse bağımlı olmayan adenoviral vektörlerin üretiminde, hücrelere aktarılmak istenen DNA, genomda en az üç bölge içine yerleştirilebilir. Bunlar E1 ve E3'te birer bölge, ve E4 ile genomun sonu arasında kalan bir bölgedir. Birinci jenerasyon adenoviral vektörlerde, terapötik gene yer açılması ve viral replikasyonun önlenmesi amacıyla E1 bölgesi çıkarılmıştır [75] (Şekil 2.11).

Adenovirüsleri hem *in vitro* hem de *in vivo* gen tedavi çalışmaları için uygun yapan birçok farklı özellikleri vardır. Öncelikle, doğada yaygın olarak bulunurlar. Çok farklı tipte insan hücrelerini enfekte edebilir, ve diğer mevcut vektörlere oranla daha yüksek seviyelerde gen transferi gerçekleştirebilirler. Bunun yanında, insanlarda patojeniteleri düşüktür; genellikle nezle ile ilgili hafif semptomlara neden olurlar. Ayrıca insanlarda onkogenik etkileri bildirilmemiştir. Adenovirüsler oldukça geniş DNA segmentlerini taşıyabilir ve bölünmeyen hücreleri de transdüksiyona uğratabilirler. Adenoviral vektörlerin bir başka avantajı, genomlarında yeniden düzenlenme oranının düşük olması, ve takılan yabancı genlerin viral replikasyon süresince genellikle değişikliğe uğramadan muhafaza edilmesidir. Ayrıca adenoviral vektör genomlarının, rekombinant DNA teknikleri ile manipülasyonu kolaydır [75].



Şekil 2.10. Adenovirüslerin hayat döngüsü. [75]



Şekil 2.11. Adenoviral DNA'nın yapısı. Yaklaşık 8 kb'lık yabancı DNA adenoviral vektörlere yerleştirilebilir. Protein IX paketlenme için gereklidir, ve vektör üretiminde E1 bölgesine gen yerleştirilmesini kısıtlayıcı bir faktördür.

2.7.2. Kanser Gen Tedavisinde Ölüm Ligantlarının Kullanımı

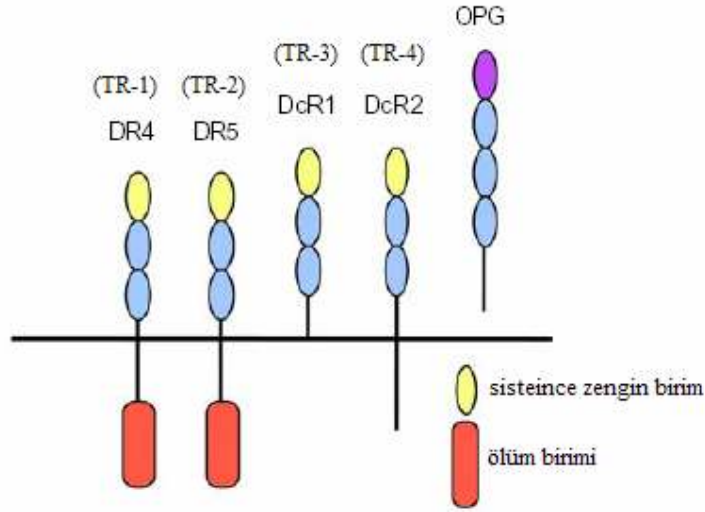
Kanserde ölüm ligantları ile gen tedavisi yaklaşımları, potansiyel tedavi edici stratejiler olarak değerlendirilmektedir [80]. Radyoterapi ve kemoterapiden farklı olarak, ölüm ligantlarının apoptozisi p53'ten bağımsız olarak indükledikleri gösterilmiştir [81]. Apoptozis, kompleks hücre içi yolların aktivasyonu ile gerçekleşen programlı hücre ölümü olarak bilinir [82]. Embriyonik dönemde ve sonrasında, homeostasinin anahtar bir mekanizmasıdır. Programlı hücre ölümünü bloke eden genetik aberasyonlar, tümör oluşumuna ve ilaca dirençliliğe neden olur. Bu nedenle, tümör hücrelerinde apoptozisin spesifik olarak aktivasyonu, prostat kanserinin tedavisinde oldukça etkili olabilir.

TNF (Tumor Necrosis Factor) ailesi üyesi ölüm ligantları kullanılarak prostat kanser hücrelerinde apoptozisin indüklenmesinin amaçlandığı birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar arasında, dışarıdan verilen Fas agonistleri, anti-Fas antikorları, ve membrana bağımlı FasL'ların kullanıldığı çalışmalarda başarı sağlanamamıştır. Öte yandan, antisense oligonükleotitler kullanılarak hücre içi anti-apoptotik c-FLIP molekülünün sentezinin azaltıldığı bir çalışmada, metastatik ileri evre prostat kanser hücre hattı DU145'in anti-Fas monoklonal antikoruna karşı duyarlı hale geldiği gösterilmiştir [83]. Ancak bu yaklaşımla etkin hücre ölümü sağlanamamıştır. Adenovirüsler aracılığıyla FasL'ın hücre içi sentezinin artırıldığı çalışmalar sonucunda ise, kullanılan birçok farklı insan prostat kanser hücre hattının %70 ila %90'ının apoptozise uğradığı bildirilmiştir [84]. Ayrıca, hücrelerdeki bu yüksek ölüm oranı, kısmen apoptotik cisimcikler içinde ve hücrelerel artıklar içinde taşınan FasL aracılığıyla gerçekleşen by-stander etkiye bağlanmıştır. [85]. Ancak LNCaP gibi bazı ileri evre hücre hatlarının ise, FasL aracılı hücre ölümüne dirençli olduğu gözlenmiştir. Buna rağmen, dirençli hücrelerde dahi, önceden IFN γ uygulamasının ortotropik prostat primer tümörlerini rekombinant adenovirüs aracılı FasL aktarımına duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir [86].

FasL [87] ve bunun yanında TNF [88] ile birçok çalışma yapılmış olmasına ve bu moleküllerin kanser hücrelerinde apoptozisi etkin bir şekilde indüklediklerinin gösterilmiş olmasına rağmen, bu moleküllerin kanser gen tedavisinde sistemik kullanımları, yol açtıkları sistemik toksisite nedeniyle önerilmemektedir. Örneğin hayvanlara rekombinant Fas ligand veya anti-Fas mAb'ın enjeksiyonu, hepatosit dejenerasyonuna, nekroza ve kanamaya yol açmıştır [89, 90]. Fas kaynaklı hasar, yüksek seviyede Fas sentez eden hepatositlerde Fas-bağımlı apoptozisin indüksiyonundan kaynaklanır [87]. TNF ise, 1985 yılından bu yana medikal onkolojide kullanılabilir durumdadır. Ancak TNF'in ileri evre kanser hastalarının tedavisinde sistemik kullanımı, yüksek sistemik toksisiteye neden olmuştur. Yüksek sistemik toksisite, maksimum tolere edilebilir dozun azalmasına, tümörde nadiren gerileme sağlanabilmesine, ve organ bozukluklarına yol açmıştır [91, 92]. TNF infüzyonunun organizmada septik şoka benzer ölümcül inflamatuvar cevaba neden olmasının temel nedeni, TNF'in vasküler endotelial hücrelerde ve makrofajlarda proinflamatuvar transkripsiyon faktörü NF-kB'yi aktive etmesidir [93].

TRAIL

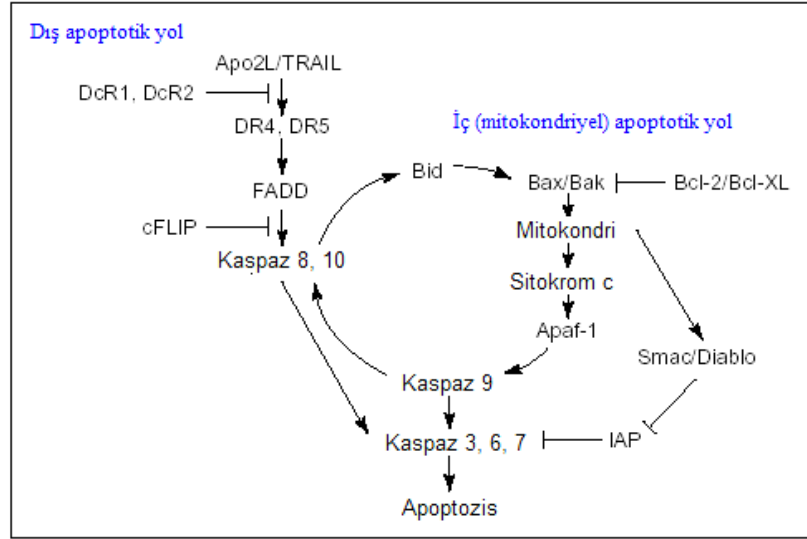
TRAIL, kısa süre önce iki bağımsız grup tarafından tanımlanan bir başka TNF ailesi üyesidir [94, 95]. Amino asit dizisi TNF- α 'ya %23, Fas-liganda ise %28 benzerlik gösteren TRAIL'ın keşfi, ölüm ligantlarının kanser gen tedavisinde kullanımında yeni bir devrin başlangıcı olarak kabul edilmektedir [96], çünkü TRAIL'ın tümör hücrelerinde apoptozisi indüklediği, ancak normal hücrelerde apoptotik etki göstermediği bildirilmiştir [97]. TRAIL'ın bağlanabildiği beş farklı reseptör bulunmaktadır; TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4 ve osteoprotegrin [98, 99]. TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 ölüm reseptörleri olarak görev yapar. TRAIL bu reseptörlere bağlandığında apoptotik hücre ölümü indüklenir. TRAIL-R3, TRAIL-R4 ve osteoprotegrin ise yalancı reseptör olarak tanımlanır. TRAIL bu reseptörlere bağlanabilmesine rağmen apoptotik hücre yolu indüklenmez [100] (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. TRAIL reseptörlerinin şematik gösterimi. Hücre yüzeyindeki sisteince zengin birimler renkli oval şekillerle gösterilmiştir [101].

TRAIL, TR-1 veya TR-2 ölüm reseptörlerine bağlandığında, hücrede dış apoptotik yol aktive olur [102]. TRAIL'ın bağlanması ile TR-1 ve TR-2, ölüm birimi içeren adaptör molekül Fas-Associated Death Domain-containing adaptor molecule (FADD) aracılığıyla, apoptozisi başlatıcı kaspazlar olan kaspaz 8 veya kaspaz 10'u reseptöre çekerek aktive eder. Kaspaz 8 ve kaspaz 10 ise, hücrenin apoptotik ölümünü sağlayan efektör kaspazları, yani kaspaz 3, 6, ve 7'yi aktive eder. Bazı kanser hücre hatlarında, kaspaz 3'ün TRAIL aracılı aktivasyonu, iç apoptotik yolun da indüklenmesi ile artar [103-105]. Bu durumda, kaspaz 8 veya kaspaz 10, bir pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bid molekülünü kırarak aktive eder. Aktive olan Bid molekülü, Bax ve Bak molekülleri ile etkileşime girerek, mitokondriden sitokrom c ve Smac/Diablo'nun salınmasını sağlar. Sitokrom c, Apaf-1 ile birlikte, başlatıcı proteaz kaspaz 9'u aktive eder. Kaspaz 9, kaspaz 3, 6, ve 7'nin aktivasyonunu sağlayan diğer bir kaspazdır. Smac/Diablo, Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) moleküllerine bağlanır. Bu bağlanma, IAP'lerin kaspaz 3'e

bağlanmasını engeller. Dolayısıyla kaspaz 3'ün aktif durumunun devamı sağlanmış olur (Şekil 2.13) [106].



Şekil 2.13. TRAIL tarafından indüklenen iç ve dış apoptotik yollar [106].

TRAIL'in tümöre karşı fonksiyon gören bir ajan olarak aktivitesi kabul görmüş olsa da, normal fizyolojik şartlardaki fonksiyonu tam olarak açığa çıkarılamamıştır [101]. TRAIL'in sitotoksik CD4⁺ T lenfositleri tarafından gerçekleştirilen hedef hücre eliminasyon mekanizmasında rol aldığına dair bulgular mevcuttur. Ayrıca TRAIL'in natural killer (NK) hücreler ve makrofajlar tarafından tümör hücrelerinin öldürülmesinde de görev aldığı düşünülmektedir [106]. TRAIL knockout farelerle yapılan çalışmalar, TRAIL'in NK hücreleri tarafından gerçekleştirilen tümöral immun taramada rolü olduğunu onaylamaktadır [107-109]. Ayrıca, kanser hastalarından alınan tümör hücrelerinde makrofajların aktive olduğu, ve aktive olan makrofajların TRAIL sentezini indükledikleri gösterilmiştir. Bu makrofajların ayrıca tümör hücresi yüzeyinde TR-1 ve TR-2 ölüm reseptörlerinin sentezini artırıcı moleküller salgıladıkları bildirilmiştir [110].

TRAIL'in birçok transforme hücre hattında apoptozisi indüklemesine rağmen, normal dokularda apoptotik etki göstermemesi, sistemik kullanımını gündeme getirmiştir [97]. TRAIL'in çözülebilir formu hayvan modellerinde test edilmiş ve sistemik kullanım sonucu herhangi bir toksisite görülmemiştir. Ancak, tümör büyümesini engellemek için yüksek miktarlarda çözülebilir TRAIL kullanılması gerekmektedir. Çözülebilir TRAIL proteinine alternatif olarak ise, TRAIL'ı kodlayan replikasyon defektif bir adenoviral vektör üretilmiştir [111]. Adenoviral vektörlerin düşük titrelerinin dahi hTRAIL geni taşıyan çok sayıda enfeksiyöz adenoviral vektör içerdiği, bu nedenle *in vivo* çalışmalarda lokal uygulamasının da avantajlı olacağı bildirilmiştir [112]. Geliştirilen Ad5hTRAIL vektöründe Cytomegalovirus (CMV) promotörü kullanılmıştır. CMV promotörü, güçlü ve sürekli ekspresyon sağlar. Bu promotörün kullanımı, TRAIL proteininin lokal konsantrasyonunu artırmak için ek bir mekanizma görevi görmektedir [112].

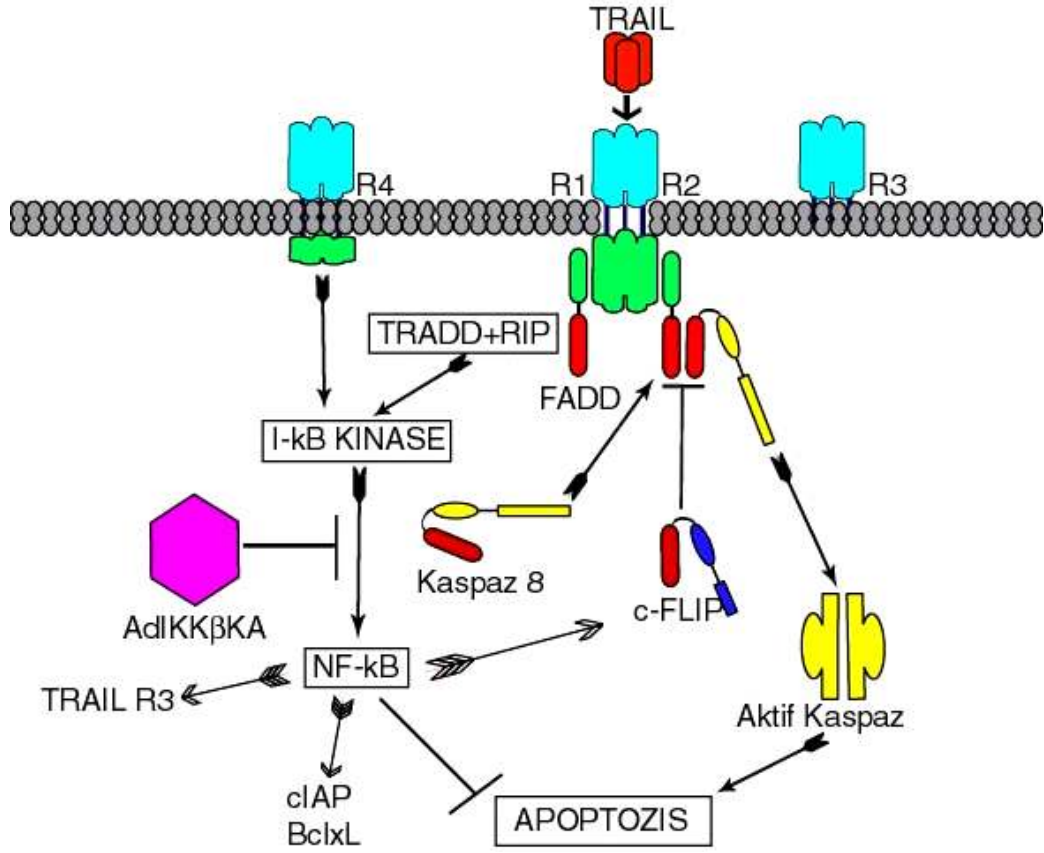
Çözülebilir TRAIL ve Ad5hTRAIL ile çeşitli hücre hatlarında birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Örneğin TRAIL'a duyarlı prostat tümör hücrelerine Ad5hTRAIL enfeksiyonunun, Kaspaz 8 aracılı apoptozisi indüklediği gösterilmiştir [112]. Normal prostat epitel hücreleri ise Ad5hTRAIL uygulaması sonucu apoptotik ölüme gitmemiştir. Bir başka çalışmada, sekiz prostat kanser hücre hattı (CWR22Rv1, DU145, DuPro, JCA1, LNCaP, PC3, PPC1, ve TsuPr1) ve normal prostat epitel hücrelerinin primer kültürlerinde (PrEC), çözülebilir TRAIL'ın etkisi araştırılmıştır [113]. Bu çalışmada 100 ng/ml çözülebilir TRAIL uygulamasının, DU145, DuPro, LNCaP, TsuPr1, ve PrEC hücrelerinde apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Bunun yanında, kemoterapötik ajan doksorubisin kullanıldığında hemen hemen tüm hücreler TRAIL aracılı apoptozise duyarlı hale gelmiştir. Öte yandan, TRAIL geninin bütünü kodlayan bir adenoviral vektör (AdTRAIL-IRES-GFP), doksorubisin uygulaması olmaksızın prostat kanser hücrelerini ve aynı zamanda beklenmedik bir şekilde PrEC hücrelerini de öldürmüştür [113]. Bu çalışma, doku spesifik promotörlerle birlikte kullanıldığında AdTRAIL-IRES-GFP gen tedavi yaklaşımının prostat kanserinin tedavisinde yararlı olacağını göstermiştir. Ancak bazı prostat kanser hücrelerinin TRAIL'a dirençli olduğu gözlenmiştir [114]. Örneğin bir çalışmada, ALVA31, PC3, ve DU145 hücre hatlarının TRAIL aracılı apoptozise yüksek derecede duyarlı olduğu, TSUPr1 ve JCA1 hücre hatlarının ise orta derecede duyarlı olduğu, LNCaP hücrelerinin ise dirençli olduğu bildirilmiştir. [114]. Aktif lipid fosfataz PTEN'in yokluğuna bağlı olarak, LNCaP hücrelerinin sürekli hücre içi Akt aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. Akt, fosfatidilinositol (PI)3 kinaz/Akt hücre içi yolunun negatif regülatörüdür. PI3-kinaz inhibitörlerinin, LNCaP prostat kanser hücrelerini TRAIL'a duyarlı hale getirdiği bildirilmiştir. Ayrıca, sürekli olarak aktif Akt kodlayan adenovirüslerle enfeksiyonun, wortmannin ajanının TRAIL aracılı Bid aktivasyonunu güçlendirme yeteneğini engellediği bildirilmiştir. Bu durum, hücre içi sürekli Akt aktivitesinin TRAIL aracılı apoptozisi inhibe ettiğini göstermiştir [114].

TRAIL'ın etkisinin çalışıldığı birçok başarılı *in vitro* çalışmaya dayanarak Walczak ve ark., TRAIL'ın kullanıldığı ilk *in vivo* çalışmayı gerçekleştirmiştir. Çalışmada, MDA-231 meme kanser hücreleri enjekte edilmiş SCID farelere 500 µg insan TRAIL proteini ve 1 mg sıçan TRAIL proteini intravenöz olarak verilmiştir. Deney sonucunda fare canlılığı, doku bütünlüğü ve kan sayımı açısından önemli düzeyde toksisite görülmemiştir. Bunun yanında, enjeksiyondan 9-12 saat sonra tümör taşıyan bölgelerde TRAIL'ın indüklediği apoptotik ölüm açıkça görülebilmektedir [115]. Bir başka çalışmada, maymunlarda tekrarlı TRAIL sistemik uygulamasının, klinik ve histopatolojik testlerde belirlenebilir düzeyde bir değişikliğe yol açmadığı bildirilmiştir [116].

Prostat Kanseri Hücrelerinde Gözlenen TRAIL Dirençliliği

TRAIL mRNA'sının, lenfositler, dalak, prostat, over, kolon, ve plasenta gibi çok çeşitli hücre ve dokularda sürekli olarak sentezlendiği gösterilmiştir [94]. Bu durum, birçok normal hücre tipini özellikle TRAIL aracılı apoptozisten koruyucu fizyolojik mekanizmaların varlığına işaret eder. Oysa TNF, lymphotoxin- α , ve FasL gibi diğer TNF ailesi üyelerinin sentezleri, normal hücreler üzerinde toksik etki gösterebileceklerinden dolayı sıkı bir regülasyona tabidir. Normal hücrelerde görülen TRAIL'a dirençlilik mekanizması henüz tam olarak açığa çıkarılmadığı gibi, son

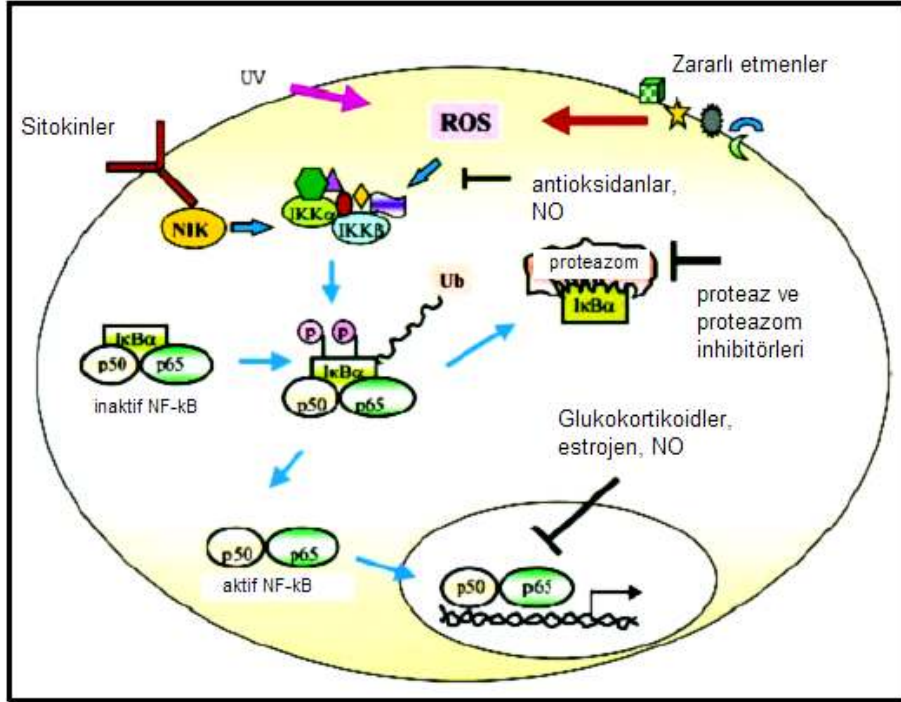
yıllarda yapılan çalışmalar, bazı prostat kanser hücrelerinin TRAIL’a dirençli olduğunu göstermiştir. TRAIL aracılı apoptozisin ve dirençliliğin mekanizması, şekil 2.14’te gösterilmiştir. Hücrelerde TRAIL’a dirençliliği açıklamak üzere iki farklı hipotez geliştirilmiştir. İlk hipoteze göre, normal hücrelerde ölüm reseptörleri (TRAIL-R1 ve TRAIL-R2) ile rekabete giren yalancı reseptörler (TRAIL-R3 ve TRAIL-R4) bulunur, ve bu reseptörler ölüm reseptörlerine bağlanabilecek TRAIL ligantlarının sayısını düşürerek veya hücre içi anti-apoptotik yolları aktive ederek (TRAIL-R4) TRAIL’a dirençlilik sağlar [117, 118]. TRAIL-R4 bağlanması, anti-apoptotik NF-kB sinyal yolunu aktive eder [119]. Ayrıca, kanser hücrelerinde yalancı reseptörlerin sentezinin promotör hipermetilasyonu sonucu azaldığı gösterilmiştir [120]. Bu durum, kanser hücrelerinde TRAIL’a farklı duyarlılıklara sebep olur. Ancak TRAIL dirençliliği ile yalancı reseptör sentezleri arasında kesin bir ilişki kurulamamıştır [97]. Ayrıca, TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 gibi ölüm reseptörlerinin de NF-kB yolunu stimüle edebildiği gösterilmiştir [121, 122]. Bu bulgular ışığında, anti-apoptotik yolların indüksiyonuna rağmen hücrelerin apoptozise gitme nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. İkinci hipotez, TRAIL’a dirençli hücrelerde apoptozisi inhibe edici moleküllerin sentezinin arttığını savunmaktadır. Bu hipotez ile ilişkili olarak, bir kaspaz 8 homologu olan c-FLIP’in (cellular **FLICE** Inhibitory Protein) TRAIL lm ligantları aracılığıyla gerçekleşen apoptozisi engellediği gösterilmiştir [123]. Ayrıca NF-kB aktive edici ajanların c-FLIP sentezini artırdığı gösterilmiştir [124]. Bunun yanında, NF-kB aktivasyonundaki artışın, TRAIL-R3’n ve apoptozisi inhibe edici bir protein olan Bcl-xL’in sentezini artırdığı bildirilmiştir [125, 126]. NF-kB yollarının, aynı zamanda cIAP gibi apoptozis inhibitör proteinlerinin sentezini de artırıcı etki gösterdiği bilinmektedir [127]. Bu bulgular ışığında, hücre içi aktif NF-kB sinyal yolunun en az dört farklı yolla hücreleri TRAIL’a dirençli kılabilceği görülmektedir (şekil 2.14).



Şekil 2.14. Prostat kanser hücrelerinde NF-kB sinyal yolunun bloke edilmesi yoluyla TRAIL'a dirençliliği kırmak için geliştirilmiş bir gen tedavi stratejisi [128].

TRAIL dirençliliğinde rol oynadığı düşünülen NF-kB transkripsiyon faktörleri, Rel protein ailesi üyesi moleküllerden oluşan dimerlerdir. Bu proteinler Rel homoloji birimleri ile karakterizedir. Rel homoloji birimleri, DNA'ya bağlanmada, dimerizasyonda ve IκB gibi inhibitör proteinlerle etkileşimlerde görev alır. IκB proteinleri, NF-kB ile fiziksel etkileşime girererek NF-kB'nin nüklear lokalizasyon sinyallerini bloke eder ve NF-kB proteinlerini sitoplazmada tutar. Bu sayede, NF-kB'nin nükleusta geçici ve kalıcı seviyelerini düzenler (Şekil 2.15) [129-131]. Birçok hücre tipinde, hücre uygun uyarıya alana dek NF-kB kompleksleri çoğunlukla sitoplazmada tutulur ve transkripsiyonel olarak inaktiftir. IκB proteinleri, TNF gibi inflamasyon indükleyici sitokinlerin veya bakteriyel lipopolisakkaritlerin etkisiyle, N terminal bölgelerinde bulunan iki serin biriminden fosforillenir. [129-131]. IκB proteinlerinin fosforilasyonu, hızlı bir şekilde ubiquitinlenmelerine ve sonrasında 26S proteazomlar tarafından parçalanmalarına yol açar. IκB proteinlerinin proteazom bağımlı parçalanması sonucu, NF-kB serbest kalır ve spesifik hedef genlerin sentezini aktive etmek üzere hücre çekirdeğine göç eder [129-131]. IκB'nin fosforilasyonunda, IκB kinaz (IKK) molekülleri görev alır. Üç alt ünitelerden oluşan bir kompleks şeklinde fonksiyon gören IKK kompleksinde, kinaz aktivitesinin IKKα ve IKKβ'dan oluşan heterodimer tarafından gerçekleştirildiği gösterilmiştir. IKKα ve IKKβ'ya ek olarak, IKK kompleksi ile ilişkilendirilen bir başka protein, IKKγ'dır.

IKK γ 'nın, IKK kompleksinin ilgili sinyal yolları ile bağlantısını kuran bir yapısal protein olduğu düşünülmektedir [131-133].



Şekil 2.15. NF-κB aktivasyon ve inhibisyon yolları [134].

Prostat Kanseri Hücrelerinde TRAIL Dirençliliğini Kırma Yöntemleri

Kanser hücrelerinde TRAIL dirençliliğini kırmaya yönelik olarak, farklı stratejilerin kullanıldığı birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Örneğin, toksik seviyelerin altında kemoterapötik ajanların kullanımının, *in vitro* ve *in vivo* TRAIL etkinliğini artırdığı bildirilmiştir [103, 135-138]. Bir kemoterapötik ajan olan aktinomisin D'nin (Act D) BclXL anti-apoptotik proteininin sentezini azaltarak Kaposi Sarkoma hücrelerini TRAIL aracılı apoptozise duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir [139]. Yine TRAIL ve Act D'nin birlikte kullanıldığı yaklaşımlarla, TRAIL'a dirençli prostat kanser hücrelerinde TRAIL'a duyarlılık sağlanmıştır [140, 141]. Bu hücrelerde Act D'nin XIAP anti-apoptotik molekülünün sentezini azalttığı gösterilmiştir. Bir başka kemoterapötik ajan olan etopozitin, TR-1 ve TR-2 ölüm reseptörlerinin sentezini artırarak meme kanseri hücrelerinde TRAIL aracılı apoptozisin etkinliğini önemli derecede artırdığı gösterilmiştir [142]. TRAIL'ın kanser hücrelerindeki etkinliğini artırmak için kemoterapötik ajanların yanında başka yaklaşımlar da denenmiştir. Örneğin, TRAIL'ın etkinliğinin, IFN- γ [143], γ -radyasyon [144, 145], ve siklooksijenaz inhibitörleri [146] ile birlikte kullanıldığında artış gösterdiği bildirilmiştir. Bu yaklaşımların, genel olarak TRAIL ölüm reseptörlerinin ve kaspazların sentezini artırarak, ve IAP ailesi üyesi moleküllerin veya anti-apoptotik c-FLIP molekülünün inhibisyonunu sağlayarak fonksiyon gördüğü gösterilmiştir [106].

Kanser hücrelerinde TRAIL dirençliliğine sebep olan, ve diğer birçok dirençlilik mekanizmasını da tetiklediği bilinen hücre içi NF-kB aktivitesini engelleyecek yaklaşımların da TRAIL'ın etkinliğini artıracağı ileri sürülmüştür [147]. NF-kB'yi stimüle edici ajanların TRAIL-R3 yalancı reseptörünün [148], bunun yanında Bcl-xL [126], cIAP [127], ve cFLIP [124] gibi apoptozis inhibitörlerinin sentezlerini artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, TRAIL-R4 reseptörünün NF-kB sinyal yolunu indükleyerek TRAIL aracılı hücre ölümünü engellediği bildirilmiştir [119]. Ayrıca TRAIL'ın, ölüm reseptörleri (TRAIL-R1 and TRAIL-R2) aracılığıyla da NF-kB yolunu aktive ettiği gösterilmiştir [121, 122]. Tüm bu bulgular, NF-kB'yi inhibe edici yaklaşımların TRAIL'a dirençli prostat kanser hücrelerinde TRAIL duyarlılığı sağlamada oldukça etkin olabileceğini göstermektedir. Prostat kanser hücrelerinde, NF-kB'nin regülatörü olan IKK molekülünün yüksek aktivitesinin yüksek NF-kB aktivitesine yol açtığı bilinmektedir [149]. Dolayısıyla, etkin gen transferi sağlayan adenoviral vektörler aracılığıyla özellikle IKK'in katalitik alt ünitelerini inhibe edici genlerin aktarımı, TRAIL dirençliliğini kırmada oldukça etkili olabilecek bir stratejidir (Şekil 2.12). Bu stratejinin, daha önce akciğer kanser hücrelerinde TNF aracılı apoptozise direnci kırmadaki etkisi araştırılmış, ve IKK β 'nın dominant negatif mutantını kodlayan AdIKK β KA adenoviral vektörünün, akciğer hücrelerini başarılı bir şekilde TNF'e duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir [150, 151]. Bizim çalışmamızda, AdIKK β KA'nın TRAIL'a dirençli prostat kanser hücrelerini TRAIL'a duyarlı hale getirme potansiyelini araştırıldı.

MATERYAL ve METODLAR

3.1. Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan DU145, PC3 ve LNCaP ve 293 hücre hatları, American Type Tissue Culture Collection'dan (ATCC) temin edildi. DU145, PC3 ve LNCaP, insan ileri evre prostat kanser hücre hatlarıdır. Hücrelerin özellikleri Tablo 3.1'de verilmiştir. 293 hücreleri, insan embriyonik böbrek hücre hattıdır. 293 hücrelerinin genomuna, replikasyon defektif adenoviral vektörlerin üretilmesi amacıyla, adenoviral replikasyon için gerekli olan E1A geni kalıcı olarak eklenmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan prostat kanser hücrelerinin özellikleri (ATCC).

Hücre Hattı	Kökeni	Androjen Bağımlılığı
DU145	İnsan prostat karsinoma, beyin metastazı	(-)
PC3	İnsan prostat adenokarsinoma, 4. derece	(-)
LNCaP	İnsan prostat adenokarsinoma, lenf nodu metastazı	(+)

Kullanılan Solusyonlar:

Trypsin-EDTA (Biological Industries)

RPMI-1640 Besiyeri:

- RPMI-1640 Toz Besiyeri (Sigma)
- %10 Fetal Bovine Serum (FBS) (Biocrom KG)
- 2.2 g/l Sodyum Bikarbonat (Sigma)
- 1 mM L-glutamin (Biological Industries)
- %1 penisilin-streptomisin (Biological Industries)

Besiyerinin hazırlanması için, toz RPMI-1640 besiyeri 900 ml bidistile suda çözüldü. Daha sonra çözülmüş besiyeri üzerine 63 ml daha bidistile su eklendi. Besiyerinin pH'sı HCl ile pH4'e ayarlandı ve 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Otoklavlama sonrası besiyeri soğuduktan sonra üzerine 26.7 ml Na Bikarbonat, 10,25 ml L-Glutamin, 11 ml Penisilin-Streptomisin, ve 110 ml FBS eklendi. Hazırlanan besiyeri +4°C'de saklandı.

Hücreler, 100 mm hücre kültürü kaplarında (Sarstedt) RPMI-1640 besiyeri içinde, 37°C sıcaklık ve %5 CO₂'li nemli ortamda üretilir.

3.2. Rekombinant Adenoviral Vektörlerin Üretimi

Kullanılan Solusyonlar:

RPMI-1640:

3.1’de tanımlandığı gibi hazırlandı.

1 M Tris-Cl (Amresco):

24,2 g Tris 160 ml distile H₂O’da (dH₂O) çözüldü. Çözelti dH₂O ile 200 ml’ye tamamlandı. Solusyonun pH’sı HCl ile pH 8’e ayarlandı. Otoklavlanarak steril hale getirildi ve +4°C’de saklandı.

10 mM Tris-Cl (Amresco):

1 M Tris-Cl’den 7,5 ml alınarak solusyon dH₂O ile 750 ml’ye tamamlandı. Otoklavlanarak steril hale getirildi ve +4°C’de saklandı.

Yoğun CsCl Solusyonu (Y-CsCl) (Gibco BRL):

42,3 g CsCl, 57,77 ml 10 mM Tris-Cl içinde çözüldü. Solusyonun pH’sı pH 8’e ayarlandı. Otoklavlanarak steril hale getirildi ve +4°C’de saklandı.

Hafif CsCl Solusyonu (H-CsCl) (Gibco BRL):

22,39 g CsCl, 77,61 ml 10 mM Tris-Cl içinde çözüldü. Solusyonun pH’sı, pH 8’e ayarlandı. Otoklavlanarak steril hale getirildi ve +4°C’de saklandı.

Birinci generasyon adenoviral vektörlerde, adenoviral proliferasyonu sağlayan E1A geni çıkarılmıştır. Bu nedenle, adenoviral vektörlerin üretimi için, genomlarına replikasyon için gerekli viral E1A geni kalıcı olarak eklenmiş olan 293 sayılı insan embriyonik böbrek hücre hattı kullanıldı.

3.2.1. İnsan 293 Hücrelerinin Enfeksiyonu

İnsan 293 hücreleri, RPMI-1640 besiyerinde toplam 40 adet 150 mm’lik doku kültürü kabını kaplayacak şekilde üretildi, ve hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında serumsuz besiyeri ortamında virüs enfeksiyonu gerçekleştirildi. Enfeksiyondan iki saat sonra hücrelere mevcut besiyeri miktarı kadar (10 ml) %20 FBS içeren besiyeri eklenerek, besiyeri içindeki serum konsantrasyonu %10’a çıkarıldı. Hücrelerde sitopatik etki belirgin hale geldiğinde (enfeksiyondan yaklaşık 30 saat sonra), adenoviral vektörleri içeren hücreler toplandı ve 250 ml’lik steril tüplere aktarıldı. Hücreler 4°C’de 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası dökelti atıldı ve hücreler 10 mM Tris-Cl içinde, her 150 mm’lik kap için 0,5 ml olacak şekilde çözüldü.

3.2.2. Adenovirüs Pürifikasyonu

Adenovirüsleri hücrelerden çıkarabilmek için örnekler 3 kez etil alkol-kuru buz aşamasından geçirilip hızlı donma-çözünme işlemine tabi tutuldu. Lizatlar 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve dökelti toplandı. Ultrasantrifüj tüplerine 10 ml

Y-CsCl koyuldu ve üzerine 10 ml H-CsCl eklendi. En üste viral dökelti konuldu ve örnekler Beckman SW28 rotoru ile 20,000 rpm’de, 4°C’de, 12 saat santifüj edildi. Viral bantlar bir tüpe şırınga yardımı ile toplandı ve miktarı, 10 mM’lık Tris-Cl, pH 8.1 ile 4 ml’ye çıkarıldı. Temiz bir ultrasantrifüj tüpüne 4ml Y-CsCl ve 4 ml H-CsCl konup üzerine sulandırılmış virüs bandı yüklendi. Bu tüpler SW41 rotoruna yüklenerek 20,000 rpm’de 4°C’de, 4 saat santrifüj edildi. Santifüj sonrası viral bantlar izole edildi ve konsantrasyonları spektrofotometrik A₂₆₀ okuma ile belirlendi. Viral vektörlerin ortalama titreleri, 10¹³ DNA partikülü/ml idi. Fonksiyonel titreler ise 293 hücrelerinde plak titreleme yoluyla ölçüldü. Partikül/plak oluşturan birim oranı tipik olarak 50’ye eşitti. Ad5hTRAIL [112], AdIKKβKA [151], AdEGFP [150], AdCMVLacZ [152] ve AdNFκBLuc [151] adenoviral stokları, yukarıda tanımlandığı şekilde hazırlandı ve 10mM Tris, %20 gliserol içinde -80°C’de saklandı.

3.3. Prostat Kanseri Hücrelerinin Rekombinant Adenoviral Vektörler ile Transdüksiyonu

Çalışmada kullanılan adenoviral vektörlerin özellikleri Tablo 3.2.’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan adenoviral vektörlerin özellikleri.

Adenoviral Vektör	Özelliği
Ad5hTRAIL	İnsan TRAIL genini kodlayan vektör
AdIKKβKA	IKKβ’nın dominant negatif mutantını kodlayan vektör
AdEGFP	Yeşil flöresan veren ‘Enhanced Green Fluorescence Protein’ kodlayan vektör
AdCMVLacZ	Beta galaktosidaz geni taşıyan, kontrol amaçlı kullanılan adenoviral vektör
AdLucNFκB	NF-κB aracılı transkripsiyonel indüksiyonu ölçmek için lusiferaz belirteç genini kodlayan vektör

Kullanılan Solusyonlar:

Trypsin-EDTA (Biological Industries)

Fötal Bovine Serumlu (FBS) ve FBS’siz RPMI-1640 besiyeri:

3.1’de tanımlandığı gibi, %10 serumlu, %20 serumlu, ve serumsuz olarak hazırlandı.

Prostat kanser hücre hatları DU145, PC3, ve LNCaP, RPMI 1640 besiyerinde üretili. Hücreler, Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) reporter geni (AdEGFP) sentez eden adenoviral vektörlerin artan konsantrasyonları ile (0, 100, 500, 1000, 5000, ve 10000 MOI), 37°C’de FBS’siz RPMI 1640 besi ortamı içinde enfekte edildi. Doku kültürü besi ortamındaki serum konsantrasyonu, enfeksiyondan iki saat sonra %20 FBS konularak %10’a çıkarıldı. Transdüksiyon seviyesi, enfeksiyondan 48 saat sonra flöresan mikroskop altında ve sonrasında akış sitometrisi ile EGFP(+) hücrelerin oranına bakılarak belirlendi. Prostat kanser

hücrelerinde hTRAIL proteininin sentezini artırmak için Ad5hTRAIL vektörü kullanıldı. IKK aktivitesini ve bu yolla NF-kB aktivasyonunu bloke etmek için, kinaz inaktif IKK β kodlayan adenoviral vektörlerden (AdIKK β KA), tek başına ve Ad5hTRAIL ile birlikte enfeksiyon deneylerinde yararlanıldı. Dominant negatif IKK β (IKK β KA) sentezi, diğer IKK alt üniteleri ile etkileşime girerek fonksiyonel olarak inaktif IKK kompleksleri oluşturur. Transkripsiyon aktivasyon deneyleri, lusiferaz reporter genine takılı NF-kB regülatör bölgelerini taşıyan AdNFkBLuc vektörleri aracılığıyla gerçekleştirildi. Deneylerde kontrol amaçlı olarak hücreler AdCMVLacZ virüsü ile enfekte edildi.

3.4. NF-kB Transkripsiyon Aktivasyon Deneyleri

Kullanılan Kit:

Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer (Promega)

Kullanılan Solusyonlar:

Radioimmunoprecipitation (RIPA) Tamponu:

100 ml 1XPBS
1 ml NP-40 (%1)
1 ml %10 SDS (%0.01)

Prostat kanser hücrelerinin NF-kB aktivasyon durumlarını belirlemek için AdNFkBLuc vektörleri kullanıldı. AdNFkBLuc vektöründe, HSV virüsüne ait timidin kinaz geninin TATA-benzeri promotörü ve bu promotora bitişik olarak, 4 kopya ortak NF-kB bağlanma dizisini bulunmaktadır. Bu promotör, bir ateş böceği (*Photinus pyralis*) lusiferaz belirteç geninin sentezini sağlamaktadır. Endojen NF-kB proteinlerinin kappa enhancer birimine bağlanması ile transkripsiyon indüklenir. Deneysel aşamalarda ilk olarak, 35 mm'lik doku kültürü kaplarında (Corning) üretilen hücreler 5000 MOI AdNFkBLuc virüsü ile enfekte edildi. Viral enfeksiyondan 24 saat sonra, RIPA tamponu kullanılarak hücre lizatları hazırlandı. Bunun için, hücreler önce 1XPBS ile yıkandı. Üzerlerine 0,5 ml RIPA tamponu eklendi. Doku kültürü kabı, +4°C'de 15 dakika sallanarak inkübe edildi. Kalkan hücreler 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüpüne aktarıldı ve 45 dakika buzda tutuldu. Daha sonra 15000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu işlem sonunda toplam hücre lizatını içeren dökelti, temiz bir tüpe aktarıldı. Hücre lizatlarındaki protein konsantrasyonları, kolorimetrik Bradford Deneyi ile belirlendi [153]. Lusiferaz deney sistemi kullanılarak, bu lizatlarda TRAIL varlığında ve yokluğunda NF-kB aracılı transkripsiyonel indüksiyon ölçüldü. Ölçümlerde Perkin-Elmer LSB50 luminometre cihazından yararlanıldı. Analiz aşamasında standart eğri oluşturulmasında BSA protein miktarları kullanıldı. Lusiferaz aktivitesine yönelik tüm ölçümler (RLU, Relative Light Unit = Rölatif Işık Ünitesi), protein konsantrasyonlarına normalize edildi.

3.5. Hücre Canlılık Oranlarının Belirlenmesi

Kullanılan Kit:

Cellular Viability and Cytotoxicity Kit (Eugene, OR)

Farklı işlemler sonrasında ölü hücrelerin canlı hücrelerden ayırt edilebilmesi için hücre canlılık deneyi uygulandı. Bu deneyde, hücre içi kalsein esteraz için bir florojenik substrat olan Calsein AM, yalnızca canlı hücrelerde, yeşil flöresan veren bir bileşiğe (kalsein) dönüşür. Sadece membran bütünlüğü bozulmamış olan canlı hücreler aktif esteraz içerdiğinden, kalseinin florometrik metodlarla belirlenmesi canlı hücreler için bir belirteç görevi görür. Etidium homodimer-1 (EthD-1), bütünlüğü bozulmamış hücre membranlarından geçemeyen bir kırmızı flöresan nükleik asit boyasıdır. Membran bütünlüğü bozulmamış hücreler EthD-1'i dışarı verirken, hasarlı membranı olan hücreler boyayı alır ve pozitif boyanır. Deneyde, hücreler PBS içinde EthD-1 ve Calsein AM solusyonları ile 50 dakika inkübasyona bırakıldı ve flöresan mikroskop altında canlı/ölü hücre oranına bakıldı.

3.6. İnsan TRAIL Reseptörleri için Kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR

3.6.1. Total RNA İzolasyonu

Kullanılan Solusyonlar:

TRIzol Reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD)
Kloroform (Sigma)
İzopropanol (Sigma)
%75 Etanol
steril dH₂O

100 mm çaplı doku kültürü kaplarında yaklaşık 5-6 milyon hücre olacak şekilde üretilen prostat kanser hücreleri üzerine, 1 ml TRIzol Reagent eklendi. TRIzol ajanının eklenmesinden sonra kendiliğinden doku kültürü kabının yüzeyinden kalkan hücreler, lizat halinde kültür kaplarından toplandı. Toplanan hücreler homojen hale getirilip oda ısısında 5 dakika bekletildi ve üzerine 0,2 ml kloroform eklendi. Örnekler 13,000 rpm, 4°C'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üç farklı faza ayrıldı. En üstteki RNA fazı temiz bir tüpe aktarıldı, ve üzerine 0,5 ml izopropanol eklendi. On dakika oda ısısında inkübasyon sonrasında, 13,000 rpm, 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Dökelti uzaklaştırıldı ve 1 ml %75 etanol eklendikten sonra tekrar 13,000 rpm, 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Oluşan RNA çökeltisi 10 dakika oda ısısında kurutuldu. Çökeltiye uygun miktarda steril dH₂O eklendi ve çözülmesi için 15 dakika 56°C su banyosunda tutuldu. Spektrofotometrede OD₂₆₀/OD₂₈₀ değeri ölçüldü ve konsantrasyonu belirlendi.

3.6.2. cDNA Eldesi

Kullanılan Kit:

TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems)

Kit içeriği:

10X Reverse Transkripsiyon Tamponu, MgCl₂ (25 mM), 10X Random Hexamer (50 mM, 5nmol), Multiscribe Reverse Transkriptaz (50 U/μl), RNaz İnhibitörü, nükleaz içermeyen dH₂O

cDNA reaksiyonu:

10X Reverse Transkripsiyon Tamponu	5 µl
MgCl ₂	11 µl
dNTP'ler	2.5 µl
10X Random Hexamer	2.5 µl
RNaz İnhibitorü	3 µl
MultiScribe Reverse Transkriptaz	1.25 µl
Nükleaz içermeyen dH ₂ O	14.75 µl
RNA	2 µg

Yukarıda belirtilen oranlarda karıştırılan içerikler, Applied Biosystems marka Gerçek Zamanlı RT-PCR aletinde 25°C'de 10 dakika, ve 48°C'de 60 dakika RT-PCR reaksiyonuna tabi tutuldu.

3.6.3. TaqMan PCR Reaksiyonu**Kullanılan Solusyonlar:**

Universal Master Mix (UMM) (Applied Biosystems)

TRAILR1 ve TRAILR2 ölüm reseptörleri için Gerçek Zamanlı Kantitatif RT-PCR primer ve problemlerinin tasarımı, bir intron içerecek şekilde, daha önceden yayımlanmış TRAIL sekanslarına bakılarak (Human Genome Project BAC clone RP11-1149023 ve RPRP11-875011) yapılmıştı [154]. Ancak TRAIL-R3 ve TRAIL-R4 yalancı reseptörlerinin Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR için primer ve prob dizileri henüz yayımlanmadığından, bu reseptörlere ait primer ve problemler de yukarıda belirtildiği şekilde tasarlandı. TRAIL reseptörlerine ait tüm primer ve problemler dizileri, aşağıda verilmiştir. Reaksiyonda iç kontrol olarak, ikinci bir flöresan boya bağlı olan rRNA primer ve problemleri kullanıldı. Böylece TRAIL reseptörlerinin ve rRNA'nın aynı reaksiyon içinde analizi sağlandı. TaqMan PCR reaksiyonunda, 250 ng cDNA kalıbı, 12,5 µl 2XUMM, ve 0,5'er µl primer ve prob kullanılarak hem TRAIL reseptörlerinin hem de rRNA'nın mesaj miktarı aynı anda belirlendi. rRNA primer ve problemleri PE Applied Biosystems firmasından satın alındı.

TRAIL reseptörlerine ait primer ve prob dizileri:

TRAILR1-5' TGT-ACG-CCC-TGG-AGT-GAC-AT,
TRAILR1-3' CAC-CAA-CAG-CAA-CGG-AAC-AA,
TRAIL R1 Probe: 5'-6FAM-TGTCCACAAAGAATCAGGCAATGGACATAAT-TAMRA-3';
TRAILR2-5' CAC-TCA-CTG-GAA-TGA-CCT-CCT-TT,
TRAILR2-3' GTG-CAG-GGA-CTT-AGC-TCC-ACT-T,
TRAIL R2 Probe: 5'-6FAM-TCACACCTGGTGCAGCGCAAGCAG-TAMRA-3';
TRAILR3-5' CCC-TAA-AGT-TCG-TCGTCG-TCA-T,
TRAILR3-3' GGG-CAG-TGG-TGG-CAG-AGT-A,
TRAIL R3 Probe: 5'-6FAM-TCGCGGTCCTGCTGCCAGTCCTAGC-TAMRA 3';
TRAILR4-5' ACA-GAG-GCG-CAG-CCT-CAA,
TRAILR4-3' ACG-GGT-TAC-AGG-CTCCAG-TAT-ATT,

TRAIL R4 Probe: 5' 6FAMAGGAGGAGTGTCCAGCAGGATCTCATAGATC-TAMRA 3'.

TaqMan PCR reaksiyonu, yukarıda belirtilen primer ve probler kullanılarak, aşağıda belirtilen şartlarda Applied Biosystems marka Gerçek Zamanlı RT-PCR cihazı ile gerçekleştirildi:

- 1) 50°C'de 2 dakika (1 döngü)
- 2) 95°C'de 10 dakika (1 döngü)
- 3) 95°C'de 15 saniye + 60°C 1 dakika (40 döngü)

Analiz aşamasında kullanılacak standart eğrinin oluşturulması için, ribozomal RNA'dan türeyen klonlanmış cDNA fragmenti kullanıldı. TRAIL reseptörlerinin oranları, $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanılarak hesaplandı.

3.7. Anneksin V Boyama

Kullanılan Solusyonlar:

1M NaCl (Riedel-de Haen) :

5,844 g NaCl tartılarak, steril dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.

1M CaCl₂ (Sigma):

14,702 g CaCl₂ tartılarak, steril dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.

HEPES (Amresco):

26,030 g HEPES tartılarak, steril dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.

Anneksin V Bağlanma Tamponu:

Stok solusyonlardan 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, ve 10 mM HEPES, 100 ml steril dH₂O içinde karıştırılarak hazırlandı. +4°C'de saklandı.

Propidium Iodide (PI) (Sigma):

1 mg/ml stok solusyondan 20 µl alınıp 980 µl 1XPBS içinde çözülerek son konsantrasyonu 20 µg/ml olacak şekilde hazırlandı. +4°C'de saklandı.

Apoptozis olarak bilinen programlı hücre ölümü, bir dizi hücrel morfolojik değişiklik ile karakterizedir. Apoptozisin en erken işaretlerinden biri, plazma membranında meydana gelen değişikliklerdir. Apoptozis süreci sırasında, bir membran fosfolipidi olan fosfatidilserin (FS), plazma membranının iç kısmından dış kısmına dönerek dış ortama sunulur. Anneksin V, Ca²⁺ bağımlı bir fosfolipid bağlayıcı proteindir (35-36 kDa). FS için yüksek afinitesi olması nedeniyle, hücre yüzeyinde FS sunulan erken apoptotik hücrelere bağlanır. FS translokasyonu apoptozisin erken evrelerinde gerçekleştiğinden, Anneksin V boyama, DNA fragmentasyonu gibi daha geç evrede gerçekleşen değişikliklere dayalı olan deneylere göre apoptozisi daha erken bir evrede belirleyebilir. Çalışmamızda, insan Anneksin V proteinine karşı FITC takılı fare monoklonal antikoru (Alexis Biochemicals) kullanıldı. Ölü hücrelerin erken apoptotik hücrelerden ayırt edilebilmesi için, sadece ölü hücreleri boyayan PI boyası kullanıldı. Anneksin V bağlanması ve PI boyama, akış sitometrisi ile izlendi ve apoptotik hücrelerin oranları yazılım programı yardımıyla belirlendi.

Bunun için, daha önce uygun vektörlerle enfekte edilmiş hücreler tripsinizasyon ile kaldırılıp 14 ml'lik Falkon tüplerine toplandı ve 1XPBS ile yıkandı. 1600 rpm'de 5 dakika santrifüj gerçekleştirildi. Çökelti üzerine 195 µl Anneksin V bağlanma tamponu ve 5 µl Anneksin V-FITC monoklonal antikoru kondu. 15 dakika karanlıkta inkübasyon sonrası yine 1600 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve çökelti 190 µl anneksin V bağlanma tamponunda çözüldü. Akış sitometrisi ile analiz öncesi 20 µg/ml PI boyası eklendi ve analiz gerçekleştirildi.

3.8. Akış Sitometrisi

Kullanılan Solusyonlar:

1X Akış Sitometri Tamponu:

0,18 g Na Azid (Sigma), 0,5 g Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma), 0,18 g Na Bikarbonat (Sigma) tartılarak 500 ml 1XPBS'te çözüldü. +4°C'de saklandı.

İleri evre prostat kanser hücreleri, 24 kuyucuklu doku kültürü kaplarına, ortalama $2,5 \times 10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Bu hücreler ertesi gün AdEGFP reporter vektörü ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 48 saat sonra hücreler tripsinize edildi ve santrifügasyon sonrası 1XPBS'te sulandırıldı. BD FACSCALIBUR cihazı ile akış sitometrisi analizi gerçekleştirildi. Yüzeydeki TRAIL reseptör proteinlerinin sentezini belirlemek için, her bir TRAIL reseptör alt tipi için spesifik olan, işaretlenmemiş monoklonal antikoları içeren anti-TRAIL reseptör akış sitometrisi seti (Cat. ALX-850-273-KI01) kullanıldı. Setin içinde, 100'er µg TRAIL-R1 (clone HS101, Cat. 804-297A), -R2 (clone HS201, Cat. 804-298A), -R3 (clone HS301, Cat. 804-344A) ve -R4 (clone HS402, Cat. 804-299A) bulunuyordu. Saflaştırılmış fare IgG1 (MOPC 31C, Cat. ANC-278-010), izotip kontrol olarak kullanıldı. Deneysel aşamalarda, hücreler 35 mm'lik doku kültürü kaplarında, ortalama $1-1,5 \times 10^6$ konsantrasyonda olacak şekilde üretildi. Hücreler doku kültürü kabının yüzeyini %80 civarında kapladığında, tripsinizasyon ile kaldırıldı ve hücre sayımı sonrasında 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücreler akış sitometri tüplerine, 100 µl'de 1×10^6 hücre olacak şekilde 100'er µl dağıtıldı. Bir tüp boya almayan kontrol, bir tüp izotip kontrol, ve 4 tüp TRAIL reseptörleri için ayrıldı. 5 µg/ml konsantrasyonda kullanılan primer antikolar ile hücreler buz üzerinde 30 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonrası hücreler üzerine 2'şer ml Akış Sitometri Tamponu eklendi ve 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj aşaması, her antikor inkübasyonu sonrası gerçekleştirildi. Hücreler biotin bağlı anti-fare IgG1 (Cat. ALX-211-202) sekonder antikoru ile 30 dakika, ve sonrasında Streptavidin-PE (Cat. ANC-253-050) ile 20 dakika inkübe edildi. Antikor bağlanma oranları, akış sitometrisi ile analiz edildi.

3.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için, GraphPad Software'den (San Diego, CA) Prism programı kullanıldı. Her bir deney için istatistiksel sonuçlar, şekil açıklamalarında verilmiştir.

BULGULAR

4.1. Prostat Kanseri Hücrelerinde Bazal NF-kB Aktivasyon Seviyeleri Farklı Bulundu.

Tümör hücrelerinin apoptozise duyarlılığını etkileyen en önemli faktörlerden birinin hücre içi sürekli NF-kB aktivasyonu olduğu ileri sürülmüştü [128, 155-157]. Bundan yola çıkılarak, çalışmamızda kullanılan üç farklı prostat kanser hücre hattının (DU145, PC3, LNCaP) bazal NF-kB aktivasyon seviyeleri belirlendi. Bu amaçla, hücreler NF-kB Lusiferaz Reporter Geni (AdNF-kBLuc) içeren bir rekombinant adenovirus ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 24 saat sonra, Reporter Lizis Tamponlu Lusiferaz Deney Sistemi kullanılarak NF-kB Transkripsiyon Aktivasyon Deneyleri gerçekleştirildi. Deneyler sonucunda en yüksek bazal NF-kB aktivasyon seviyesinin DU145 hücrelerinde olduğu görüldü (Şekil 4.1). İkinci en yüksek seviye PC3 hücrelerinde görülürken, en düşük seviye LNCaP hücrelerinde görüldü. Enfeksiyondan 48 saat sonra gerçekleştirilen lusiferaz deneylerinde, çok daha yüksek oranda NF-kB aktivasyonu belirlenmesine rağmen, hücreler arasındaki NF-kB aktivasyon seviyesi sıralaması değişmedi. Sonuçlarımız, DU145, PC3, ve LNCaP hücre hatlarında hücre içi sürekli NF-kB aktivasyon seviyelerinin farklı olduğunu gösterdi.

4.2. Prostat Kanseri Hücreleri, Adenoviral Vektörler Tarafından Eşit Olarak Transdüksiyona Uğratıldı.

Çalışmamızın ilk basamağında prostat kanser hücrelerinde bazal NF-kB aktivasyon seviyelerinin farklı olduğu gösterilmişti. Gözlenen bu farklılıkların hücrelerin adenoviruslar tarafından farklı transdüksiyonuna bağlı olma ihtimalini ortadan kaldırmak için, hücrelerin adenoviral vektörlerle transdüksiyon etkinliğine bakıldı. Hücreler, Enhanced Green Fluorescent Proteini (EGFP) kodlayan adenovirüslerle artan dozlarda enfekte edildi. Enfeksiyondan 48 saat sonra, EGFP pozitif hücrelerin yüzdesi floresan mikroskopi ile belirlendi (Şekil 4.2). Akış sitometrisi analizi sonucu, her üç prostat kanseri hücre hattında da eşit seviyede viral transdüksiyon görüldü (Şekil 4.3). Bu deneyle aynı zamanda prostat kanser hücrelerinin adenoviral vektörlerle etkin transdüksiyonu için gerekli optimum enfeksiyon dozu da belirlendi. 5000 DNA partikülü/hücre MOI (Multiplicity of Infection), hücrelerin %90'ının transdüksiyona uğratılması için yeterli oldu. 10000 DNA partikülü/hücre dozda ise, hücrelerin hemen hemen %100'ü enfekte oldu. Bu sonuçlar, her üç hücre hattının da adenovirüslerle eşit oranda ve etkin bir şekilde transdüksiyona uğratıldığını gösterdi. Dolayısıyla, prostat kanser hücrelerinde bazal NF-kB aktivasyon seviyelerinin farklı bulunmasının, hücrelerin adenovirüsler tarafından farklı transdüksiyonuna bağlı olmadığı görüldü.

4.3. Prostat Kanseri Hücreleri Değişken Derecede Adenovirüs Aracılı TRAIL Sitotoksitesini Gösterdi.

Prostat kanser hücreleri, TRAIL proteinini kodlayan Ad5hTRAIL veya kontrol olarak AdCMVLacZ vektörleri ile artan dozlarda enfekte edildi. Enfeksiyondan 48 saat sonra, hücre canlılık deneyleri gerçekleştirildi. Flöresan mikroskopi ile analiz sonucu, prostat kanser hücreleri arasında LNCaP ve DU145'in, hücre başına 10000 Ad5hTRAIL vektörü verildiğinde dahi ölmedikleri belirlendi (Şekil 4.4). AdCMVLacZ enfeksiyonundan sonra da hücre ölümü gözlenmedi (Şekil 4.5). Öte yandan, PC3 hücrelerinde, 5000 DNA partikülü/hücre MOI Ad5hTRAIL virüsü ile enfeksiyon sonucu %63 oranında hücre ölümü gözlemlendi. Viral vektör dozu 10000 DNA partikülü/hücre MOI'a çıkarıldığında ise, %90 oranında hücre ölümü gözlemlendi (Şekil 4.5). Bu sonuçlara göre, DU145 ve LNCaP hücre hatları TRAIL'a yüksek derece dirençli bulundu. PC3 hücre hattı, DU145 ve LNCaP hücrelerine oranla önemli seviyede TRAIL duyarlılığı gösterdi.

4.4. Prostat Kanseri Hücrelerinde Hücre içi NF-kB Aktivitesi, hTRAIL Sentezi ile Artarken, IKK β KA Sentezi ile Azaldı.

TRAIL yalancı reseptörü TRAIL-R4'ün ve TRAIL ölüm reseptörlerinin (TRAIL R1 ve TRAIL-R2), NF-kB yollarını aktive ettiği daha önce gösterilmişti [121, 122]. Bu nedenle, hem TRAIL ile indüklenen NF-kB aktivasyonu, hem de hücrenin endojen NF-kB durumu, prostat kanserinin TRAIL aracılı tedavisinde dikkate alınması gereken önemli faktörlerdendir. Çalışmamızda, prostat kanser hücrelerinde TRAIL sentezi ile aktive olan NFkB aktivitesi araştırıldı. Bu amaçla, DU145, PC3 ve LNCaP hücreleri AdNF-kBLuc ve Ad5hTRAIL vektörleri birlikte kullanılarak enfekte edildi. Hücre ölümünün en az seviyede tutulabilmesi için, hücre başına verilen Ad5hTRAIL dozu 1000 MOI'da sabit tutuldu. Enfeksiyondan 24 saat sonra NFkB transkripsiyon aktivasyon deneyleri yapıldı. Sonuçta NFkB aktivitesinin, sadece TRAIL'ın sentezinin arttığı hücrelerde yükseldiği görüldü (Şekil 4.6). IKK inhibe edici strateji aracılığıyla NFkB inhibisyonunun derecesini görebilmek amacıyla, prostat kanser hücre hatları AdIKK β KA vektörünün artan dozları ile ve ayrıca AdNF-kBLuc ve Ad5hTRAIL vektörleri ile birlikte enfekte edildi. TRAIL ile indüklenen NFkB aktivitesinin her üç hücre hattında da azaldığı, hatta endojen NF-kB aktivitesinin de altına düştüğü belirlendi (Şekil 4.6, A-C Panelleri). Öte yandan, hücreler kontrol olarak AdCMVLacZ virüsü ile enfekte edildiğinde benzer bir NFkB inhibe edici etki gözlenmedi. Sonuç olarak, prostat kanser hücrelerinde TRAIL sentezinin artışı, hücre içi NF-kB aktivasyon seviyelerinde artışa yol açtı. Bunun yanında IKK inhibe edici strateji, prostat kanser hücre hatlarında hem TRAIL aracılığıyla indüklenen NF-kB aktivitesini, hem de endojen NF-kB aktivitesini düşürücü etki gösterdi.

4.5. IKK β KA Sentezi Yoluyla Fonksiyonel IKK İnhibisyonu, Prostat Kanseri Hücrelerini TRAIL Aracılı Hücre Ölümüne Karşı Duyarlı Hale Getirdi.

IKK β 'nın (AdIKK β KA) [128, 157] veya Ikb α 'nın (AdIkb α SR) [152] dominant negatif mutantlarını kodlayan adenovirüslerle enfeksiyonun, akciğer kanser hücre hatlarını TNF ölüm ligandına karşı duyarlılaştırmada başarılı olduğu daha önce gösterilmişti. Bazı kanser hücrelerinde daha yüksek bazal NFkB aktivitesi olduğundan, NFkB bloke edici ajanlar, bu hücreleri TRAIL'ın apoptozisi indükleyici

etkilerine karşı duyarlılaştırmada etkin bir strateji olabilir. Prostat kanser hücre hatlarında IKK inhibisyonunun TRAIL'a dirençliliğe karşı etkisini araştırmak amacıyla, bu hücre hatları hem Ad5hTRAIL vektörünün 5000 MOI sabit dozu ile, hem de AdIKK β KA virüsünün artan dozları ile enfekte edildi. Deney sonucunda, her üç hücre hattının da, hücrenin başlangıçtaki endojen NF κ B aktivasyonuna bağlı olmaksızın TRAIL'a duyarlı hale geldiği görüldü (Şekil 4.7). DU145 ve LNCaP hücrelerinde, TRAIL sentezi varlığında hücre başına 1000 MOI AdIKK β KA vektörü verildiğinde dahi %50 civarında hücre ölümü gözlemlendi. PC3 hücreleri TRAIL'a zaten duyarlı olduğundan, DU145 ve LNCaP hücrelerinin IKK β KA ile enfeksiyonu sonucu TRAIL'a duyarlılaşma derecesi, PC3 hücrelerine oranla çok daha fazla idi (Şekil 4.8). Öte yandan, prostat kanser hücreleri AdIKK β KA yerine AdCMVLacZ virüsü ile enfekte edildiğinde, hücre ölümü gözlemlenmedi. Bu sonuçlar, IKK inhibisyonu yoluyla NF κ B'nin bloke edilmesinin, TRAIL dirençliliği gösteren prostat kanser hücrelerini TRAIL'a duyarlı hale getirmede etkin olduğunu göstermektedir.

4.6. Prostat Kanser Hücrelerinin Yalnızca AdIKK β KA Vektörleri ile Enfeksiyonu Hücre Ölümüne Yol Açmadı.

Daha önceki çalışmalarda, prostat kanser hücre hatlarında gözlenen yüksek NF- κ B aktivitesinin, IKK aktivitesindeki bir artıştan kaynaklandığı öne sürülmüştü [149]. Bu nedenle, bu çalışmada IKK aktivitesi inhibisyonunun, tek başına prostat kanser hücrelerinin canlılık oranı üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla, prostat kanser hücreleri, IKK β 'nın dominant negatif mutantını kodlayan adenoviral vektörlerin (AdIKK β KA) artan dozlarıyla enfekte edildi. Enfeksiyondan 48 saat sonra, hücre canlılık oranları floresan mikroskop altında belirlendi. PC3 hücrelerinde gözlenen TRAIL sitotoksitesinin tersine, prostat kanser hücre hatlarının hiçbirinde, hücre başına 10000 AdIKK β KA virüsü verildiğinde dahi, hücre canlılık seviyesinde azalma görülmedi (Şekil 4.9). Bu sonuçlar, prostat kanser hücrelerinin AdIKK β KA virüsleri ile tek başına enfeksiyonu sonucunda önemli derecede hücre ölümü gerçekleşmediğini gösterdi.

4.7. Ad5hTRAIL ve AdIKK β KA'nın Birlikte Enfeksiyonu Sonucu, Prostat Kanser Hücre Hatlarında Apoptotik Ölüm Gerçekleşti.

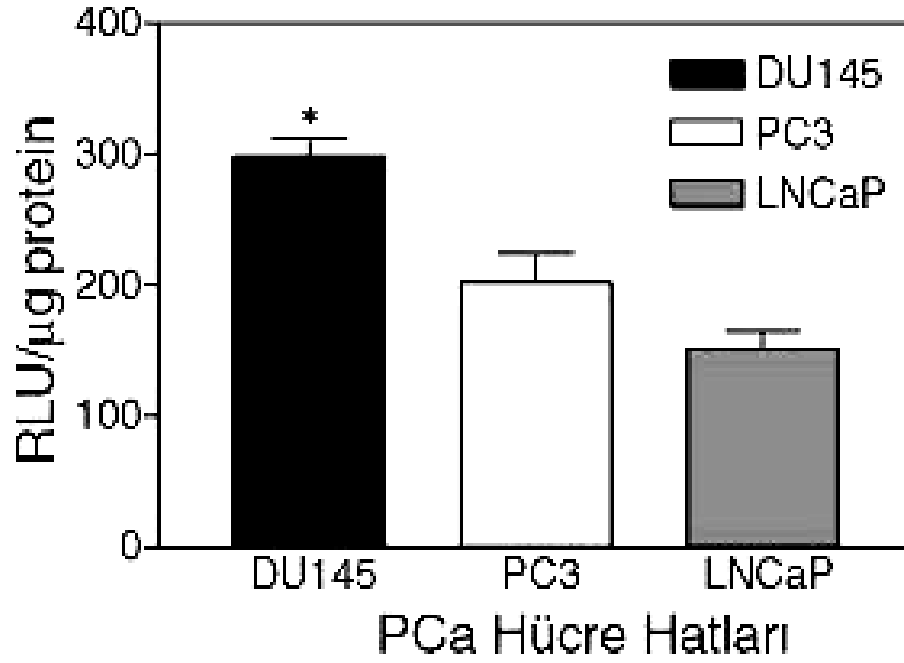
Prostat kanser hücrelerinde IKK inhibisyonu altında TRAIL'ın indüklediği hücre ölümünün moleküler mekanizmasının açığa çıkarılması için, DU145 hücrelerinde Anneksin V boyama yoluyla apoptotik ölüm oranı ölçüldü. Bu amaçla, Ad5hTRAIL ve AdIKK β KA vektörleri ayrı olarak ya da birarada DU145 hücrelerine enfekte edildi. Enfeksiyondan 35 saat sonra Anneksin V bağlanma deneyleri gerçekleştirildi, ve bağlanma oranları akış sitometrisi ile analiz edildi. Sonuçta Ad5hTRAIL veya AdIKK β KA enfeksiyonu tek başına önemli derecede Anneksin V bağlanma göstermedi. Ancak, hücreler Ad5hTRAIL ve AdIKK β KA ile birlikte enfekte edildiğinde, önemli seviyede Anneksin V bağlanması görüldü (Şekil 4.10). Bu durum, AdIKK β KA aracılığıyla IKK inhibisyonu sonucu prostat kanser hücrelerinin apoptotik yollu hücre ölümüne gittiğinin göstergesidir. Öte yandan, Ad5hTRAIL ile birlikte AdCMVLacZ enfeksiyonu önemli seviyede Anneksin V bağlanma seviyesi göstermedi. Böylece, IKK inhibisyonu yokluğunda DU145

hücrelerinin TRAIL'a oldukça dirençli olduğu görüldü. Tüm bu sonuçlar, IKK inhibisyonu altında TRAIL'ın indüklediği hücre ölüm mekanizmasının apoptozis olduğunu gösterdi.

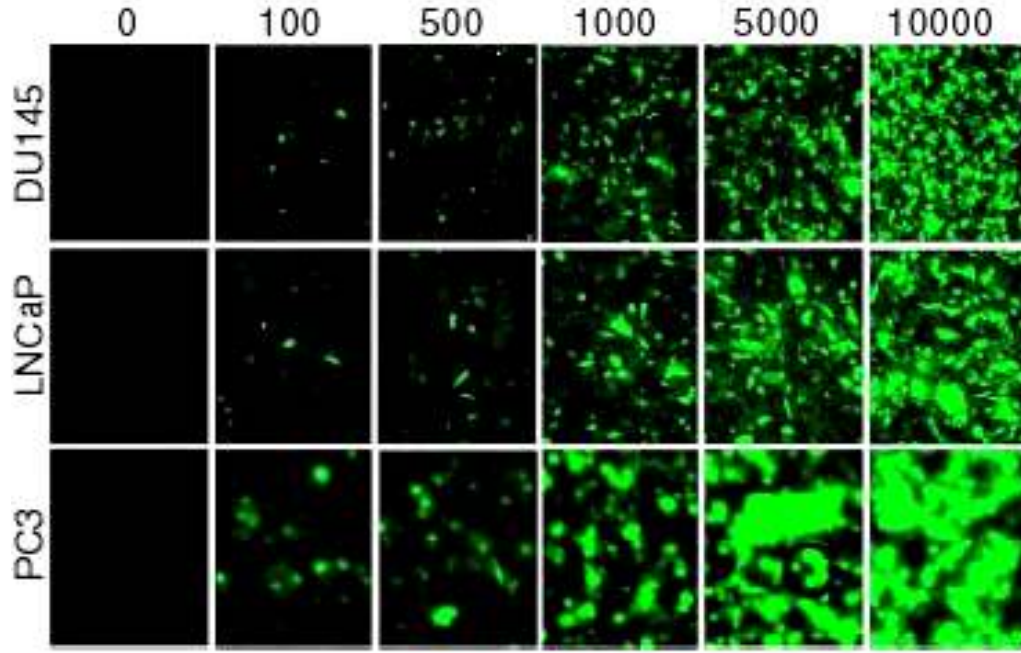
4.8. Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Birbirinden Farklı TRAIL Reseptör Kompozisyonları Belirlendi.

Prostat kanser hücre hatlarında TRAIL reseptörlerinin sentez profillerinin belirlenmesi için, spesifik primer ve prob setleri kullanılarak Gerçek Zamanlı RT-PCR deneyi gerçekleştirildi. Deneyler sonucunda, çalışılan tüm hücre hatlarında TRAIL-R2 sentez düzeyi, TRAIL-R1 sentez seviyesinden oldukça yüksek bulundu. TRAIL'a duyarlı olan PC3 hücrelerinde, TRAIL'a dirençli olan DU145 ve LNCaP hücre hatlarına göre TRAIL-R2 sentez seviyesi daha yüksek bulundu (Şekil 4.11). PC3 hücrelerinde çok düşük seviyelerde TRAIL-R3 sentezi görülmesine rağmen, TRAIL-R4 sentezi gözlenmedi. Ayrıca, TRAIL'a dirençli DU145 ve LNCaP hücrelerinde, her iki yalancı reseptörün de (TRAIL-R3 ve TRAIL-R4) önemli seviyede sentez edildiği görüldü.

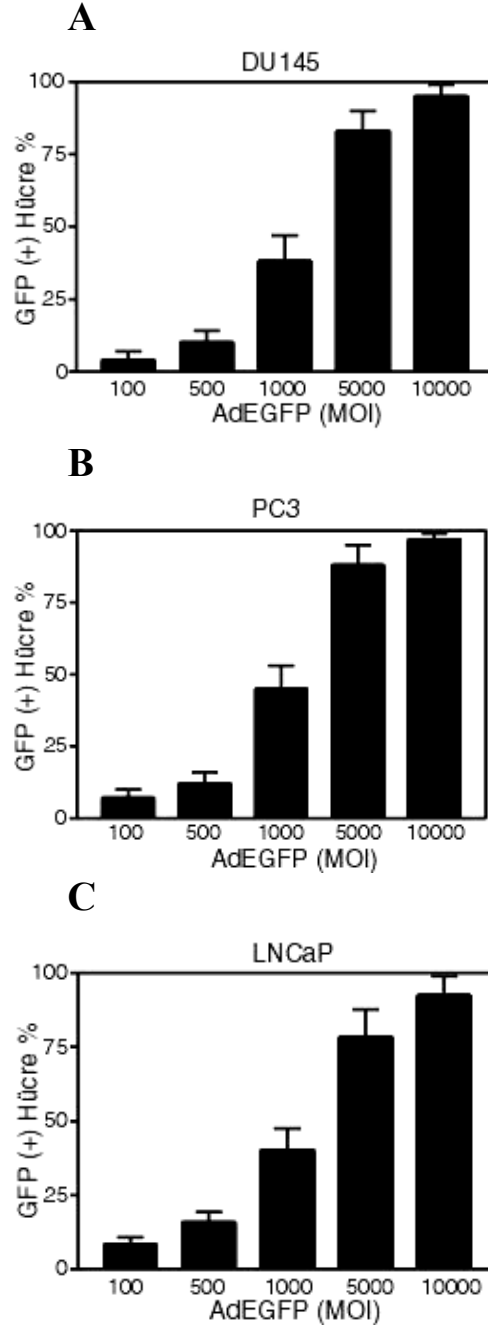
Gerçek Zamanlı RT-PCR, mRNA seviyesinde gen sentezinin miktar tayininde yararlı olmasına rağmen, hücre içindeki gen sentezi, protein bazında hücre yüzeyindeki reseptör sentezi ile mutlak uyumlu olmayabilir. Bu nedenle, prostat kanser hücrelerinin yüzeyinde hangi TRAIL reseptörlerinin sentez edildiği ve sentez seviyeleri akış sitometrisi aracılığıyla belirlendi. Analiz sonucunda, PC3 hücrelerinin yüzeyinde TRAIL ölüm reseptörlerinin (TRAIL-R1 ve TRAIL-R2) sentezi belirlendi, ancak ölçülebilir yalancı reseptör sentezi gözlenmedi (Şekil 4.12). DU145 (Şekil 4.12) ve LNCaP hücrelerinde (Şekil 4.13) her iki tip TRAIL ölüm reseptörünün de sentezinin olduğu, ancak PC3 hücrelerinin tersine, bu hücrelerde önemli miktarda TRAIL-R4 yalancı reseptör sentezi gerçekleştiği gözlemlendi. Ayrıca, LNCaP hücrelerinin yüzeyinde düşük seviyede TRAIL-R3 yalancı reseptör sentezi belirlenmesine rağmen, DU145 ve PC3 hücrelerinde böyle bir durum gözlenmedi. Sonuç olarak, TRAIL'a dirençli DU145 ve LNCaP hücre hatlarında TRAIL yalancı reseptör sentez seviyelerinin, TRAIL'a duyarlılık gösteren PC3 hücre hattına göre belirgin oranda yüksek olduğu görüldü.



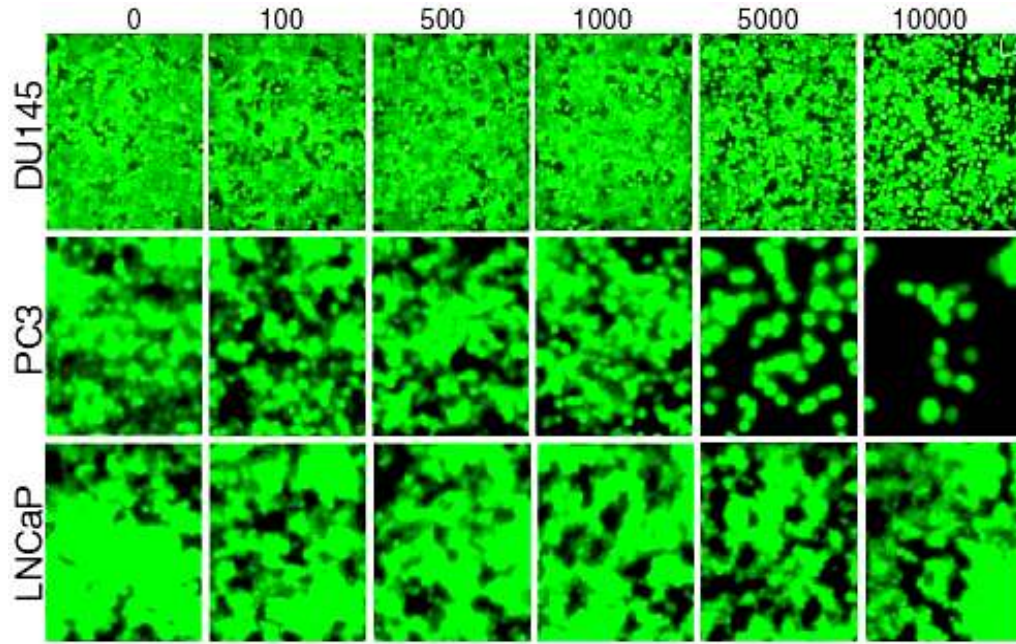
Şekil 4.1. Prostat kanser hücre hatlarında endojen NF-kB seviyeleri. Endojen NF-kB seviyeleri, AdNFkBLuc aktivasyonundan 24 saat sonra lusiferaz aktivitelerinin ölçülmesi ile belirlendi. Enfekte edilen hücre hatları, x ekseninde verilmiştir. Mikrogram protein başına düşen Rölatif Işık Birimi (RLU, Relative Light Units) olarak ifade edilen lusiferaz aktivitesi, y ekseninde verilmiştir. Veriler, altı bağımsız verinin ortalamasını ($\pm$ SEM) temsil etmektedir. ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak DU145 ile PC3 ve LNCaP hücreleri arasındaki istatistiksel farklılık belirlenmiştir. * $p < 0.01$



Şekil 4.2. Prostat karsinoma hücrelerinin birinci generasyon rekombinant adenoviral vektörler ile transdüksiyonu. Prostat kanser hücreleri EGFP reporter geni içeren adenovirüslerle enfekte edildikten 48 saat sonra viral transdüksiyon oranlarına bakıldı. Şekilde, adenoviral transdüksiyonların flöresan fotoğrafları görülmektedir. Enfeksiyonda kullanılan virüslerin MOI değerleri (DNA partikülü/hücre), resmin üst kısmında verilmiştir.

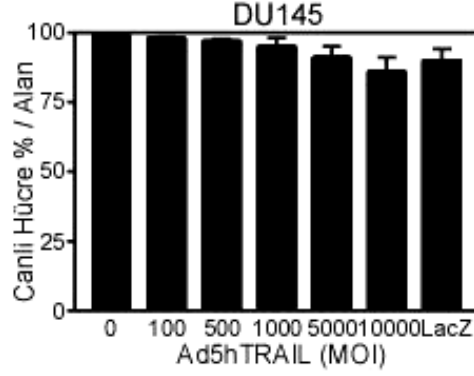


Şekil 4.3. Prostat kanser hücrelerinin adenoviral vektörlerle transdüksiyon etkinliklerinin akış sitometri ile değerlendirmesi. Panel A'da DU145 hücrelerinin, Panel B'de PC3 hücrelerinin, Panel C'de ise LNCaP hücrelerinin AdEGFP ile transdüksiyonlarının akış sitometrik analiz sonuçları gösterilmiştir.

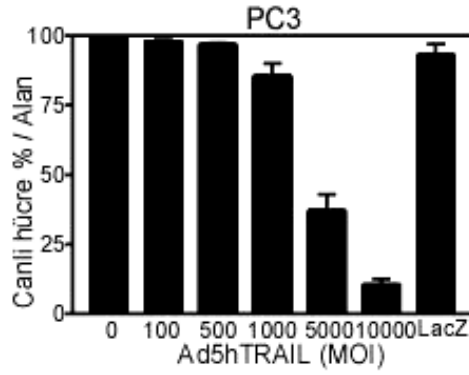


Şekil 4.4. Prostat kanser hücrelerinin TRAIL duyarlılık seviyeleri. DU145, PC3 ve LNCaP hücreleri, artan konsantrasyonlarda Ad5hTRAIL ve kontrol olarak AdCMVLacZ adenoviral vektörleri ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 48 saat sonra hücre canlılık deneyi gerçekleştirildi. Şekilde, Ad5hTRAIL ile enfeksiyon sonuçları görülmektedir. Fotoğraflar FITC kanalında çekilmiştir. Şeklin üst kısmında, uygulanan vektör dozları MOI olarak (DNA partikülü/hücre) verilmiştir.

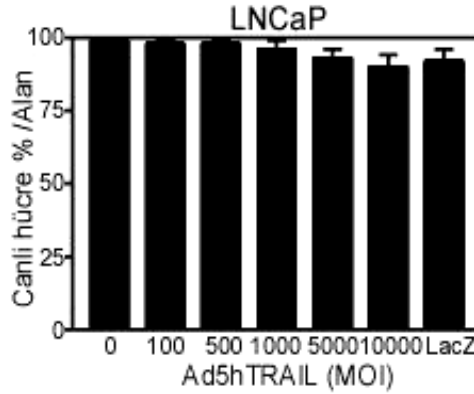
A



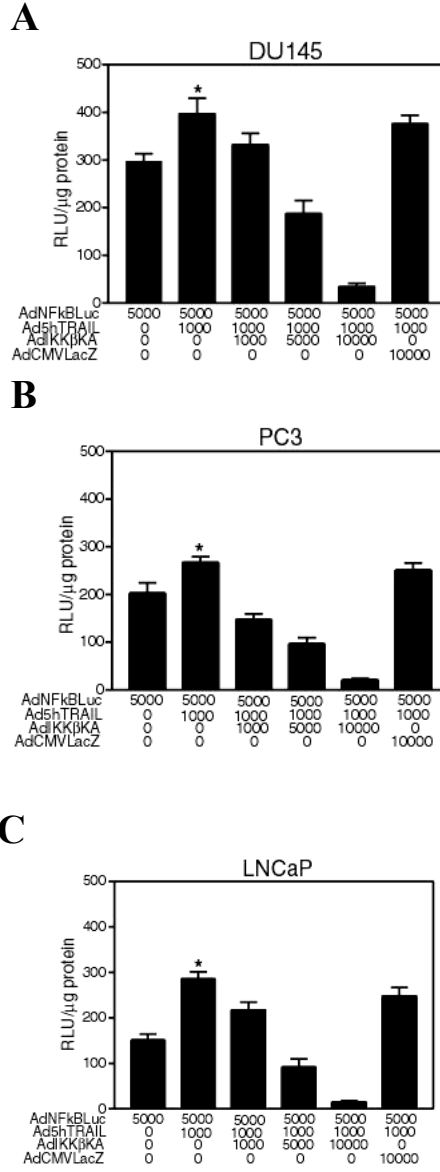
B



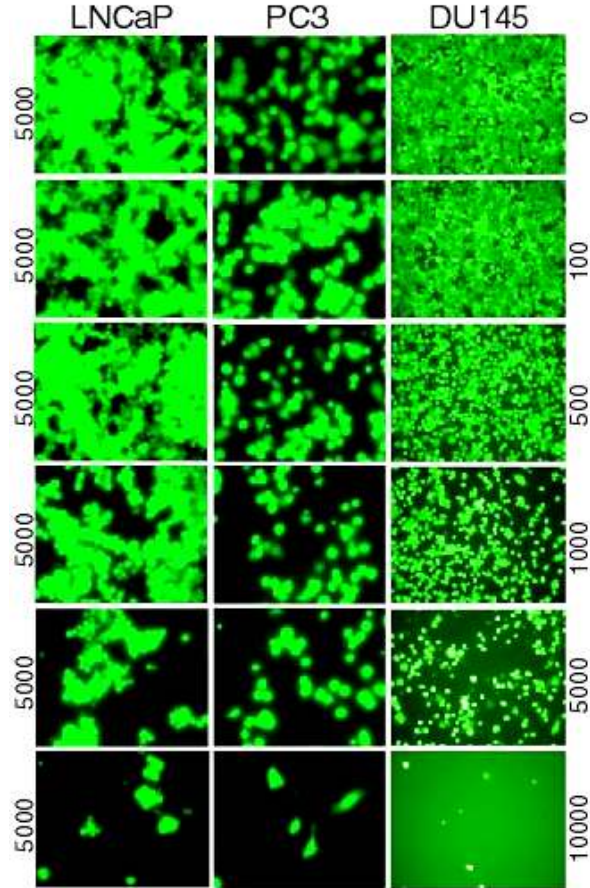
C



Şekil 4.5. Hücre canlılık deneylerinin kantitatif sonuçları. LacZ sütunu, 10000 DNA partikülü/hücre MOI konsantrasyonda AdCMVLacZ vektörü ile enfeksiyon sonuçlarını göstermektedir. Hücre canlılık deneyleri üçer set halinde gerçekleştirildi, ve ikişer kez tekrar edildi. Değerler, altı bağımsız verinin ortalamasını ($\pm$ S.E.M) temsil etmektedir.

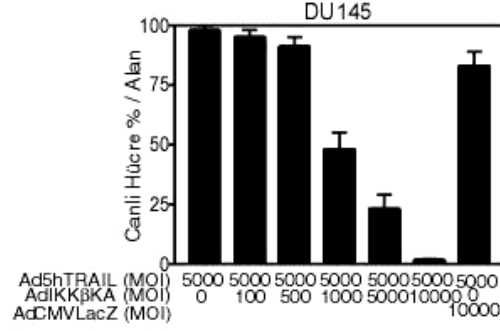


Şekil 4.6. Prostat kanser hücrelerinde hTRAIL ve IKKβKA sentezinin NF-κB aktivasyonu üzerine etkisi. DU145 (Panel A), PC3 (Panel B) ve LNCaP (Panel C) hücre hatları, AdNFκBLuc, Ad5hTRAIL, ve/veya AdIKKβKA'nın artan dozları ile enfekte edildi. Kontrol olarak AdCMVLacZ virüsleri kullanıldı. Enfeksiyondan 24 saat sonra hücrelerde NF-κB aktivitesine bakıldı. Kullanılan viral vektörler ve viral MOI değerleri (DNA partikülü/hücre), x ekseninde verilmiştir. y ekseninde lusiferaz aktivitesi (RLU/μg), gösterilmektedir. Değerler, altı bağımsız verinin ortalamasını (±S.E.M) temsil etmektedir. Hücrelerin AdNFκBLuc ile ve AdNFκBLuc ve Ad5hTRAIL ile enfeksiyon sonuçları arasındaki farklılıkların açığa çıkarılması için "student's t test" kullanılmıştır *p<0.05.

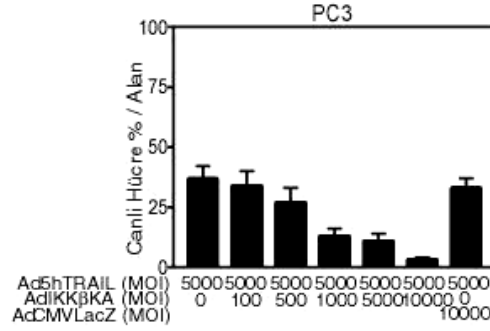


Şekil 4.7. Adenoviral vektörler yoluyla IKK β KA sentezinin, prostat kanser hücre hatlarında TRAIL dirençliliği üzerine etkisi. DU145, PC3 ve LNCaP hücre hatları, 5000 DNA partikülü/hücre sabit MOI'da Ad5hTRAIL ile birlikte, IKK β 'nın dominant negatif mutantını (AdIKK β KA) veya AdIKK β KA yerine kontrol olarak LacZ'yi (AdCMVLacZ) kodlayan adenoviral vektörlerinin artan dozları ile enfekte edildi. Şekilde, Ad5hTRAIL ve AdIKK β KA'nın birlikte kullanıldığı enfeksiyondan 48 saat sonra gerçekleştirilen hücre canlılık deneyi sonuçları görülmektedir.

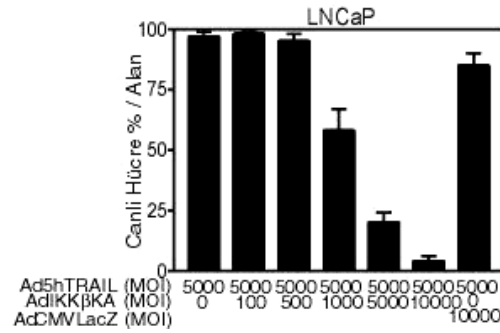
A



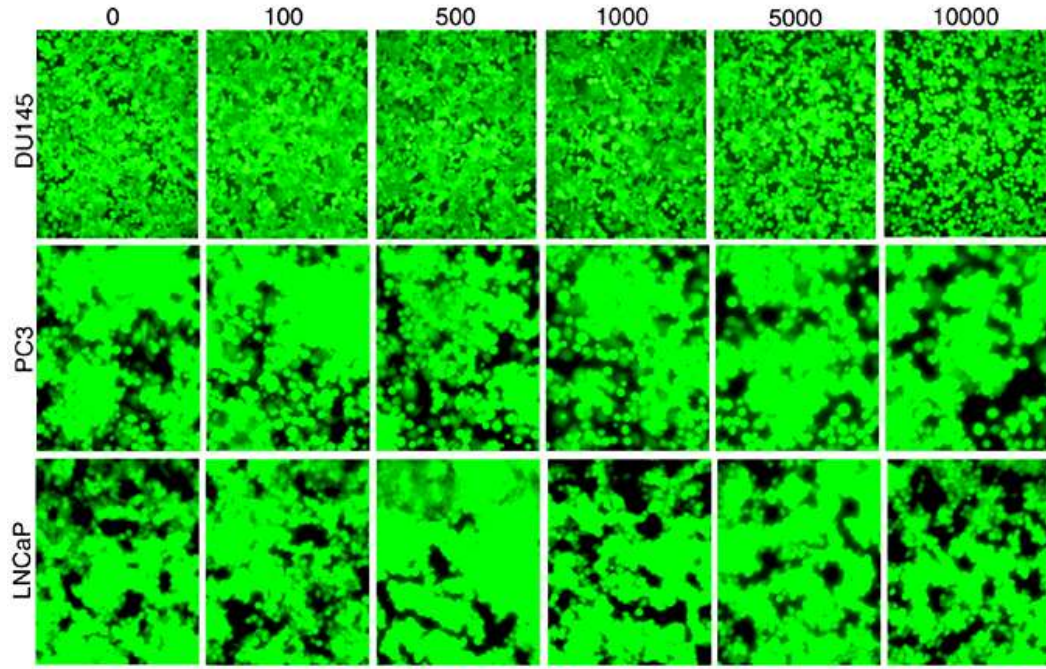
B



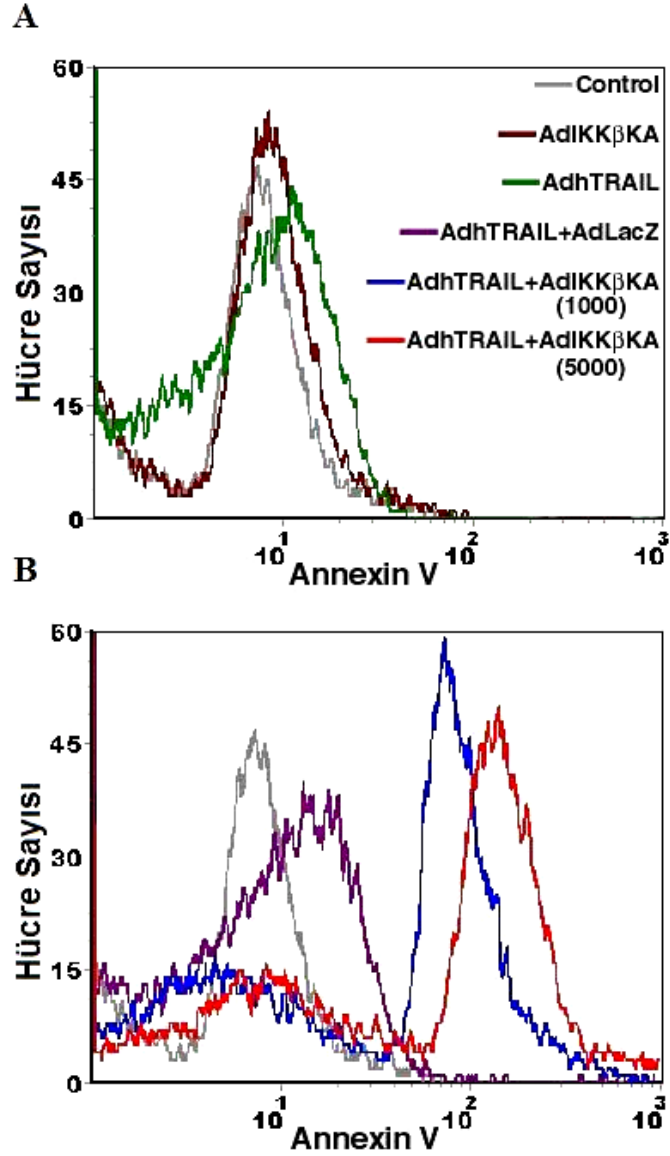
C



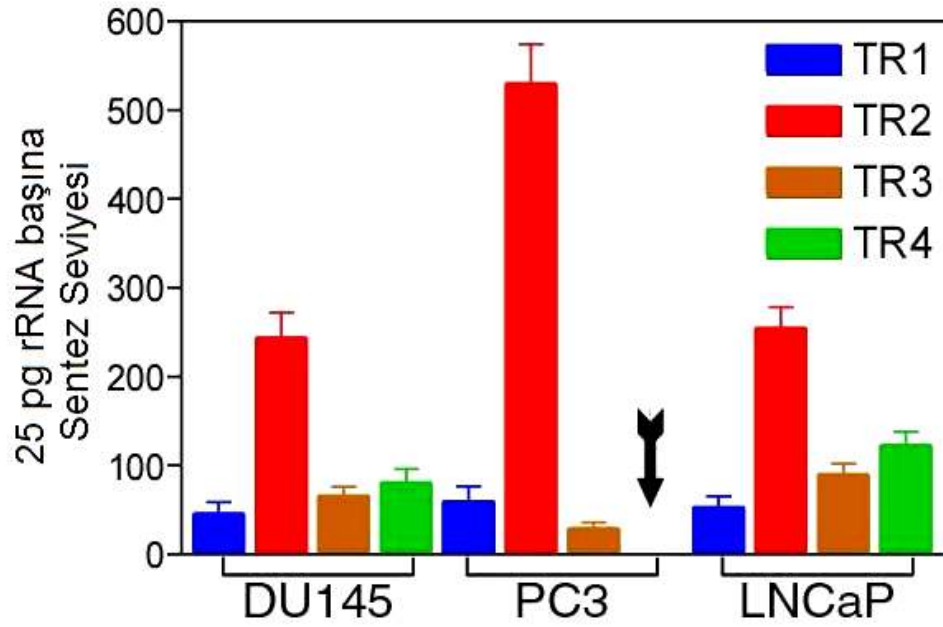
Şekil 4.8. IKKβKA sentezinin TRAIL dirençliliği üzerine etkisinin kantitatif olarak değerlendirilmesi. DU145, PC3 ve LNCaP hücreleri, Ad5hTRAIL ile birlikte AdIKKβKA ile, veya kontrol olarak AdIKKβKA yerine AdCMVLacZ adenoviral vektörleri ile enfekte edildikten 48 saat sonra canlı hücre oranına bakıldı. Şekilde, floresan mikroskop altında 20x büyütmede canlı hücre sayımı sonuçları görülmektedir. Uygulanan viral dozlar, x ekseninde MOI olarak (DNA partikülü/hücre) verilmiştir. Değerler, altı bağımsız verinin ortalamasını ($\pm$ S.E.M) temsil etmektedir.



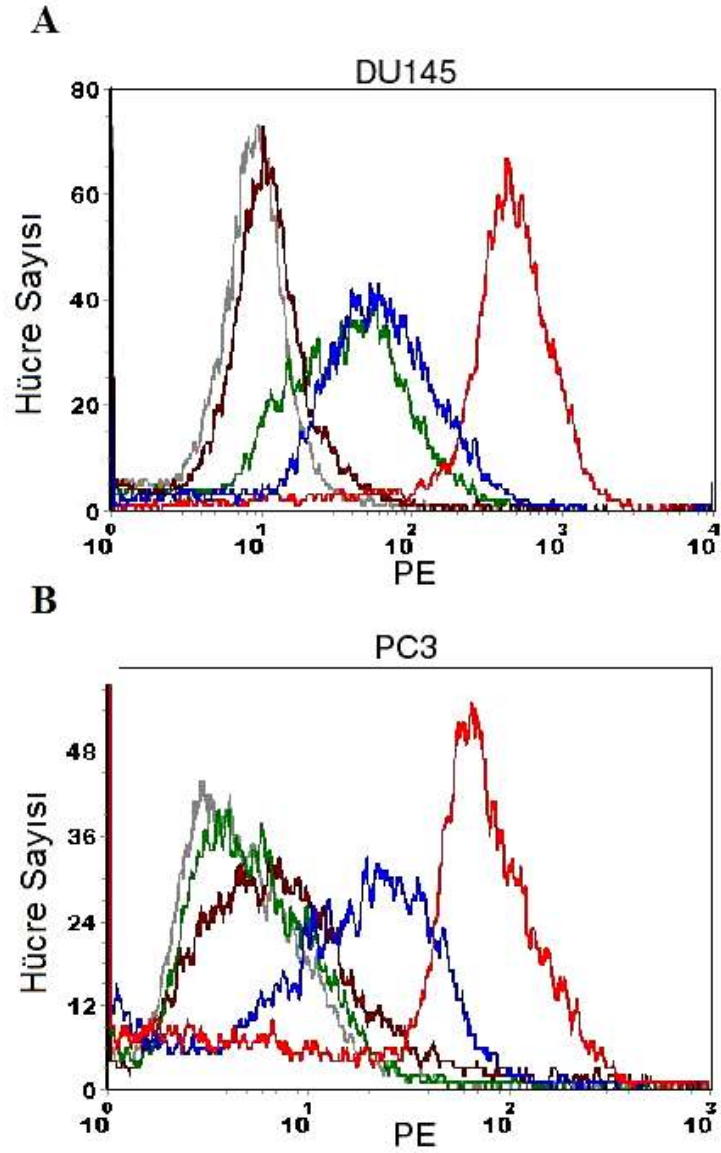
Şekil 4.9. Tek başına AdIKK β KA enfeksiyonunun prostat kanser hücreleri üzerindeki etkisi. Prostat kanser hücre hatları, artan dozlarda AdIKK β KA veya kontrol olarak AdCMVLacZ adenoviral vektörleri ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 48 saat sonra hücre canlılık deneyi yapıldı. Flöresan fotoğrafların üst kısmında, kullanılan viral dozlar MOI olarak (DNA partikülü/hücre) verilmiştir. Deneyler, üçlü setler halinde ikişer kez tekrar edilmiştir.



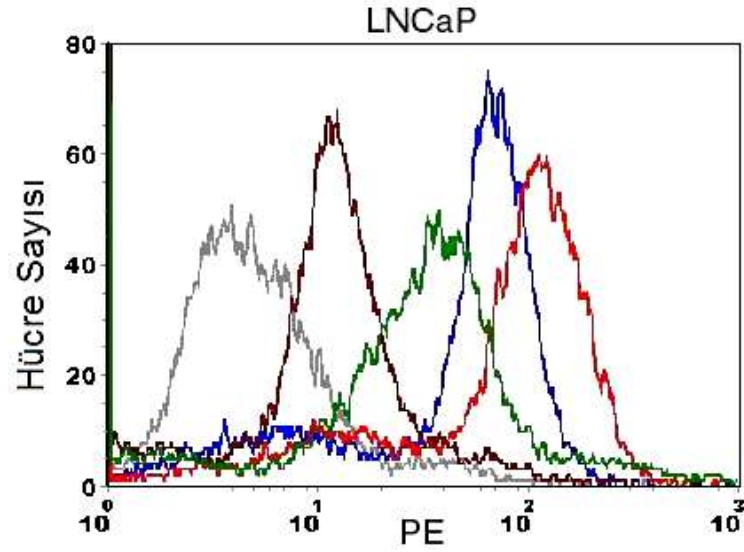
Şekil 4.10. DU145 prostat kanser hücre hattında TRAIL ve IKK β KA aracılı apoptozisin gösterilmesi. DU145 hücreleri, Ad5hTRAIL, AdIKK β KA, ve negatif kontrol olarak AdCMVLacZ virüsleri ile belirtilen şekillerde enfekte edildi. Şekilde aksi belirtilmedikçe viral vektörler 5000 DNA partikülü/hücre MOI'da kullanılmıştır. Enfekte edilen DU145 hücreleri, FITC ile konjuge Anneksin V ve Propidium Iodide (PI) ile boyandı, ve akış sitometrisi ile analiz edildi. Enfekte edilmeyen ancak FITC-Anneksin V ve PI boyalı hücreler kontrol olarak kullanıldı. Her bir histogramda, 10^4 DU145 hücresi analize dahil edilmiştir. Histogramlar, açıklık amacıyla iki panel halinde gösterilmiştir. Uygulama şartları, Panel A'da gösterilmiştir. Anneksin V bağlanma deneyi, üç kez tekrar edilmiştir.



Şekil 4.11. Prostat karsinoma hücre hatlarında TRAIL reseptör mRNA düzeyleri. Prostat kanser hücrelerinde TRAIL reseptörlerinin sentez seviyelerini belirlemek için total RNA'dan kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR deneyleri gerçekleştirildi. Sentez oranlarının karşılaştırılması için standart eğri yaratmak amacıyla klonlanmış bir ribozomal cDNA fragmenti kullanıldı. Şekilde, 25 pg ribozomal cDNA'ya karşılık gelen TRAIL reseptör seviyeleri gösterilmektedir. Her TaqMan deneyine iç kontrol olarak ribozomal RNA primerleri ve probları eklenmiştir. Şekildeki ok, PC3 hücrelerinde TRAIL-R4 sentezinin yokluğuna işaret etmektedir.



Şekil 4.12. DU145 ve PC3 hücre yüzeylerinde TRAIL reseptörlerinin sentez seviyeleri. TRAIL reseptörlerinin DU145 (Panel A) ve PC3 hücre (Panel B) yüzeylerindeki sentez seviyeleri, her bir TRAIL reseptörü için spesifik monoklonal antikor kullanılarak belirlendi. Renkli çizgiler, deneysel parametreleri göstermektedir. Gri: İzotip spesifik kontrol, Mavi: TRAIL-R1, Kırmızı: TRAIL-R2, Kestane rengi: TRAIL-R3, Yeşil: TRAIL-R4. Her histogram için 10⁴ hücre analize dahil edilmiştir. Herbir deney üç kez tekrar edilmiştir.



Şekil 4.13. LNCaP hücre hattında TRAIL reseptörlerinin hücre yüzeyindeki sentez seviyeleri. LNCaP hücrelerinde TRAIL reseptörlerinin hücre yüzeyindeki sentez seviyeleri, her bir reseptör için spesifik monoklonal antikor kullanılarak belirlendi. Renkli çizgiler, deneysel parametreleri göstermektedir. Gri: İzotip spesifik kontrol, Mavi: TRAIL-R1, Kırmızı: TRAIL-R2, Kestane rengi: TRAIL-R3, Yeşil: TRAIL-R4. Her histogram için 10^4 hücre analize dahil edilmiştir. Herbir deney üç kez tekrar edilmiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Prostat kanseri, batı ülkelerinde erkekler arasında en yaygın olarak görülen kanserdir, ve erkeklerde kanser sebebiyle ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır [2]. İleri evre prostat kanserinin tedavisinde mevcut tedavi yöntemleri hastaların yaşam süresini uzatmada yeterli olmadığından, ölüm ligantlarının adenoviral yollarla prostat kanser hücrelerine aktarımı, mevcut yöntemleri tamamlayıcı bir tedavi metodu olarak düşünülmektedir [128]. TRAIL ölüm ligandı prostat kanserinin tedavisi için ümit verici bir moleküldür. Ancak bazı prostat kanser hücre hatlarının TRAIL'a dirençli olduğu gösterilmiştir. Bu dirençlilikten ise, hücrelerde belirlenen sürekli Akt kinaz aktivitesinin sorumlu olduğu bildirilmiştir [114]. Demarchi ve arkadaşları tarafından, NF-kB'nin Akt aracılığıyla aktivasyonunda I κ B Kinaz'ın (IKK) rol aldığı ileri sürülmüştür [159]. Ayrıca prostat kanser hücrelerinde yüksek IKK aktivitesinin sürekli NF-kB aktivasyonu ile sonuçlanabileceği bildirilmiştir [149]. Çalışmamızda, bu bulgular ışığında prostat kanser hücre hatlarının IKK β 'nın dominant negatif mutantını (AdIKK β KA) ve insan fonksiyonel TRAIL molekülünü kodlayan (Ad5hTRAIL) adenovirüslerle birlikte enfekte edilmesinin prostat kanser hücrelerini TRAIL'a duyarlı hale getirip getiremeyeceğini test etmek istedik. Hipotezimizin doğruluğunu araştırmak için, üç farklı ileri evre prostat kanser hücre hattı kullandık (DU145, PC3, LNCaP).

İleri evre prostat kanseri, tedavide en çok zorluk yaşanan hastalık evresidir. Bu evrede tümör hücrelerinin androjen bağımlılıklarını kaybetmeleri de, tedaviyi zorlaştırıcı önemli faktörlerdendir [60, 61]. Bu nedenle, mevcut tedavi yöntemlerini tamamlayıcı gen tedavi yaklaşımları geliştirmeyi amaçladığımız çalışmamızda, ileri evre prostat kanser hücre hatları kullanıldı. Bu hücrelerden DU145 ve PC3 androjen bağımsız, ve LNCaP androjen bağımlı hücre hatlarıdır. Androjen bağımlı ve bağımsız hücre hatlarının birarada kullanımı, androjen bağımlılık durumunun TRAIL dirençliliği ve TRAIL dirençliliğini kırma metodlarının etkinliği üzerindeki etkisine bakmamızı sağlamıştır. Bahsedilen durumlar arasında bir ilişki gözlenmemiştir.

NF-kB transkripsiyon faktörlerinin, farklı hücrelerde çoğunlukla apoptozisi bloke edici düzenleyici moleküller olarak rol aldıkları bilinmektedir. Prostat kanser hücrelerinde TRAIL dirençliliğinden sorumlu tutulan Akt kinaz enzimi, NF-kB transkripsiyon faktörünün regülatörüdür [160, 161]. Dolayısıyla Akt aktivasyonunda artış, prostat kanser hücrelerinde NF-kB aktivitesinde de artışa yol açmaktadır. Örneğin Oya M. ve arkadaşları, TRAIL'a dirençli renal karsinoma hücre hatlarında sürekli NF-kB aktivasyonu olduğunu göstermiş, ve NF-kB'nin, TRAIL dirençlilik mekanizması altında yatan anahtar molekül olduğunu bildirmiştir. Çalışmada, TRAIL'a duyarlı renal karsinoma hücre hatlarında NF-kB aktivasyonu düşük bulunurken, TRAIL'a dirençli renal karsinoma hücre hatlarında ise yüksek NF-kB aktivasyonu gösterilmiştir [155]. Bu nedenle çalışmamızda birinci basamak olarak, DU145, PC3, ve LNCaP prostat kanser hücre hatlarında TRAIL dirençliliğinden

sorumlu olabilecek endojen NF-kB aktivasyon düzeyleri NF-kB transkripsiyon aktivasyon deneyleri ile belirlendi (Şekil 4.1). Deneysel şartlarımızda, en yüksek endojen NF-kB aktivitesi DU145 hücrelerinde görülürken, bu hücreleri PC3 ve LNCaP hücre hatlarının izlediği görüldü. Hücreler arasında hücre içi sürekli NF-kB aktivasyon seviyeleri açısından farklılık bulunmasının yanında, her üç hücre hattında da yüksek NF-kB seviyesinin bulunması, TRAIL dirençliliği açısından önemli olabilir. Palayoor ve ark. ile Gasparian ve arkadaşları da, Mobility Shift deneyleri kullandıkları çalışmalarında bizim bulgularımızla uyumlu olarak PC3 ve DU145 hücrelerinde endojen NF-kB aktivitesini yüksek bulurken, LNCaP hücrelerinde NF-kB aktivasyonunun daha düşük olduğunu bildirmişlerdir [149, 162].

Çalışmamızın bir sonraki aşamasında, prostat kanser hücre hatları, TRAIL'a dirençlilikleri açısından incelendi. Hücre canlılık deneyleri sonucunda, DU145 ve LNCaP hücrelerinin Ad5hTRAIL ile indüklenen apoptozise dirençli olduğu, PC3 hücrelerinin ise önemli seviyede TRAIL duyarlılığı gösterdiği görüldü. Bizim bulgularımızın aksine, Nesterov ve arkadaşları, DU145 hücre hattının çözülebilir TRAIL'a yüksek oranda duyarlı olduğunu bildirmiştir [114]. Bu çalışmada PC3 hücre hattı da TRAIL'a yüksek oranda duyarlı bulunmuş, ancak başka bir çalışmada PC3 hücrelerinde orta derecede TRAIL duyarlılığı gözlenmiştir [163]. Bu çalışmada da çözülebilir TRAIL proteini kullanılmıştır. Nesterov ve arkadaşlarının çalışmasında LNCaP hücre hattının ise, bizim bulgularımızla uyumlu olarak TRAIL'a dirençli olduğu bulunmuştur. Bunun yanında, Voelkel-Johnson ve arkadaşları, çalışmalarında DU145 ve LNCaP hücrelerinin Ad-IRES-TRAIL ile indüklenen apoptozise duyarlı olduğunu göstermiştir [113]. Ayrıca, Beresford ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada PC3 hücrelerinin çözülebilir TRAIL'a dirençli olduğu bildirilmiştir [164]. Nesterov ve arkadaşları ile Thakkar ve arkadaşlarının çalışmaları ile bizim bulgularımız arasındaki farklılıkların, fonksiyonel çalışmalarda kullanılan farklı TRAIL formundan kaynaklandığı düşünülebilir. Bahsedilen her iki çalışmada da *in vitro* olarak saflaştırılmış çözülebilir TRAIL kullanılmıştır. Ayrıca kullanılan TRAIL moleküllerinin biri mayadan [114], diğeri de E.coli'den saflaştırılmıştır [163]. *In vitro* çalışmalarda kullanılan vektörlerin, *in vivo* çalışmalar için de uygun olması gerektiği açıktır. Ancak çözülebilir TRAIL proteininin kan dolaşımındaki yarı ömrü sınırlıdır. İntravenöz olarak verilen çözülebilir TRAIL proteinin büyük bir kısmı, 5 saat içinde atılmaktadır, dolayısıyla tümör oluşumunu engellemek için yüksek miktarlarda kullanılması gerekir. Voelkel-Johnson ve arkadaşları ile Beresford ve arkadaşlarının çalışmalarında elde edilen bulgularla bizim bulgularımız arasındaki farklılıkların ise, enfeksiyonda kullanılan virüsün fonksiyonel titresinden kaynaklandığı düşünülebilir.

Çalışmamızda, TRAIL'a dirençlilik gösteren DU145 ve LNCaP hücrelerinde gözlenen yüksek hücre içi NF-kB aktivasyonu, TRAIL dirençliliği ile uyumlu görülmektedir. Ancak TRAIL'a dirençli LNCaP'te hücre içi NF-kB aktivasyonu, DU145'a göre düşük bulunmuştur. PC3 hücreleri ise, LNCaP hücrelerine göre yüksek hücre içi NF-kB aktivasyonuna sahip olmasına rağmen çalışmamızda TRAIL'a önemli oranda duyarlılık göstermiştir. Bu bulgular, hücrelerde TRAIL dirençliliğinden tamamen hücre içi NF-kB aktivasyon seviyelerinin sorumlu

tutulamayacağını, bilinmeyen başka faktörlerin de bu dirençlilikte etkili olduğunu göstermektedir.

Önceki çalışmalarda, TRAIL'a dirençli tümör hücre hatlarında TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 ölüm reseptörlerinin ve TRAIL-R4 yalancı reseptör aktivasyonunun da NF-kB sinyal yolunu stimüle ederek hücre içi NF-kB aktivasyonunu artırabileceği bildirilmiştir [121, 122, 156]. TRAIL indüksiyonunun hem apoptotik hem de anti-apoptotik yolları aktive edebilmesi, TRAIL'ın da Tumor Necrosis Factor (TNF) gibi kendi apoptotik etkisini anti-apoptotik yolları indükleyerek nötralize ettiğine işaretir. Bu bulgular ışığında çalışmamızda TRAIL'ın indüklediği NF-kB aktivasyon seviyeleri araştırıldığında, hücrelere TRAIL aktarımının, her üç hücre hattında da endojen NF-kB aktivasyonunda artış meydana getirdiği görüldü (Şekil 4.6).

Son yıllarda, kanser hücrelerindeki apoptotik ligand dirençliliğini kırmak için, iyonize radyasyon ve kemoterapötik ajanların kullanımı gibi yöntemler üzerinde çalışılmıştır. Örneğin Mitsiades ve ark., multiple myeloma (MM) hücre hatlarının, TRAIL uygulaması öncesinde, TRAIL-R2 sentezini artıran Doxorubicin ile muamelesinin MM hücrelerinde TRAIL duyarlılığını önemli oranda artırdığını göstermiştir [165]. Ayrıca, genotoksik ajan etopozitin epitel hücre kökenli kanser hücre hatlarında TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 sentezini artırdığı, ve TRAIL'a duyarlılık sağladığı gösterilmiştir [142]. Bunun yanında, bir başka apoptotik ligand olan TNF tarafından indüklenen apoptozisin, NF-kB aktivasyonu ile engellenebileceği bildirilmiş, ve farklı stratejilerle bu dirençlilik kırılmaya çalışılmıştır. Örneğin akciğer kanser hücrelerinde adenovirüsler aracılığıyla IKK β KA [150, 151] veya I κ B α SR [158] aktarımı gibi NF-kB aktivitesini inhibe edici yaklaşımların etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmalarda, akciğer hücreleri başarılı bir şekilde TNF'e duyarlı hale getirilmiştir. Prostat kanser hücrelerinde sürekli hücre içi NF-kB aktivitesinden IKK aktivitesindeki artışın sorumlu olduğu bildirildiğinden [149], çalışmamızda IKK inhibisyonunu içeren bir gen tedavi yaklaşımı kullanarak prostat kanser hücrelerini TRAIL'a duyarlı hale getirebileceğimizi düşündük. Şekil 4.7'de görüldüğü gibi, TRAIL'a dirençli olan DU145 ve LNCaP hücre hatları, IKK β 'nın dominant negatif mutantını sentez eden bir NF-kB inhibe edici vektör (AdIKK β KA) ile birlikte enfekte edildiklerinde Ad5hTRAIL aracılı apoptozise duyarlı hale geldi. TRAIL'a orta derecede duyarlılık gösteren PC3 hücreleri ise, bahsedilen strateji ile TRAIL'a tam duyarlı hale geldi. Prostat kanser hücrelerinin AdIKK β KA virüsü ile tek başına enfeksiyonu ise hücre ölümüne yol açmadı (Şekil 4.9).

Önceleri yapılan çalışmalarda, TRAIL-R3 ve TRAIL-R4 yalancı reseptörlerine ait mRNA'larının çoğunlukla normal hücrelerde bulunduğu, ancak tümör hücrelerinde bulunmadığı bildirilmişti [117, 118]. Bu nedenle, TRAIL reseptörlerinin hücrelerde dağılımının, TRAIL aracılığıyla indüklenen apoptozisi regüle eden faktör olduğu düşünülmüştü. Bu hipotezle uyumlu olarak, endojen TRAIL-R4 yalancı reseptörleri olmayan melanoma hücrelerinde TRAIL-R4 sentezinin transfeksiyon deneyleri ile geri kazandırılmasının, hücreleri TRAIL'a duyarlı fenotipten TRAIL'a dirençli fenotipe geçirdiği gösterilmiştir [166]. Ancak, farklı orijinli kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalar, hücre yüzeyindeki yalancı reseptörlerin sentezinin

artması veya azalması ile TRAIL duyarlılığı arasında bir ilişki gösterememiştir. Örneğin insan melanoma hücre hatlarında TRAIL reseptör mRNA'larının seviyeleri araştırıldığında, TRAIL yalancı reseptörleri ile TRAIL'a dirençlilik ya da duyarlılık arasında bir ilişki gösterilememiştir [167]. Bunun yanında, melanoma, kolon karsinoma, meme adenokarsinoma, ve akciğer adenokarsinoma gibi tümör hücre hatlarında uygulanan regüler RT-PCR deneyleri, TRAIL dirençliliği ile TRAIL yalancı reseptör gen sentezleri arasında herhangi bir ilişki açığa çıkarmamıştır [97]. Çalışmamızda, TRAIL dirençliliği ile ilgili olarak NF-kB dışında diğer olasılıkları araştırmak için, ileri evre prostat kanser hücre hatları TRAIL reseptör sentez düzeyleri açısından incelendi. TRAIL reseptör gen sentezinin miktarını belirlemek için, her TRAIL reseptörüne spesifik prob setleri kullanılarak bir kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR deneyi gerçekleştirildi (Şekil 4.11). Deneyler sonucunda, sadece TRAIL'a dirençli hücre hatları olan DU145 ve LNCaP hücrelerinde önemli seviyede TRAIL-R3 ve TRAIL-R4 sentezi belirlendi. PC3 hücrelerinde TRAIL-R4 reseptör sentezinin olmamasının nedeni henüz bilinmemektedir. Ancak, yakın tarihli bir çalışmada, TRAIL yalancı reseptörlerinin susturulmasına neden olan anormal promotör metilasyonunun prostat kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser tipinde sık olarak görüldüğü (%60) bildirilmiştir [120]. Griffith ve arkadaşlarının çalışmalarında TRAIL reseptör sentez düzeyleri, regüler RT-PCR ile araştırılmıştır. Regüler RT-PCR deneyi her ne kadar bilgi verici olsa da, hücre yüzeyinde sunulan reseptör miktarları hakkında kantitatif bilgi sağlayamaz. Ancak kanser hücrelerinde sentezlenen TRAIL ölüm reseptörlerinin ve yalancı reseptörlerin oranı hücrelerin TRAIL'a dirençliliğini etkileyebilecek önemli bir faktördür. Bu nedenle, reseptör sentez seviyelerinin Gerçek Zamanlı RT-PCR ile araştırılması gerekmektedir.

mRNA seviyeleri, her zaman hücre yüzeyindeki protein sentez seviyelerini yansıtmayacağı için, akış sitometrisi analizi ile hücre yüzeyindeki TRAIL reseptör sentez seviyeleri belirlendi (Şekil 4.12, 4.13). Sadece TRAIL'a dirençli olan DU145 (Şekil 4.12, Panel A) ve LNCaP (Şekil 4.13) hücrelerinde önemli miktarda TRAIL-R4 sentezi olduğu görüldü. TRAIL'a duyarlı PC3 hücrelerinde ise benzer bir durum gözlenmedi (Şekil 4.12, Panel B). Ayrıca, DU145 ve PC3 hücrelerindeki tersine, TRAIL-R3 yalancı reseptörünün sadece LNCaP hücrelerinde sentez edildiği belirlendi (Şekil 4.13).

Yakın tarihli bir çalışmada, Perlman ve arkadaşları, romatoid artrit sinovial fibroblastlarında ölüm reseptörlerinin yokluğunun TRAIL dirençliliğine sebep olduğunu bildirmiştir [168]. Bizim çalışmamızda ise, ölüm reseptörleri yokluğundan ziyade yalancı reseptörlerin varlığının prostat kanser hücrelerinde TRAIL dirençliliğine sebep olduğu sonucuna varıldı. Bu bulgularla uyumlu olarak, TRAIL-R3 veya TRAIL-R4 yalancı reseptörleri ile transfekte edilen TRAIL'a duyarlı hücrelerde apoptotik hücre ölümünde azalma gözlenmiştir [117, 118]. Bunun yanında, TRAIL-R4 yalancı reseptörünün, hücreleri TRAIL-aracılı apoptozisten korumada TRAIL-R3'e göre daha etkili olduğu bildirilmiştir [117]. Bizim çalışmamızda da, TRAIL'a dirençli hücre hatları olan DU145 ile LNCaP'te TRAIL-R4 reseptör sentez seviyesi, TRAIL-R3 reseptör seviyesine göre oldukça yüksek bulunmuştur (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13).

Sonuçlarımıza göre, hem TRAIL yalancı reseptör kompozisyonu, hem de hücre içi NF-kB aktivitesi, prostat kanser hücrelerinde TRAIL dirençliliğine katkıda bulunan iki önemli faktördür. Ayrıca, hücrelerdeki NF-kB aktivasyon düzeylerine, reseptör sentez profillerine veya androjen bağımlılık durumlarına bakılmaksızın, IKK inhibe edici stratejilerin, TRAIL dirençliliğini kırmada oldukça etkili olduğu görülmüştür. Çalışmamız, prostat kanser hücrelerinde TRAIL reseptör kompozisyonu ile TRAIL dirençliliği arasında anlamlı bir ilişki açığa çıkarmıştır. Bunun yanında, çalışmamız, Ad5hTRAIL ve AdIKK β KA ikili vektör sistemi ile prostat kanser hücrelerinde TRAIL duyarlılığı kazandıran ilk çalışma olması açısından da önemlidir. Bu bulgular ışığında, IKK inhibisyonu altında adenoviral yolla TRAIL gen aktarımı, prostat kanserli hastalarda TRAIL'in terapötik indeksini genişletmede değerli bir yaklaşım olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Foster, C.S., et al., *Cellular and molecular pathology of prostate cancer precursors*. Scand J Urol Nephrol Suppl, 2000(205): p. 19-43.
2. Yeung, F. and L.W. Chung, *Molecular basis of co-targeting prostate tumor and stroma*. J Cell Biochem Suppl, 2002. Suppl(38): p. 65-72.
3. Boring, C.C., et al., *Cancer statistics, 1994*. CA Cancer J Clin, 1994. 44(1): p. 7-26.
4. Greenlee, R.T., et al., *Cancer statistics, 2001*. CA Cancer J Clin, 2001. 51(1): p. 15-36.
5. Grumet, S.C. and D.W. Bruner, *The identification and screening of men at high risk for developing prostate cancer*. Urol Nurs, 2000. 20(1): p. 15-8, 23-4, 46.
6. McNeal, J.E., *Normal histology of the prostate*. Am J Surg Pathol, 1988. 12(8): p. 619-33.
7. McNeal, J.E., *The zonal anatomy of the prostate*. Prostate, 1981. 2(1): p. 35-49.
8. Abate-Shen, C. and M.M. Shen, *Molecular genetics of prostate cancer*. Genes Dev, 2000. 14(19): p. 2410-34.
9. Brawer, M.K., et al., *Keratin immunoreactivity in the benign and neoplastic human prostate*. Cancer Res, 1985. 45(8): p. 3663-7.
10. Nagle, R.B., et al., *Cytokeratin characterization of human prostatic carcinoma and its derived cell lines*. Cancer Res, 1987. 47(1): p. 281-6.
11. Verhagen, A.P., et al., *Differential expression of keratins in the basal and luminal compartments of rat prostatic epithelium during degeneration and regeneration*. Prostate, 1988. 13(1): p. 25-38.
12. Sherwood, E.R., et al., *Differential cytokeratin expression in normal, hyperplastic and malignant epithelial cells from human prostate*. J Urol, 1990. 143(1): p. 167-71.
13. Liu, A.Y., et al., *Cell-cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(20): p. 10705-10.

14. Bui, M. and R.E. Reiter, *Stem cell genes in androgen-independent prostate cancer*. Cancer Metastasis Rev, 1998. 17(4): p. 391-9.
15. De Marzo, A.M., et al., *Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells*. J Urol, 1998. 160(6 Pt 2): p. 2381-92.
16. di Sant'Agnese, P.A., *Neuroendocrine cells of the prostate and neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: a review of morphologic aspects*. Urology, 1998. 51(5A Suppl): p. 121-4.
17. Abrahamsson, P.A., *Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma*. Prostate, 1999. 39(2): p. 135-48.
18. Bostwick, D.G. and M.K. Brawer, *Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer*. Cancer, 1987. 59(4): p. 788-94.
19. Bostwick, D.G., *Prospective origins of prostate carcinoma. Prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia*. Cancer, 1996. 78(2): p. 330-6.
20. Gleason, D.F., *Histologic grading of prostate cancer: a perspective*. Hum Pathol, 1992. 23(3): p. 273-9.
21. *Oxford Textbook of Oncology*. Second ed, ed. T.I. Souhami SL., Hohenberger P., Horiot J-C. Vol. 2. 2002.
22. www.prostateline.com. sitesinden yararlanılmıştır.
23. Tavtigian, S.V., et al., *A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p*. Nat Genet, 2001. 27(2): p. 172-80.
24. Perrotti, M., et al., *Trends in poorly differentiated prostate cancer 1973 to 1994: observations from the Surveillance, Epidemiology and End Results database*. J Urol, 1998. 160(3 Pt 1): p. 811-5.
25. Ross, J.S., et al., *Prognostic markers in prostate cancer*. Expert Rev Mol Diagn, 2002. 2(2): p. 129-42.
26. Ross, J.S., et al., *Morphologic and molecular prognostic markers in prostate cancer*. Adv Anat Pathol, 2002. 9(2): p. 115-28.
27. Coley, C.M., et al., *Early detection of prostate cancer. Part I: Prior probability and effectiveness of tests. The American College of Physicians*. Ann Intern Med, 1997. 126(5): p. 394-406.
28. Van Brussel, J.P. and G.H. Mickisch, *Prognostic factors in prostate and testis cancer*. BJU Int, 1999. 83(8): p. 910-6; quiz 916-7.

29. Koksai, I.T., et al., *Discrepancy between Gleason scores of biopsy and radical prostatectomy specimens*. Eur Urol, 2000. 37(6): p. 670-4.
30. Schroder, F.H., et al., *The TNM classification of prostate cancer*. Prostate Suppl, 1992. 4: p. 129-38.
31. Xess, A., et al., *Prostate specific antigen as tumor marker: relationship with histologic grading*. Indian J Pathol Microbiol, 2001. 44(3): p. 261-4.
32. Bostwick, D.G. and L. Chang, *Overdiagnosis of prostatic adenocarcinoma*. Semin Urol Oncol, 1999. 17(4): p. 199-205.
33. Chang, M., et al., *Deletion mapping of chromosome 8p in colorectal carcinoma and dysplasia arising in ulcerative colitis, prostatic carcinoma, and malignant fibrous histiocyctomas*. Am J Pathol, 1994. 144(1): p. 1-6.
34. Wistuba, II, et al., *Allelic losses at chromosome 8p21-23 are early and frequent events in the pathogenesis of lung cancer*. Cancer Res, 1999. 59(8): p. 1973-9.
35. Macoska, J.A., et al., *Evidence for three tumor suppressor gene loci on chromosome 8p in human prostate cancer*. Cancer Res, 1995. 55(22): p. 5390-5.
36. Voeller, H.J., et al., *Coding region of NKX3.1, a prostate-specific homeobox gene on 8p21, is not mutated in human prostate cancers*. Cancer Res, 1997. 57(20): p. 4455-9.
37. Vlietstra, R.J., et al., *Frequent inactivation of PTEN in prostate cancer cell lines and xenografts*. Cancer Res, 1998. 58(13): p. 2720-3.
38. Cooney, K.A., et al., *Distinct regions of allelic loss on 13q in prostate cancer*. Cancer Res, 1996. 56(5): p. 1142-5.
39. Bookstein, R., et al., *Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated RB gene*. Science, 1990. 247(4943): p. 712-5.
40. Bookstein, R., et al., *Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(19): p. 7762-6.
41. Li, C., et al., *Identification of two distinct deleted regions on chromosome 13 in prostate cancer*. Oncogene, 1998. 16(4): p. 481-7.
42. Berges, R.R., et al., *Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer*. Clin Cancer Res, 1995. 1(5): p. 473-80.

43. Pietenpol, J.A., et al., *Assignment of the human p27Kip1 gene to 12p13 and its analysis in leukemias*. Cancer Res, 1995. 55(6): p. 1206-10.
44. Kibel, A.S., et al., *Identification of 12p as a region of frequent deletion in advanced prostate cancer*. Cancer Res, 1998. 58(24): p. 5652-5.
45. Sommerfeld, H.J., et al., *Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue*. Cancer Res, 1996. 56(1): p. 218-22.
46. Tilley, W.D., et al., *Androgen receptor gene expression in human prostate carcinoma cell lines*. Cancer Res, 1990. 50(17): p. 5382-6.
47. van der Kwast, T.H., et al., *Androgen receptors in endocrine-therapy-resistant human prostate cancer*. Int J Cancer, 1991. 48(2): p. 189-93.
48. Ruizeveld de Winter, J.A., et al., *Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer*. Am J Pathol, 1994. 144(4): p. 735-46.
49. Hobisch, A., et al., *Distant metastases from prostatic carcinoma express androgen receptor protein*. Cancer Res, 1995. 55(14): p. 3068-72.
50. Taplin, M.E., et al., *Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer*. N Engl J Med, 1995. 332(21): p. 1393-8.
51. Tilley, W.D., et al., *Mutations in the androgen receptor gene are associated with progression of human prostate cancer to androgen independence*. Clin Cancer Res, 1996. 2(2): p. 277-85.
52. Hakimi, J.M., et al., *Androgen-receptor gene structure and function in prostate cancer*. World J Urol, 1996. 14(5): p. 329-37.
53. Culig, Z., et al., *Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor*. Cancer Res, 1994. 54(20): p. 5474-8.
54. Cher, M.L., et al., *Comparative genomic hybridization, allelic imbalance, and fluorescence in situ hybridization on chromosome 8 in prostate cancer*. Genes Chromosomes Cancer, 1994. 11(3): p. 153-62.
55. Saric, T., et al., *Genetic pattern of prostate cancer progression*. Int J Cancer, 1999. 81(2): p. 219-24.
56. Zeimet, A.G., et al., *New insights into p53 regulation and gene therapy for cancer*. Biochem Pharmacol, 2000. 60(8): p. 1153-63.

57. Horowitz, J., *Adenovirus-mediated p53 gene therapy: overview of preclinical studies and potential clinical applications*. Curr Opin Mol Ther, 1999. 1(4): p. 500-9.
58. Klotz, L., *Intraoperative cavernous nerve stimulation during nerve sparing radical prostatectomy: how and when?* Curr Opin Urol, 2000. 10(3): p. 239-43.
59. Do, L.V., et al., *Postoperative Radiotherapy for Carcinoma of the Prostate: Impact on Both Local Control and Distant Disease-Free Survival*. Am J Clin Oncol, 2002. 25(1): p. 1-8.
60. Smith, M.R., et al., *Changes in Body Composition during Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. 87(2): p. 599-603.
61. Klotz, L., *Hormone therapy for patients with prostate carcinoma*. Cancer, 2000. 88(12 Suppl): p. 3009-14.
62. Wang, L., et al., *Dosimetric advantage of using 6 MV over 15 MV photons in conformal therapy of lung cancer: Monte Carlo studies in patient geometries*. J Appl Clin Med Phys, 2002. 3(1): p. 51-9.
63. Stein, R., et al., *Combining radioimmunotherapy and chemotherapy for treatment of medullary thyroid carcinoma*. Cancer, 2002. 94(1): p. 51-61.
64. Levine, A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. Cell, 1997. 88(3): p. 323-31.
65. Obata, A., et al., *Clinical significance of p53 functional loss in squamous cell carcinoma of the oropharynx*. Int J Cancer, 2000. 89(2): p. 187-93.
66. Hsieh, C.L. and L.W. Chung, *New perspectives of prostate cancer gene therapy: molecular targets and animal models*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2001. 11(1-3): p. 77-120.
67. Sanda, M.G., *Biological principles and clinical development of prostate cancer gene therapy*. Semin Urol Oncol, 1997. 15(1): p. 43-55.
68. Shirakawa, T., et al., *Tissue-specific promoters in gene therapy for the treatment of prostate cancer*. Mol Urol, 2000. 4(2): p. 73-82.
69. Gimba, E.R. and M.A. Barcinski, *Molecular aspects of prostate cancer: implications for future directions*. Int Braz J Urol, 2003. 29(5): p. 401-10.
70. Yu, D., et al., *Prostate-specific targeting using PSA promoter-based lentiviral vectors*. Cancer Gene Ther, 2001. 8(9): p. 628-35.

71. Jorgensen, T.J., et al., *Ionizing radiation does not alter the antitumor activity of herpes simplex virus vector G207 in subcutaneous tumor models of human and murine prostate cancer*. Neoplasia, 2001. 3(5): p. 451-6.
72. Vieweg, J., et al., *Efficient gene transfer with adeno-associated virus-based plasmids complexed to cationic liposomes for gene therapy of human prostate cancer*. Cancer Res, 1995. 55(11): p. 2366-72.
73. Loimas, S., et al., *Human prostate carcinoma cells as targets for herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy*. Cancer Gene Ther, 2001. 8(2): p. 137-44.
74. Lu, Y. and M.S. Steiner, *Transcriptionally regulated adenoviruses for prostate-specific gene therapy*. World J Urol, 2000. 18(2): p. 93-101.
75. Vorburger, S.A. and K.K. Hunt, *Adenoviral gene therapy*. Oncologist, 2002. 7(1): p. 46-59.
76. www.wiley.co.uk/genmed/clinical. sitesinden yararlanılmıştır.
77. www.tulane.edu. sitesinden yararlanılmıştır.
78. www.uiowa.edu. sitesinden yararlanılmıştır.
79. Russell, W.C., *Update on adenovirus and its vectors*. J Gen Virol, 2000. 81(Pt 11): p. 2573-604.
80. Herr, I. and K.M. Debatin, *Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy*. Blood, 2001. 98(9): p. 2603-14.
81. Ehlert, J.E. and M.H. Kubbutat, *Apoptosis and its relevance in cancer therapy*. Onkologie, 2001. 24(5): p. 433-40.
82. Reed, J.C., *Mechanisms of apoptosis*. Am J Pathol, 2000. 157(5): p. 1415-30.
83. Hyer, M.L., et al., *Downregulation of c-FLIP Sensitizes DU145 Prostate Cancer Cells to Fas- Mediated Apoptosis*. Cancer Biol Ther, 2002. 1(4): p. 401-6.
84. Hyer, M.L., et al., *Intracellular Fas ligand expression causes Fas-mediated apoptosis in human prostate cancer cells resistant to monoclonal antibody-induced apoptosis*. Mol Ther, 2000. 2(4): p. 348-58.
85. Hyer, M.L., et al., *Quantification and characterization of the bystander effect in prostate cancer cells following adenovirus-mediated FasL expression*. Cancer Gene Ther, 2003. 10(4): p. 330-9.

86. Selleck, W.A., et al., *IFN-gamma sensitization of prostate cancer cells to fas-mediated death: a gene therapy approach*. Mol Ther, 2003. 7(2): p. 185-92.
87. Nagata, S., *Apoptosis by death factor*. Cell, 1997. 88(3): p. 355-65.
88. Terlikowski, S.J., *Tumour necrosis factor and cancer treatment: a historical review and perspectives*. Roczn Akad Med Białymst, 2001. 46: p. 5-18.
89. Ogasawara, J., et al., *Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice*. Nature, 1993. 364(6440): p. 806-9.
90. Schneider, P., et al., *Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity*. J Exp Med, 1998. 187(8): p. 1205-13.
91. Creaven, P.J., et al., *A phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor given daily for five days*. Cancer Chemother Pharmacol, 1989. 23(3): p. 186-91.
92. Wiedenmann, B., et al., *Phase-I trial of intravenous continuous infusion of tumor necrosis factor in advanced metastatic carcinomas*. J Cancer Res Clin Oncol, 1989. 115(2): p. 189-92.
93. Tartaglia, L.A. and D.V. Goeddel, *Two TNF receptors*. Immunol Today, 1992. 13(5): p. 151-3.
94. Wiley, S.R., et al., *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis*. Immunity, 1995. 3(6): p. 673-82.
95. Pitti, R.M., et al., *Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family*. J Biol Chem, 1996. 271(22): p. 12687-90.
96. Nagane, M., H.J. Huang, and W.K. Cavenee, *The potential of TRAIL for cancer chemotherapy*. Apoptosis, 2001. 6(3): p. 191-7.
97. Griffith, T.S. and D.H. Lynch, *TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms*. Curr Opin Immunol, 1998. 10(5): p. 559-63.
98. Abe, K., et al., *The complexity of TNF-related apoptosis-inducing ligand*. Ann N Y Acad Sci, 2000. 926: p. 52-63.
99. Sheikh, M.S. and A.J. Fornace, Jr., *Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis*. Leukemia, 2000. 14(8): p. 1509-13.
100. Meng, R.D., et al., *The TRAIL decoy receptor TRUNDD (DcR2, TRAIL-R4) is induced by adenovirus-p53 overexpression and can delay TRAIL-, p53-,*

and KILLER/DR5-dependent colon cancer apoptosis. *Mol Ther*, 2000. 1(2): p. 130-44.

101. Kimberley, F.C. and G.R. Screaton, *Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors*. *Cell Res*, 2004. 14(5): p. 359-72.
102. LeBlanc, H.N. and A. Ashkenazi, *Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors*. *Cell Death Differ*, 2003. 10(1): p. 66-75.
103. LeBlanc, H., et al., *Tumor-cell resistance to death receptor--induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax*. *Nat Med*, 2002. 8(3): p. 274-81.
104. Deng, Y., Y. Lin, and X. Wu, *TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO*. *Genes Dev*, 2002. 16(1): p. 33-45.
105. Ravi, R. and A. Bedi, *Requirement of BAX for TRAIL/Apo2L-induced apoptosis of colorectal cancers: synergism with sulindac-mediated inhibition of Bcl-x(L)*. *Cancer Res*, 2002. 62(6): p. 1583-7.
106. Kelley, S.K. and A. Ashkenazi, *Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL*. *Curr Opin Pharmacol*, 2004. 4(4): p. 333-9.
107. Takeda, K., et al., *Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells*. *Nat Med*, 2001. 7(1): p. 94-100.
108. Cretney, E., et al., *Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice*. *J Immunol*, 2002. 168(3): p. 1356-61.
109. Smyth, M.J., et al., *Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy*. *Immunity*, 2003. 18(1): p. 1-6.
110. Herbeuval, J.P., et al., *Macrophages from cancer patients: analysis of TRAIL, TRAIL receptors, and colon tumor cell apoptosis*. *J Natl Cancer Inst*, 2003. 95(8): p. 611-21.
111. Griffith, T.S. and E.L. Broghammer, *Suppression of tumor growth following intralesional therapy with TRAIL recombinant adenovirus*. *Mol Ther*, 2001. 4(3): p. 257-66.
112. Griffith, T.S., et al., *Adenoviral-mediated transfer of the TNF-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand gene induces tumor cell apoptosis*. *J Immunol*, 2000. 165(5): p. 2886-94.

113. Voelkel-Johnson, C., D.L. King, and J.S. Norris, *Resistance of prostate cancer cells to soluble TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L) can be overcome by doxorubicin or adenoviral delivery of full-length TRAIL*. *Cancer Gene Ther*, 2002. 9(2): p. 164-72.
114. Nesterov, A., et al., *Elevated AKT activity protects the prostate cancer cell line LNCaP from TRAIL-induced apoptosis*. *J Biol Chem*, 2001. 276(14): p. 10767-74.
115. Walczak, H., et al., *Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo*. *Nat Med*, 1999. 5(2): p. 157-63.
116. Ashkenazi, A., et al., *Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand*. *J Clin Invest*, 1999. 104(2): p. 155-62.
117. Sheridan, J.P., et al., *Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors*. *Science*, 1997. 277(5327): p. 818-21.
118. Pan, G., et al., *An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL*. *Science*, 1997. 277(5327): p. 815-8.
119. Degli-Esposti, M.A., et al., *The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain*. *Immunity*, 1997. 7(6): p. 813-20.
120. van Noesel, M.M., et al., *Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation*. *Cancer Res*, 2002. 62(7): p. 2157-61.
121. Schneider, P., et al., *TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB*. *Immunity*, 1997. 7(6): p. 831-6.
122. Chaudhary, P.M., et al., *Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway*. *Immunity*, 1997. 7(6): p. 821-30.
123. Irmeler, M., et al., *Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP*. *Nature*, 1997. 388(6638): p. 190-5.
124. Kreuz, S., et al., *NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling*. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(12): p. 3964-73.
125. Ravi, R., et al., *Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB*. *Nat Cell Biol*, 2001. 3(4): p. 409-16.

126. Hatano, E. and D.A. Brenner, *Akt protects mouse hepatocytes from TNF- α - and Fas-mediated apoptosis through NF- κ B activation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. 281(6): p. G1357-68.
127. Mitsiades, N., et al., *Biologic sequelae of nuclear factor- κ B blockade in multiple myeloma: therapeutic applications*. Blood, 2002. 99(11): p. 4079-86.
128. Sanlioglu, A.D., et al., *Current progress in adenovirus mediated gene therapy for patients with prostate carcinoma*. Gene Ther Mol Biol, 2003. 7: p. 113-133.
129. Baldwin, A.S., Jr., *The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights*. Annu Rev Immunol, 1996. 14: p. 649-83.
130. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. 16: p. 225-60.
131. Mayo, M.W. and A.S. Baldwin, *The transcription factor NF- κ B: control of oncogenesis and cancer therapy resistance*. Biochim Biophys Acta, 2000. 1470(2): p. M55-62.
132. Zandi, E. and M. Karin, *Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the I κ B kinase complex*. Mol Cell Biol, 1999. 19(7): p. 4547-51.
133. May, M.J. and S. Ghosh, *I κ B kinases: kinsmen with different crafts*. Science, 1999. 284(5412): p. 271-3.
134. Chen, F., et al., *New insights into the role of nuclear factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases*. Clin Chem, 1999. 45(1): p. 7-17.
135. Gliniak, B. and T. Le, *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand's antitumor activity in vivo is enhanced by the chemotherapeutic agent CPT-11*. Cancer Res, 1999. 59(24): p. 6153-8.
136. Wu, G.S., et al., *KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene*. Nat Genet, 1997. 17(2): p. 141-3.
137. Wu, X.X., et al., *Doxorubicin enhances TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer*. Int J Oncol, 2002. 20(5): p. 949-54.
138. Wu, X.X., et al., *Enhancement of TRAIL/Apo2L-mediated apoptosis by adriamycin through inducing DR4 and DR5 in renal cell carcinoma cells*. Int J Cancer, 2003. 104(4): p. 409-17.

139. Mori, S., et al., *Sensitization of AIDS-Kaposi's sarcoma cells to Apo-2 ligand-induced apoptosis by actinomycin D*. J Immunol, 1999. 162(9): p. 5616-23.
140. Ng, C.P., A. Zisman, and B. Bonavida, *Synergy is achieved by complementation with Apo2L/TRAIL and actinomycin D in Apo2L/TRAIL-mediated apoptosis of prostate cancer cells: role of XIAP in resistance*. Prostate, 2002. 53(4): p. 286-99.
141. Kim, Y. and D.W. Seol, *TRAIL, a mighty apoptosis inducer*. Mol Cells, 2003. 15(3): p. 283-93.
142. Gibson, S.B., et al., *Increased expression of death receptors 4 and 5 synergizes the apoptosis response to combined treatment with etoposide and TRAIL*. Mol Cell Biol, 2000. 20(1): p. 205-12.
143. Shigeno, M., et al., *Interferon-alpha sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and NF-kappa B inactivation*. Oncogene, 2003. 22(11): p. 1653-62.
144. Chinnaiyan, A.M., et al., *Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(4): p. 1754-9.
145. Ramp, U., et al., *Apoptosis induction in renal cell carcinoma by TRAIL and gamma-radiation is impaired by deficient caspase-9 cleavage*. Br J Cancer, 2003. 88(11): p. 1800-7.
146. Totzke, G., K. Schulze-Osthoff, and R.U. Janicke, *Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors sensitize tumor cells specifically to death receptor-induced apoptosis independently of COX-2 inhibition*. Oncogene, 2003. 22(39): p. 8021-30.
147. Guseva, N.V., et al., *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated activation of mitochondria-associated nuclear factor-kappaB in prostatic carcinoma cell lines*. Mol Cancer Res, 2004. 2(10): p. 574-84.
148. Bernard, D., et al., *Rel/NF-kappaB transcription factors protect against tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by up-regulating the TRAIL decoy receptor DcR1*. J Biol Chem, 2001. 276(29): p. 27322-8.
149. Gasparian, A.V., et al., *The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells*. J Cell Sci, 2002. 115(Pt 1): p. 141-51.

150. Sanlioglu, S., G. Luleci, and K.W. Thomas, *Simultaneous inhibition of Rac1 and IKK pathways sensitizes lung cancer cells to TNFalpha-mediated apoptosis*. *Cancer Gene Ther*, 2001. 8(11): p. 897-905.
151. Sanlioglu, S., et al., *Lipopolysaccharide induces Rac1-dependent reactive oxygen species formation and coordinates tumor necrosis factor-alpha secretion through IKK regulation of NF-kappa B*. *J Biol Chem*, 2001. 276(32): p. 30188-98.
152. Sanlioglu, S. and J.F. Engelhardt, *Cellular redox state alters recombinant adeno-associated virus transduction through tyrosine phosphatase pathways*. *Gene Ther*, 1999. 6(8): p. 1427-37.
153. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. 72: p. 248-54.
154. Karacay, B., et al., *Inhibition of the NF-kappaB pathway enhances TRAIL-mediated apoptosis in neuroblastoma cells*. *Cancer Gene Ther*, 2004. 11(10): p. 681-90.
155. Oya, M., et al., *Constitutive activation of nuclear factor-kappaB prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells*. *Oncogene*, 2001. 20(29): p. 3888-96.
156. Franco, A.V., et al., *The role of NF-kappa B in TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)- induced apoptosis of melanoma cells*. *J Immunol*, 2001. 166(9): p. 5337-45.
157. Sanlioglu, A.D., et al., *Fundamental principals of tumor necrosis factor-alpha gene therapy approach and implications for patients with lung carcinoma*. *Lung Cancer*, 2004. 44(2): p. 199-211.
158. Batra, R.K., et al., *IkappaBalpha gene transfer is cytotoxic to squamous-cell lung cancer cells and sensitizes them to tumor necrosis factor-alpha-mediated cell death*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999. 21(2): p. 238-45.
159. Demarchi, F., et al., *Gas6 anti-apoptotic signaling requires NF-kappa B activation*. *J Biol Chem*, 2001. 276(34): p. 31738-44.
160. Andjelic, S., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kappa B/Rel are at the divergence of CD40-mediated proliferation and survival pathways*. *J Immunol*, 2000. 165(7): p. 3860-7.
161. Jones, R.G., et al., *Protein kinase B regulates T lymphocyte survival, nuclear factor kappaB activation, and Bcl-X(L) levels in vivo*. *J Exp Med*, 2000. 191(10): p. 1721-34.

162. Palayoor, S.T., et al., *Constitutive activation of IkappaB kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen*. *Oncogene*, 1999. 18(51): p. 7389-94.
163. Thakkar, H., et al., *Pro-survival function of Akt/protein kinase B in prostate cancer cells: relationship with trail resistance*. *J Biol Chem*, 2001. 276(42): p. 38361-9.
164. Beresford, S.A., et al., *Differential effects of phosphatidylinositol-3/Akt-kinase inhibition on apoptotic sensitization to cytokines in LNCaP and PCC-3 prostate cancer cells*. *J Interferon Cytokine Res*, 2001. 21(5): p. 313-22.
165. Mitsiades, C.S., et al., *TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications*. *Blood*, 2001. 98(3): p. 795-804.
166. Zhang, X.D., et al., *Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells*. *J Immunol*, 2000. 164(8): p. 3961-70.
167. Griffith, T.S., et al., *Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells*. *J Immunol*, 1998. 161(6): p. 2833-40.
168. Perlman, H., et al., *Rheumatoid arthritis synovial fluid macrophages express decreased tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand R2 and increased decoy receptor tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand R3*. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(11): p. 3096-101.

ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Ankara’da doğan Ahter D. (TORAMAN) ŞANLIOĞLU, ilköğrenimini 1977-1981 yılları arasında babasının bayındırlık müdürlüğü görevi nedeniyle farklı ilkokullarda yapmış, ve Ankara Namık Kemal İlkokulu’nda tamamlamıştır. 1981-1988 yılları arasında Ankara Özel Yükseliş Lisesi ve İstanbul Özel Dost Lisesi’nde orta ve lise öğrenimi görmüştür. 1988-1990 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri’nde Kuzey Carolina eyaletinde Fayetteville Technical Institute’ta burslu olarak biyoloji ağırlıklı dersler almıştır. 1990-1993 yılları arasında turizm alanında çalışmıştır. 1993 yılında öğrenimine başladığı Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden, 1997 yılında bölüm dördüncüsü olarak mezun olmuştur. 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak göreve başlamış, bunun yanında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’ne bağlı olarak, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda Temel Genetik yüksek lisans programına kayıt olmuştur. 2001 yılında yüksek lisans programından mezun olmuş, ve aynı Enstitü ve aynı Anabilim Dalı’nda Tıbbi Genetik doktora programına başlamıştır.

2001 yılında 10. ICHG (International Congress of Human Genetics) Kongresi’ne katılım için genç bilim adamı katılım bursu, 2003 yılında 11. ESGT (European Society of Gene Therapy) Kongresi’ne katılım için ise genç bilim adamı seyahat ödülü almıştır. 2001 yılında Eskişehir’de düzenlenen 7. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi’nde poster birincilik ödülü, 2003 yılında Adana’da düzenlenen 8. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi’nde Altan Günalp Araştırma Birincilik Ödülü almıştır. 2004 yılında Evry, Fransa’da düzenlenen “Endüstri Kalitesinde Gen Vektörlerinin İleri Düzeyde Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” kurs ve kongresine tamamen burslu olarak katılmıştır. 2004 yılında TÜBİTAK aracılığıyla verilen NATO-A2 Yurtdışı Doktora Araştırma Bursu’nu (Amerika Birleşik Devletleri) almaya hak kazanmıştır. Science Citation Index’e kayıtlı bilimsel dergilerde 7 makalesi yayınlanmış, 1 makalesi yayına kabul edilmiştir. Ulusal ve uluslararası kongrelerde 23 bildirisi bulunmaktadır.