

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**PROSTAT HÜCRE HATTINDA JAK/STAT3 YOLAĞININ
ANJİOJENEZDEKİ ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Venhar GÜRBÜZ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ece KONAÇ

ANKARA
HAZİRAN 2011

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**PROSTAT HÜCRE HATTINDA JAK/STAT3 YOLAĞININ
ANJİOJENEZDEKİ ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Venhar GÜRBÜZ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ece KONAÇ

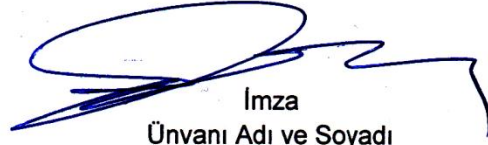
Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2010-74
proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
HAZİRAN 2011

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

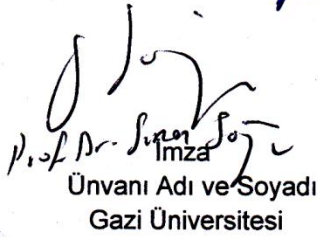
Tez Savunma Tarihi: 28/06/2011



İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Abdullah Fıratlı



Prof. Dr. Sinan Soğut
İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi



İmza Doç. Dr. Fırat Kocak
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER ve GRAFİKLER	vi
TABLolar	ix
SEMBOLLER ve KISALTMALAR	x
ÖNSÖZ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Prostat Kanseri (CaP)	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Prostat Kanserinin Etiyolojisi	4
2.1.3. LNCaP Prostat Hücre Hattı	5
2.1.4. Prostat Kanserinde Moleküler Mekanizma	5
2.2. Anjiyogenezis	7
2.3. Janus Kinaz Ailesi	8
2.4. Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatör Ailesi (STAT)	9
2.5. Janus Kinaz/Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktivatör Ailesi	11
2.6. JAK/STAT Yolağının Negatif Düzenleyicileri	12
2.7. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)	14
2.8. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)	16
2.9. Tümör Nekroz Faktör ilişkili Apoptoz Sağlayan Ligand (TRAIL)	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Kullanılan Cihazlar	18

3.2.	Kullanılan Sarflar	18
3.3.	Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı	19
3.3.1.	% 10'luk RPMI 1640 Besiyerinin Hazırlanışı	19
3.3.2.	% 1'lik RPMI 1640 Besiyerinin Hazırlanışı	19
3.3.3.	Hücre Lizis Solüsyonunun Hazırlanışı	19
3.3.4.	Fenilmetilsülfonilflorid	19
3.3.5.	KH_2PO_4 Solüsyonunun Hazırlanışı	19
3.3.6.	Na_2HPO_4 Solüsyonunun Hazırlanışı	20
3.3.7.	Tuz Sodyum Sitrat Solüsyonu	20
3.3.8.	Fosfat Tampon Solüsyonu	20
3.3.9.	Sodyum Sitrat, Triton-X 100 Solüsyonu	20
3.4.	LNCaP Hücre Hattı	21
3.5.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	21
3.6.	Kullanılan Kitler	22
3.7.	Yöntemler	22
3.7.1.	Hücre Kültürü	22
3.7.2.	WST-1 Sitotoksite Deneyi	23
3.7.3.	Protein İzolasyonu	25
3.7.4.	Protein Miktar Tayini	25
3.7.5.	FosfoSTAT-3 Düzeyinin ELIZA Yöntemi ile Belirlenmesi	26
3.7.6.	Aktif Kaspaz-3 Düzeyinin ELIZA Yöntemi ile Belirlenmesi	27
3.7.7.	Hücre Kültüründen Total RNA Saflaştırılması	28
3.7.8.	Komplementer DNA Sentezi	29
3.7.9.	cDNA Ters Transkriptaz PCR Programı	30
3.7.10.	Gen İfadesinin Real Time PCR İle Belirlenmesi	31

3.7.10.1.	GAPDH Primer ve Probenun cDNA Üzerindeki Yerleşimi	31
3.7.10.2.	VEGFA Primer ve Probenun cDNA Üzerindeki Yerleşimi	32
3.7.10.3.	VEGFC Primer ve Probenun cDNA Üzerindeki Yerleşimi	32
3.7.10.4.	VEGFR2 Primer ve Probenun cDNA Üzerindeki Yerleşimi	33
3.7.10.5.	STAT3 Primer ve Probenun cDNA Üzerindeki Yerleşimi	34
3.7.10.6.	MMP2 Primer ve Probenun cDNA Üzerindeki Yerleşimi	34
3.7.10.7.	MCL1 Primer ve Probenun cDNA Üzerindeki Yerleşimi	35
3.7.10.8.	CASP8 Primer ve Probenun cDNA Üzerindeki Yerleşimi	36
3.7.10.9.	CASP9 Primer ve Probenun cDNA Üzerindeki Yerleşimi	36
3.7.11.	Real Time PCR Tepkime Karışımları	37
3.7.12.	Light Cycler 480 Deney Programı	38
3.7.13.	TUNEL ile Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesi	39
3.7.14.	Gimza ile Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesi	40
3.8.	İstatiksel Analiz Yöntemleri	41
4.	BULGULAR	42
4.1.	Hücre Canlılığı Sonuçlarının Değerlendirilmesi	42
4.2.	FosfoSTAT-3 Düzeyinin ELIZA Yöntemi ile Belirlenmesi	48
4.3.	Aktif Kaspaz-3 Düzeyinin ELIZA Yöntemi ile Belirlenmesi	51
4.4.	Gen İfade Düzeyinin Kantitatif Belirlenmesi	52
4.5.	Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması	57
4.6.	TUNEL ve Gimza ile Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesi	61

5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ	70
7. ÖZET	71
8. SUMMARY	73
9. KAYNAKLAR	75
10. EKLER	89
11. ÖZGEÇMİŞ	90

ŞEKİLLER VE GRAFİKLER

Şekil 1. CaP türleri	4
Şekil 2. LNCaP hücre hattının mikroskopik görünümü (A); Birincil antikör ile boyanmış LNCaP hücreleri (B)	5
Şekil 3. Anjiyogenik faktörler arasındaki denge	8
Şekil 4. JAK protein yapısı	8
Şekil 5. AG490'ın kimyasal yapısı	9
Şekil 6. STAT protein yapısı	9
Şekil 7. STAT dimerizasyonu	11
Şekil 8. S3I-201'in kimyasal yapısı	11
Şekil 9. JAK/STAT yolunun inhibitörleri	14
Şekil 10. GAPDH primer dizaynı	31
Şekil 11. GAPDH mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerlerin cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	31
Şekil 12. VEGFA primer dizaynı	32
Şekil 13. VEGFA mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerlerin cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	32
Şekil 14. VEGFC primer dizaynı	32
Şekil 15. VEGFC mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerlerin cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	33
Şekil 16. VEGFR2 primer dizaynı	33
Şekil 17. VEGFR2 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerlerin cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	33
Şekil 18. STAT3 geninin primer dizaynı	34
Şekil 19. STAT3 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerlerin cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	34
Şekil 20. MMP2 geninin primer dizaynı	34
Şekil 21. MMP2 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerlerin cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	35
Şekil 22. MCL1 geninin primer dizaynı	35
Şekil 23. MCL1 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerlerin cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	35
Şekil 24. CASP8 geninin primer dizaynı	36
Şekil 25. CASP8 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerlerin cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	36
Şekil 26. CASP9 geninin primer dizaynı	36
Şekil 27. CASP9 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerlerin cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	37

Şekil 28. GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	53
Şekil 29. VEGFA geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	53
Şekil 30. VEGFC geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	54
Şekil 31. VEGFR2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	54
Şekil 32. STAT3 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	55
Şekil 33. MMP2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	55
Şekil 34. MCL1 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	56
Şekil 35. CASP8 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	56
Şekil 36. CASP9 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	57
Şekil 37. TUNEL ile LNCaP hücrelerinde normal (A), pro-apoptik (B) ve apoptotik (C) hücrelerin görünümü	62
Şekil 38. Gimza ile LNCaP hücrelerinde apoptozun gösterilmesi	62
Grafik 1. LNCaP hücrelerinin IL-6 ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucunda belirlenen hücre canlılık oranları	42
Grafik 2. LNCaP hücrelerinin S3I-201 ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucunda belirlenen hücre canlılık oranları	43
Grafik 3. LNCaP hücrelerinin AG490 ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucunda belirlenen hücre canlılık oranları	44
Grafik 4. LNCaP hücrelerinin belirlenen dozlarda IL-6, AG490 ve S3I-201 ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları	45
Grafik 5. LNCaP hücrelerinin belirlenen dozlarda IL-6, AG490 ve S3I-201 ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları	45
Grafik 6. LNCaP hücrelerinin 24, 48, 72 saat sürede TRAIL ile kombinasyonu sonucunda belirlenen hücre canlılık oranları	46
Grafik 7. LNCaP hücrelerinin belirlenen dozlarda IL-6, AG490 ve TRAIL ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları	47

Grafik 8. LNCaP hücrelerinin belirlenen dozlarda IL-6, S3I-201 ve TRAIL ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları	47
Grafik 9. LNCaP hücrelerinin 25 ng/ml IL-6 ile inkübasyonu sonunda gösterilen fosfoSTAT- 3 düzeyi	48
Grafik 10. LNCaP hücrelerinin belirlenen dozlarda 3 saat inkübasyonu sonunda gösterilen fosfoSTAT-3 düzeyi	49
Grafik 11. LNCaP hücrelerinin farklı dozlarda 24 saat inkübasyonu sonunda gösterilen fosfoSTAT-3 düzeyi	49
Grafik 12. LNCaP hücrelerinin 300 µM S3I-201 ve 25 ng/ml IL-6 ile inkübasyonu sonunda gösterilen fosfoSTAT-3 düzeyi	50
Grafik 13. LNCaP hücrelerinin 50 µM AG490 ve 25 ng/ml IL-6 ile inkübasyonu sonunda gösterilen fosfoSTAT-3 düzeyi	51
Grafik 14. LNCaP hücrelerinin AG490, IL-6, S3I-201 ve TRAIL ile yapılan Eliza sonrasında aktif kaspaz 3 oranları	52
Grafik 15. LNCaP hücrelerinin 24 saat 25 ng/ml IL-6 uygulaması sonrasında STAT3, VEGFR2, VEGFA, MCL1 genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik	59
Grafik 16. LNCaP hücrelerinin 48 saat IL-6 uygulaması sonrasında STAT3, VEGFR2, VEGFA, MCL1 genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik	59
Grafik 17. LNCaP hücrelerinin 48 saat IL-6 ve AG490 uygulaması sonrasında STAT3, VEGFR2, VEGFA, MCL1 genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik	60
Grafik 18. LNCaP hücrelerinin 48 saat IL-6 ve S3I-201 uygulaması sonrasında STAT3, VEGFR2, VEGFA, MCL1 genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik	60
Grafik 19. LNCaP hücrelerinin 24 ve 48 saat IL-6 ve AG490, TRAIL S3I-201 ve uygulaması sonrasında CASP8 ve CASP9 genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik	61
Grafik 20. LNCaP hücrelerinin AG490, S3I-201 ve TRAIL ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen canlı ve apoptotik hücre oranları	62

TABLolar

Tablo 1. RT-PCR tepkime karışımı	30
Tablo 2. Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program	30
Tablo 3. GAPDH, VEGFA, VEGFC, VEGFR2, STAT3, MMP2, MCL1, CASP8 ve CASP9 Real Time PCR tepkime karışımı	37
Tablo 4. GAPDH, VEGFA, VEGFC, VEGFR2, STAT3, MMP2, MCL1, CASP8 ve CASP9 genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı	39

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

AR	: Androjen Reseptörü
AG490	:Trifostin AG490, (E)-2-Siyano-3-(3,4-dihidrofenil)-N-(fenilmetil)-2 propenamid
BCL-2	: B Hücresi Lenfoma Geni 2
bFGF	: Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
CaP	: Prostat Kanseri
CASP	: Kaspaz
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CDKN1B	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 1B
CIS	: Sitokin İndüklenebilir SH2 Protein
COX	: Siklooksijenaz
DBD	: DNA Bağlama Bölgesi
DHT	: Dehidrotestesteron
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotid Trifosfat
ECM	: Ekstrasellüler Matriks
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
ELIZA	: Enzime Bağlı İmmün Analiz
FAK	: Fokal Adhezyon Kinazı

GAPDH	: Gliseraldehit 3 Fosfat Dehidrojenaz
GSTP1	: Glutatyon-S Transferaz
IL-6	: İnterlökin-6
JAK	: Janus Kinaz
LK	: Bağlayıcı Bölge
MAPK	: Mitojen Aktive Eden Protein Kinaz Kinazı
MCL1	: Myeloid Hücre Lösemi 1
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MYC	: Miyelomitomatozis Viral Onkogen
Na₂HPO₄	: Disodyum Hidrojen Fosfat
NaCl	: Sodyum Klorür
NH₂	: Aminouç Bölge
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PC3	: İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı
PCR	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
PI3K	: Fosfoinozitol 3 Kinaz
PIA	: Proliferatif İnflamatuar Atrofi
PIAS	: STAT Aktivasyonunu İnhibe Eden Protein
PIN	: Prostatik İntraepitelyal Neoplazi

PTEN	: Fosfat ve Tensin Homoloji
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz A	: Ribonükleaz A
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
RT-PCR	: Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Tepkimesi
S3I-201	: 2-hidroksi-4-(2-(4-metilbenzen)sulfonyl)oksi)asetamido) benzoik asid: NSC 74859
SH2	: Src Homoloji 2
SHP	: SH2 İçeren Fosfatazlar
SOCS	: Sitokin Sinyali Baskılayıcı Protein Ailesi
STAT	: Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyonel Aktivatör
TAD	: Transkripsiyonel Aktivasyon Bölgesi
TGF α ve β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta ve Alfa
TIMP2	: Metallopeptidaz İnhibitor 2
TRAIL	: Tümör Nekroz Faktör İlişkili Apoptoz Sağlayan Ligand
Tyk2	: Tirozin Kinaz 2
UPL	: Evrensel Prob Kütüphanesi
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
VEGFR	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktör Reseptör
WST-1	: (4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disülfonat)

ÖNSÖZ

“Prostat Hücre Hattında JAK/STAT3 Yolağının Anjiyojenezdeki Rolü” konulu bu yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı’nca **01/2010-74** kod no’lu proje ile desteklenmiştir. Çalışmamız, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

1. GİRİŞ

Prostat kanseri (CaP), erkekler arasında en sık görülen ikinci kanser türüdür. Akciğer ve kemik metastazı ile karakterizedir. Diğer kanserlerde olduğu gibi CaP'in gelişim, metastaz ve anjiyogenezinde birçok sinyal yolağı görev almaktadır. Kanser metastazına ve anjiyogenezine neden olan sinyal yollarının aydınlatılması, CaP'in tanı ve tedavi hedeflerinin belirlenmesi, tedavi sonrasında hastalıksız sağkalım için oldukça önemlidir.

CaP gelişiminde, özellikle metastaz ve anjiyogenezinde JAK/STAT3 yolağının önemli rol oynadığı gösterilmiştir. JAK/STAT3 sinyal yolağı, hücreler arası sitokin sinyallerinin çekirdeğe iletilmesinde önemli yere sahiptir. Hücre büyümesi ve farklılaşmasını içeren hücresel olayları düzenler. Bundan dolayı, bu yolak anjiyogenezde kritik öneme sahiptir. Sitokinlerin aynı aileden gelen reseptörlere bağlanmasıyla reseptörler dimerize olur ve tirozin fosforilasyonu gerçekleşir. Bunun sonucunda reseptör ilişkili JAK enzimi aktifleşir. STAT molekülünün SH2 bölgesi, reseptördeki fosfotirozin kısmı ile etkileşir. Böylece STAT molekülleri reseptöre bağlanır. Reseptöre bağlanmış olan STAT molekülleri fosforile edilerek, reseptörden ayrıldıktan sonra aktifleşir. Homodimer veya heterodimer oluşturarak çekirdeğe taşınır ve hedef genlerin transkripsiyonuna aracılık eder. Kanser oluşumunda, JAK/STAT3 yolağının kontrolündeki düzensizlikler önemli rol oynamaktadır.

Çalışmamızda, prostat kanser hücre hatlarında (LNCaP, PC3) JAK/STAT3 yolağı aracılığıyla aktive olan anjiyogenik faktörler VEGFA, VEGFC, VEGFR2, MMP2 ve anti-apoptotik faktör olan MCL1 genlerinin ifadenin düzeylerini araştırmayı amaçladık. Bu bağlamda, ilk olarak interlökin-6 (IL-6) negatif LNCaP prostat hücre hattına IL-6 verilerek, JAK/STAT3 yolağının aktivasyonu sağlandı. Aktive olan yolak

JAK2 inhibitörü olan AG490 ve STAT3 inhibitörü olan S3I-201 ile inaktive edildi. Yolağın bu inhibitörler aracılığıyla inaktivasyonunun kaspaz 3 kaskadını aktive ettiği, ayrıca LNCaP hücrelerini kaspaz 9 kaskadı aracılığıyla, mitokondriyal yolu kullanarak apoptoza yönlendirdiği bulundu. Ayrıca, çalışmamız bu inhibitörlerin TRAIL ile kombinasyonunun apoptotik etkiyi artırmadığını ve bu yolakta rol alan birincil anjiyojenik faktörün VEGFA olduğunu gösteren ilk çalışmadır.

1. GENEL BİLGİLER

Kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz şekilde bölünmesi ve diğer dokuları işgal etmesi ile oluşan hastalıklar için kullanılan bir terimdir. Bu süreçte hücrenin genetik materyali zarar görebilir veya değişebilir, normal hücre büyümesini, gelişimini etkileyen mutasyonlar oluşabilir¹.

Prostatın kökeni, mezonefrik kanal girişinin yukarısında ve aşağısında bulunan üretral epitelyum hücreleridir. Bu basit tübüler yapılar, 5 ayrı grup oluşturarak, 11. haftanın sonunda gelişmeye başlar. 16. haftada ise gelişme tamamlanır. CaP, diğer kanser türleri gibi hücre kontrol mekanizmasının bozulmasıyla oluşur².

1.1.Prostat Kanseri (CaP)

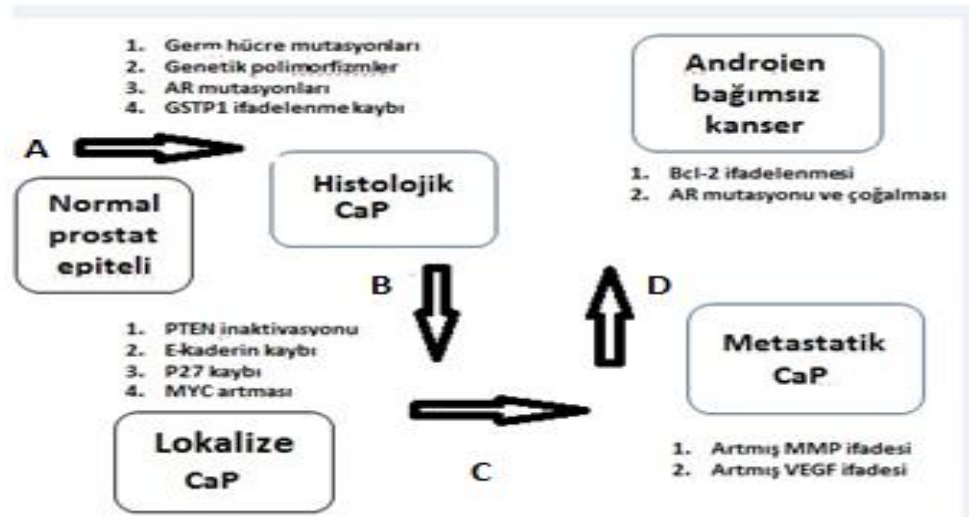
1.1.1. Epidemiyoloji

Genitoüriner kanserler içerisinde erkeklerde görülme sıklığı açısından ilk sırada yer alan CaP, erkeklerde kanser nedeni ölümler arasında ikinci sıradadır³. Ayrıca CaP, batı ülkelerinde erkekler arasında, en sık görülen kanser türüdür. Amerika ve bazı batı ülkelerinde CaP oranı son on yılda hızla artmıştır. CaP oran ve ölüm hızının en yüksek olduğu popülasyon, Amerika'da yaşayan zencilerdir. Asya ülkelerinde bu oran düşük olsa da son yıllarda artmaya başlamıştır⁴. Yaş ilerledikçe CaP görülme oranı yükselmektedir ve yakalanma olasılığı 39 yaşındaki bir erkekte yaklaşık 1/10000 iken, 40-59 yaş aralığında 1/103, 60-79 yaş aralığında 1/8 olmaktadır⁵. Türkiye'de ise erkekler arasında kanser nedeni ölümler sıralamasında ikinci sırada yer almaktadır⁶.

1.1.2. Prostat Kanserinin Etiyolojisi

CaP'in etiyolojisinde rol alan basamaklar ve türleri aşağıda sıralanmış ve Şekil 1'de şematize edilmiştir.

1. Histolojik CaP, moleküler değişim olarak germ hücre mutasyonlarını, genetik polimorfizmleri, androjen reseptör (AR) polimorfizmlerini ve Glutasyon S Transferaz (GSTP1) ifade kaybını içermektedir.
2. İnvaziv lokalize CaP, kromozom 8p'de allel kayıpları, PTEN inaktivasyonu, p27 kaybı, E-Kaderin kaybı, MYC amplifikasyonunu kapsamaktadır.
3. Metastatik CaP, artmış metalloproteinaz ifadesini, artmış vasküler endotelial büyüme faktör ifadenmesini içermektedir.
4. Androjenden bağımsız CaP, AR mutasyon ve amplifikasyonunun yada aşırı Bcl-2 ifadenmesinin oluşumu ile karakterizedir.
5. Androjen bağımlı prostat kanseri⁷.

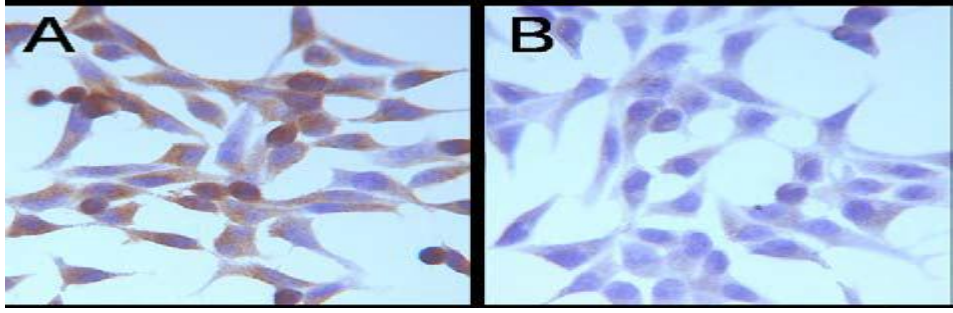


Şekil 1. CaP türleri

1.1.3. LNCaP Prostat Hücre Hattı

LNCaP hücre hattı, 1977'de Kafkasyalı 50 yaşındaki bir erkeğin insan prostat adenokarsinomasından elde edilmiş hücre hattıdır.

Yapışma özelliklerinden dolayı bir epitel hücresidir (Şekil 2). LNCaP hücre hatları androjen bağımlıdır ve bu hormonun varlığı olmadan büyüyemezler, ancak bu hücreler androjen bağımsız klonlara da dönüşebilmektedir^{8,9}.



Şekil 2. LNCaP hücre hattının mikroskopik görünümü (A); Birincil antikör ile boyanmış LNCaP hücreleri (B)¹⁰

1.1.4. Prostat Kanserinde Moleküler Mekanizma

CaP'de gen kazanımı, kaybı, amplifikasyonları, ifadelenmede artış veya azalışa sebep olan mutasyonlar ve protein fonksiyonunda değişikliğe neden olan mutasyonlar gibi hücre döngüsünün düzenlenmesi ve hücrenin çoğalmasıyla ilişkilendirilen pekçok moleküler kusurlar tanımlanmıştır¹¹.

İnflamasyonun CaP gelişiminde rolü önemlidir. Bunu destekleyen en önemli moleküler verilerden biri, inflamasyonun araçlarından biri olan siklooksijenaz-2 (COX-2) molekülüne aittir.

Karsinogenezis sürecinde COX-2'nin aşırı ifadesinin Bcl-2 ifadesini artırdığı ve apoptozu azalttığı belirlenmiştir. COX-2 inhibisyonu, prostat kanser hücrelerinde çoklu etkilere neden olmaktadır. Prostat hücrelerinde azalmış COX-2 ifadesi ile paralellik gösteren Bcl-2 ifadesinin, apoptozun indüksiyonu ve VEGF'nin azaltılmasıyla tümör büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur¹². CaP'in moleküler patogenezinde önemli bir diğer bulgu da GSTP1 geninde görülen somatik inaktivasyondur^{13,14}.

Prostat epitel hücrelerinde, proliferatif inflamatuvar atrofi (PIA) adı verilen odak alanların oluştuğu gösterilmiştir. Genellikle prostat çevresinde görülmektedir. Epitelyal atrofi morfolojik geçişler göstererek prostatik intraepitelyal neoplazi'ye (PIN) dönüşebilir^{2,13,14}. PIA lezyonlarının CaP'in öncülleri olabileceğini gösteren önemli veriler bulunmuştur¹³.

Anti-apoptotik bir gen olan Bcl-2'nin androjene maruz kalan prostat hücrelerinin apoptoza uğramasını engellediği gösterilmiştir. Androjenik hormon ve AR her ikisinde, birçok prostat hastalığında normal prostat gelişimi veya fonksiyonunda kritik rol oynarlar. CaP'de AR'yi kodlayan gende somatik değişiklikler oluşmaktadır. AR, steroid hormon reseptör ailesinin bir üyesidir. AR sinyalinin, prostat adenokarsinomasının tedavisinde ve patogenezinde büyük rolü olduğu düşünülmektedir. Çünkü androjenler, normal ve neoplastik prostat epitellerinin korunması için gereklidirler. Testesteronun %90'ı, 5- α redüktaz tarafından dehidrotestesterona (DHT) dönüştürülmektedir. DHT veya testesteron hücreler arası androjen reseptörlerine bağlanabilir¹⁵. Androjen azalmasını takiben son yol androjen reseptörü aktivasyonudur¹⁶. Androjen hormon bağımlı CaP gelişiminde JAK/STAT3 yolağının önemli rol oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir¹⁷.

E-kaderin, hücreler arası adezyon proteinlerinden birisidir. E-kaderin kaybı kötü prognozlu prostat kanserleriyle ilişkili bulunmuştur. Siklin-CDK kompleksleri, gerekli proteinleri fonksiyona geçirerek, hücrenin metabolik aktivitesini ve hücre bölünmesini düzenler. Prostat kanser hücre hattında ve prostat kanser örneklerinde Siklin D1 mRNA ifadenme seviyesinde %25 artış bulunmuştur¹⁵. E-kaderin kaybı zayıf prognoz ile de ilişkilendirilebilir¹⁸.

1.2.Anjiyojenezis

Anjiyojenez, önceden var olan damarlardan yeni kılcal damarların oluşumudur¹⁹. Bu olay, yeni kan damarlarının büyümesi, yenilenmesi ve doku onarımı sırasında önemlidir. Klinik olarak tümörlerin içinde bulunan mikroskobik kanserlerin büyümesi için gerekli bir basamaktır^{20,21}.

Büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler dahil pro-anjiyojenik ve anti-anjiyojenik faktörlerin dengesi, tümörojenezis esnasında bozulur²². Bu etkiler endotel hücrelerinin yayılımının artması ve pro-anjiyojenik faktörlerin doğrudan bloklanması ile gerçekleşir^{23,24}. Bu pro-anjiyojenik faktörler oluştuğunda, birçok etki ile yeni kan damarlarının oluşumunu aktive eder. Örneğin, vasküler endotel hücrelerinin göçü ve çoğalması, olgunlaşmamış endotel hücrelerinin yayılımı, kılcal damarlarda vasküler geçirgenliğe neden olma gibi etkilere aracılık eder. Pro-anjiyojenik faktörler; vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), dönüştürücü büyüme faktörü beta ve alfa (TGF α ve β)'yı içerir. Bunlardan en önemlisi VEGF'dir. Aynı zamanda tam tersi etkiye sahip anti-anjiyojenik faktörlerde vardır. Bu anti ve pro-anjiyojenik faktörler arasındaki denge anjiyojenezisi belirler²⁵ (Şekil 3).

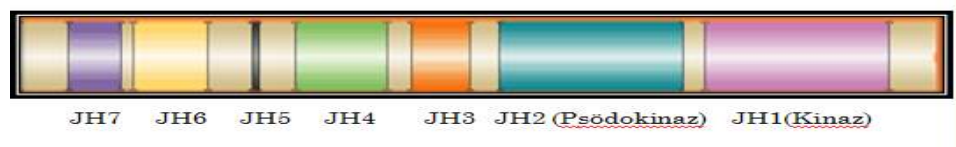
VEGF, anjiyonez gelişiminde rol alan en önemli pro-anjiyonek faktörlerden biridir²⁶.



Şekil 3. Anjiyonek faktörler arasındaki denge

1.3. Janus Kinaz Ailesi

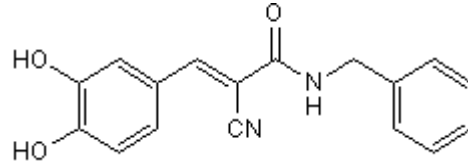
Sitoplazmik protein kinazlar arasında yer alan JAK ailesi, JAK 1-3 ve tyk2 olmak üzere dört üyeden oluşmaktadır^{27,28}. Ayrıca JAK ailesi 4 fonksiyonel JAK homologik alana sahiptir. Bunlar; FERM, SH2, Psödokinaz ve Tirozin Kinaz'dır. J1, tirozin kinaz olarak görev yapmaktadır. J2, psödokinaz etki göstermektedir. J3 ve J4'ün bir parçası, SH2 benzeri bir fonksiyona sahiptir. J4'ün diğer parçası ve J5-7, FERM olarak görev yapmaktadır. Sitokin reseptörü ile ilişki kurarlar^{28,29}. Psödokinaz bölgesi tirozin kinaz fonksiyonu olan bir bölge değildir. Bu alan JAK proteinlerinin aktivasyonunu negatif olarak düzenler²⁹ (Şekil 4).



Şekil 4. JAK protein yapısı

AG490, özellikle JAK için kullanılan bir tirozin kinaz inhibitörüdür. STAT3'ün DNA bağlanma aktivitesini düşürerek, apoptozu indüklediği bulunmuştur. Kansere hücrelerinin çoğunda AG490'nın büyümeyi inhibe ettiği gösterilmiştir³⁰. AG490 ve türevleri JAK inhibisyonu

için *in vivo* ve *in vitro* olarak yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır³¹. AG490'nın kimyasal yapısı Şekil 5' de verilmiştir.



Şekil 5. AG490'nın kimyasal yapısı

1.4. Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyonel Aktivatör Ailesi

STAT ailesi, hedef genin ifadenmesinde, hormon, sitokin ve büyüme faktörlerinin etkilerinin düzenlenmesinde gizli sitoplazmik transkripsiyon faktörleridir. Memeli STAT proteinleri yedi üyeden oluşur. Bunlar; STAT1-4, STAT5a, STAT5b ve STAT6'dır^{28,32,33} (Şekil 6).



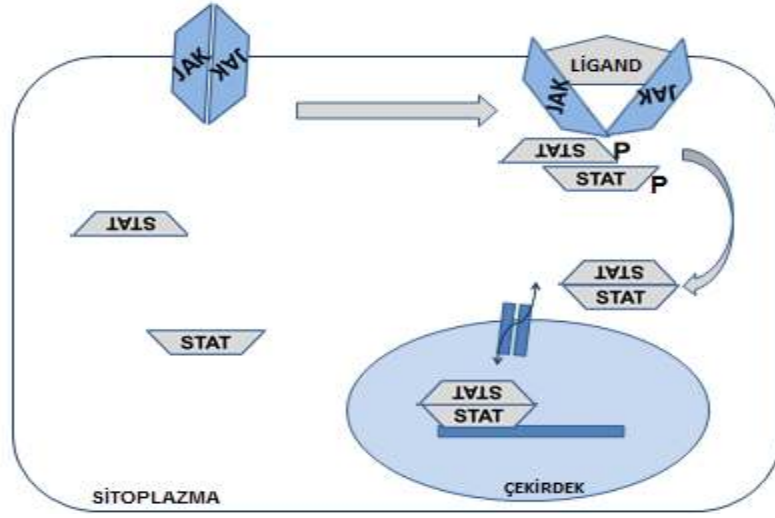
Şekil 6. STAT protein yapısı

Her bir STAT proteinin yedi fonksiyonel korunmuş bölgesi mevcuttur. Bunlar; aminouç bölge (NH2), kangal gibi kıvrılmış bölge (coiled-coil), DNA bağlama bölgesi (DBD), bağlayıcı bölge (LK), SH2 bölge, tirozin aktivasyon bölge ve transkripsiyonel aktivasyon bölgesi (TAD)'dir. NH2 bölgesi çok iyi korunmuştur. Fosforile olamayan STAT'lar arasında homotipik dimer oluşumunu desteklemektedir. Kangal gibi kıvrılmış bölge, düzenleyici proteinlerle ilişkilidir. Nükleer giriş-çıkışın kontrol sürecinden sorumlu tutulmaktadır. DNA bağlayıcı bölge nükleer

giriş-çıkışın düzenlenmesinden sorumlu tutulmaktadır. Bağlayıcı bölge, DNA bağlayıcı motif için görev yapar. SH2 bölgesi en çok korunmuş bölgedir. Aktif STAT dimerlerinin oluşumunun yanı sıra, reseptör zincirinde özel iç göç hareketine aracılık eder. Tirozin aktivasyon bölgesi, SH2 bölgesine benzerlik gösterir ve inaktif homodimerin dış yüzeyinde bulunur. Aktif bir uyum için gerekli kritik yapısal değişiklikleri yönetir. Transkripsiyonel aktivasyon bölgesi, STAT aile üyeleri arasında farklılık göstermektedir. Adından da anlaşılacağı gibi hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu düzenler^{28,29}.

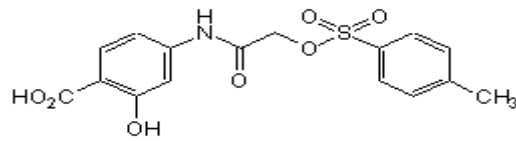
IL-6 ile uyarılan JAK/STAT3 yolağının aktive ettiği STAT, çeşitli süreçleri düzenler. Bunlar hücre yaşamı, çoğalması, anjiyogenez ve metastazında oldukça önemlidir. CaP'in de içinde bulunduğu pek çok kanser türünde, bu yolağın önemli rol oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu nedenle STAT3 anti-kanser ilaçlar için yeni moleküler hedef olarak kabul edilmektedir^{34,35,36}.

STAT3'ün baskılanması, kanser hücrelerinde Bcl-x, Bcl-2 ve MCL1 gibi anti-apoptotik gen düzeylerinin azalmasına, dolayısıyla hücrelerin apoptoza uğramasına yol açmaktadır^{35,36,37}. STAT3 tarafından aktive edilen genler anti-apoptotik davranışı ve hücre çoğalmasını düzenleyen genlerdir. Bunlar; survivin, VEGF, c-myc, siklin D1 ve MMP'lerdir. Fosforile olduktan sonra dimerler meydana getirirler ve aktif forma geçerler. Fonksiyonel hale gelebilmek için çekirdeğe giderler. Normal STAT aktivasyonu, büyüme faktörünün veya sitokinin reseptörlere bağlanması ve tirozin kalıntısının fosforilasyonu tarafından başlatılır. Çekirdekte aktive STAT dimeri, hedef genin promotor bölgesinde spesifik DNA elementlerine bağlanır³⁷ (Şekil 7).



Şekil 7. STAT dimerizasyonu

S3I-201, STAT3 aktivitesinin kimyasal prop inhibitörüdür. Uluslararası kanser enstitüsü kimyasal kütüphanesinde keşfedilmiştir. S3I-201, STAT3-STAT3 kompleks oluşumunu, STAT3 DNA bağlanmasını ve transkripsiyon faaliyetlerini, ayrıca tümör hücrelerinde apoptozun indüklenmesini ve büyümeyi engeller. STAT3'ün düzenlenmesini sağlayan genlerin ifadenmesini inhibe eder^{38,39}.



Şekil 8. S3I-201' in kimyasal yapısı

1.5. Janus Kinaz/Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyonel Aktivatör (JAK/STAT Yolağı)

Sitokinler, hücreler arası haberleşmede rol oynayan ve bazı biyolojik görevleri düzenleyen protein yapısındaki maddelerdir. Kontrollü hücresel yanıtı sağlamak için gereklidirler⁴⁰.

Membranda yerleşim gösteren protein kinazlar reseptör tirozin kinazlar (RTK) olarak adlandırılırlar. Sitoplazmada, hücreler arası sinyal iletiminde kritik rol oynarlar. Yaklaşık olarak 60 çeşit tirozin kinaz bulunmuştur ve reseptör olarak 20 alt aile daha içerir⁴¹. Bu reseptörler büyüme faktörleri ile bağlandıktan sonra aktif hale geçer ve sitoplazmadaki hedef proteinleriyle etkileşerek sinyal iletimini gerçekleştirirler. Ligand reseptör oligomerizasyonu reseptör alt ünitesinde tirozin otofosforilasyonu ile sonuçlanır⁴². Bir diğer önemli tirozin kinazlar, sitoplazmik tirozin kinazlardır ve bilinen 32 adet sitoplazmik tirozin kinaz mevcuttur. Sitoplazmik protein kinazlar arasında Src, Abl, fokal adezyon kinazı (FAK), janus kinaz (JAK) proteinleri yer almaktadır⁴². Membran tirozin kinazlar ile aynı şekilde sitoplazmik tirozin kinazların sürekli ve kontrolsüz aktivasyonu onkojenik sinyal iletimini hızlandırır.

JAK/STAT3 sinyal yolağı, hücreler arası sitokin sinyallerinin çekirdeğe iletilmesinde önemli bir yere sahiptir. Hücre büyümesi ve farklılaşmasını içeren hücresel olayları düzenler⁴³. Bu yüzden bu yolak onkojenezde kritik öneme sahiptir⁴⁰. Ayrıca JAK/STAT3 yolağı, IL-6 aracılığıyla uyarılmaktadır. IL-6, prostat, lösemi ve böbrek kanserinin de içinde olduğu pek çok farklı kanser tipinin büyüme ve farklılaşmanın düzenlenmesini sağlar. IL-6 insan CaP ve iyi huylu prostat hiperplazisinin hastalardan direkt incelenmiş ve metastatik CaP'da hastaların serumlarında IL-6 seviyesinde yükselme görülmüştür⁴⁴.

1.6.JAK/STAT3 Yolağının Negatif Düzenleyicileri

Birçok kanserin oluşumunda, JAK/STAT3 yolağının negatif geridönütlerinin kontrolündeki bozulmalar önemli rol oynamaktadır. JAK/STAT3 yolağı 3 protein ailesi tarafından negatif olarak kontrol edilir. Bunlar; aktive olmuş STAT aktivasyonunu inhibe eden protein (PIAS), SH2

(Scr-homoloji-2) içeren fosfatazlar (SHP& PTP), Sitokin sinyali baskılayıcı protein ailesi (SOCS)'dir^{45,40}.

PIAS:

STAT aktivasyonunu inhibe eden protein, son derece korunmuştur ve PIAS1, PIAS3, PIASx, PIASy proteinlerini içerir. Hedef DNA dizilerine bağlanarak transkripsiyonun baskılanmasında ve temel olarak çekirdekte görev yapmaktadır. PIAS proteinleri, JAK/STAT3 yolağının transkripsiyonel ko-regülatörü olarak önemlidirler^{46,27}.

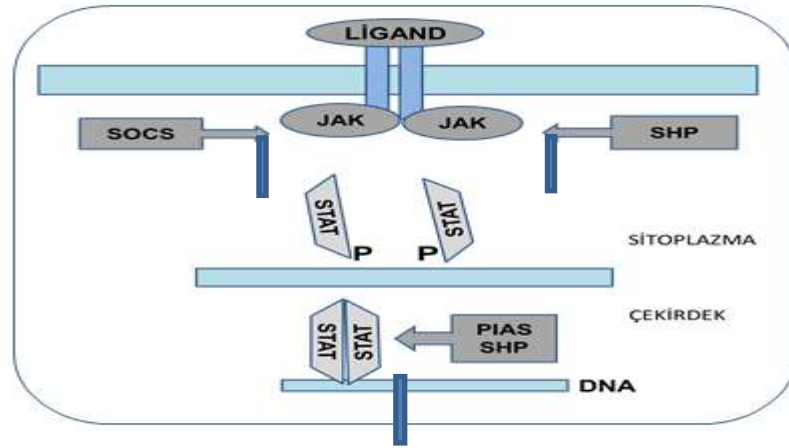
SHP:

SH2 içeren fosfatazlar (SHP), SOCS'a göre daha yeni keşfedilen inhibitör yapıda düzenleyici ajanlardır⁴⁰. Hücrede hızlı ve geri dönüşümlü bir süreç olan tirozin fosforilasyonunu hedef alan, protein tirozin fosfataz grubu proteinlerdir. JAK/STAT3 yolunu düzenleyen SHP1, SHP2, CD45 gibi fosfotazlar bu grupta yer alır⁴⁷. Yapısal olarak bulunan bu fosfotazlar, sitokin reseptörlerinin veya JAK'ın defosforilasyonu üzerinden inhibisyon yaptığı ileri sürülmektedir⁴⁰.

SOCS:

SOCS ailesi sekiz üyeden meydana gelmiştir. Bunlar; SOCS 1-7 ve CIS (sitokin indüklenebilir SH2 protein)'dir. SOCS üyelerinin ortak özellikleri, karboksi terminal ucunda SH2 ve SOCS kutusunun bulunmasıdır. Bu bölgelerin, bağlanılan alanın proteozomal yıkımında kritik rol oynadığı gösterilmiştir⁴⁸. JAK proteinine bağlanarak JAK'ların aktive olmasını durdururlar ve böylece STAT proteinlerinin JAK proteinlerine

bağlanmasını engellemiş olurlar. SOCS proteinlerinin ifadesinde IL-6 tarafından düzenlenme hızının artmış olduğu bulunmuştur^{46,27} (Şekil 9).



Şekil 9. JAK/STAT yolağının inhibitörleri

1.7. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

VEGF, polipeptit büyüme faktör ailesindendir ve en az 7 üyesi tanımlanmıştır⁴⁹. Yeni kan damarlarının oluşumu sürekli büyüyen tümörler için gereklidir. Birçok faktör, tümör hücrelerinde yeni kan damarlarının oluşmasına katkıda bulunur ancak VEGF bu faktörlerin en kritik olanları arasındadır. VEGF üretimi hipoksi ile uyarılır ve belli onkojenlerin aktivitesi, belli tümör süpresör genlerin inaktivasyonu veya protoonkojenler ile VEGF düzenlenmesi artırılabilir⁵⁰. VEGF gen ailesi VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD ve plasental büyüme faktöründen meydana gelmektedir⁵¹. VEGF ve VEGF reseptörünün (VEGFR) etkileşiminden sonra hücre içi sinyal iletiminin karakterizasyonunda, mitojen aktive eden protein kinaz kinazı (MAPK) yolunun ilişkili olduğu gösterilmiştir⁵². Yapılan çalışmalarda gösterilmiştir ki, STAT3 sinyalizasyonunu gerektiren ve IL-6 reseptörünün bir alt ünitesi olan glikoprotein 130 (gp130) tarafından kardiyak miyositlerde VEGF üretimi gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada farklı kanser hücrelerinde STAT3 aktivitesi ile VEGF aktivitesinin uyumu gösterilmiştir⁵³. VEGF proteini,

tirozin kinaz özelliği olan reseptörlerine (VEGFR1 ve VEGFR2) bağlanarak anjiyogenez sinyalini başlatır. Bu reseptörlerin aktivasyonu ile hücre içi sinyal proteinleri fosforile edilerek hücre çoğalması ve göçü meydana gelir. VEGFR1, hücre göçünde ve farklılaşmasında rol oynarken VEGFR2 hücre çoğalmasında ve sağ kalımında görev alır⁵⁴.

VEGFA, VEGF ligandlarının prototipidir⁵¹ ve tümör anjiyogenezinde önemli rol oynar. İki büyük reseptör tirozin kinaz (VEGFR1 ve VEGFR2) reseptörüne bağlanır⁴⁹. Yapılan çalışmalarda VEGF ifadenin düzeyinin, JAK/STAT3 sinyal yolağının aktivasyonu ile doğru orantılı bir şekilde arttığı gösterilmiştir⁵⁰.

Glioblastoma hücre serilerinde yapılan bir çalışmada, tümör hücrelerindeki VEGF salınımının TRAIL molekülü tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir. TRAIL ayrıca dokunun yeniden modellenmesini sağlayan MMP2 ve TIMP2'nin ifadesini de baskılamaktadır. Dolayısıyla TRAIL'in anjiyogenezin kontrol edilmesinde potansiyel bir inhibitör olduğu belirlenmiştir⁵⁵. STAT3 aracılığıyla aktive olan genler sadece anjiyogenez ile ilişkili genler olmayıp aynı zamanda bazı anti-apoptotik genlerin (Bcl-XL, MCL1) ifadesini de sağlayarak apoptozun baskılanmasında rol oynamaktadır^{56,57}.

Anti-apoptotik Bcl-2 ailesinin bir üyesi olan MCL1 (myeloid hücre lösemi-1), pro-apoptotik proteinler olan Bim ve Bid moleküllerini baskılar. Böylece TRAIL aracılığıyla uyarılan mitokondriyal yolaktaki apoptoz kontrol noktası olan mitokondri dış zar geçirgenliğinin bozulmasını engelleyerek apoptozu baskılar. MCL1 aşırı ifadesinin, lösemilerin ve CaP'nin de dahil olduğu çeşitli tümörlerin gelişiminde rol oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir⁵².

1.8. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)

STAT3 aracılığıyla indüklenen MMP'ler içerisinde MMP2, MMP9 ve MMP10 yer almaktadır³⁵. MMP'ler bir proteinaz ailesi üyesidir ve hücreler arası matriksi parçalama yeteneğine sahiptir. MMP ailesinin bugün 20'den fazla enzim çeşidi gösterilmiştir^{58,59}. MMP'ler hücreler arası yıkım, tümör hücrelerinin yayılımı, anjiyogenez ve metastaz gibi patolojik süreçlerde kritik rol oynamaktadır^{35,60}. STAT3 aktivasyonu, tümör yayılımı ve metastazı için hücreler arası matriksin parçalanmasından sorumlu tutulmaktadır³⁵.

Yapılan bir çalışmada, MMP2 ve MMP9'un ifadesindeki azalmanın, CaP hücre hattı olan PC3 hücrelerinde, kötü huylu davranışı ortadan kaldırdığı gösterilmiştir⁶¹. Başka bir çalışmada ise, prostat kanser hücrelerinde MMP2 ve TIMP'in ifadenme düzeylerinin arttığı ve bununla birlikte CaP'de MMP2 ve TIMP2'nin belirteç olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir⁶².

1.9. Tümör Nekroz Faktör İlişkili Apoptoz Sağlayan Ligand (TRAIL)

Apoptoz mekanizmasında üç temel grup rol alır. Bunlar; ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve protein parçalayan enzimlerdir (kaspazlar)⁶³. Ölüm reseptörleri, TNF (tümör nekroz faktör) reseptör gen ailesindendir. Bu reseptör ailesinin sitoplazmik bölümleri, ölüm alanı (Death Domain) adı verilen bir aminoasit dizisi içerir ve adaptör proteinlere bağlanır. Bilinen altı adet ölüm reseptörü vardır. Bunlar; CD95, TRAILR1, TRAILR2, TNF-R1, DR3 ve DR6'dır. TRAIL, TNF ligand ailesinin bir üyesidir ve hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri DR4 ve DR5'e bağlanır. Bu reseptörlere bağlanma apoptozu başlatır^{64,65,66}.

Yapılan bir çalışmada, prostat kanser hücre hatlarında MCL1 ifade artışının TRAIL aracılı apoptozu baskıladığı gsterilmiřtir⁶⁷. Başka bir çalışmada ise MCL1'in, hücre ölümünü engelleyerek kanser hücrelerinde TRAIL direncine aracılık ettiği bildirilmiřtir⁶⁸.

Epling-Burnette ve ark'larının yapmış oldukları çalışmada JAK2 inhibitörü olan AG490'ın STAT3'n DNA'ya bağlanma aktivesini azalttığını ve MCL1 ifadelenmesinin baskılanmış olduğunu, buna bağlı olarak da apoptozun meydana geldiğini göstermişlerdir. Bu alışma da STAT3 aracılığı ile kontrol edilen anti-apoptotik Bcl-XL geninin yanı sıra bir diğer anti-apoptotik gen olan MCL1'inde baskılandığı gsterilmiřtir⁶⁹.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar

- Biyogüvenlik kabini (DanLaf, Danimarka)
- Karbondioksitli etüv (Sanyo, Japonya)
- Floresan ataçmanlı mikroskop (Olympus BX-50, Japonya)
- Hassas terazi (AND-ER-182A, Japonya)
- Hybaid PCR-Sprint otomatik ısı döngü cihazı (Thermo Scientific, ABD)
- Işık mikroskobu (DCM 4000, Leica, Almanya)
- LightCycler Real-Time PCR cihazı (Roche, Almanya)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000) (Thermo Scientific, ABD)
- Mikroplaka ELIZA okuyucu (Spectramax M3, Molecular Devices, ABD)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22 R, Almanya)
- pH metre (WTW 422, Almanya)
- Hassas terazi (AND-ER-182A, Japonya)
- Manyetik karıştırıcı (TMA 2071, Almanya)
- Spin vorteks (Biosan, Rusya)
- Mikropipetler, 10µL, 100µL, 100µL (Bt10, Bt100, Bt1000 Biohit, CLP, ABD)
- Derin dondurucu, -30°C (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu, -86°C (Sanyo, Japonya)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

3.2. Kullanılan Sarflar

- Hücre üreme flaskaları, 25cm² ve 75cm² (Corning, ABD)
- Petriler, 35mm, 60mm ve 100mm (Corning, ABD)
- Hücre kryo (dondurma) ampülü (Greiner, Almanya)
- Kültür tüpleri (Corning, ABD)
- Mikrosantrifüj tüpleri (CLP, Almanya)

3.3. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı

3.3.1. % 10'luk RPMI 1640 Besiyerinin Hazırlanışı

- 450 ml RPMI 1640 besiyeri içerisine, 50 ml FBS ve 200 mM L-glutaminden 10 ml, 100 IU/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin karışımından 10 ml eklenerek %10'luk RPMI 1640 besiyeri hazırlandı.

3.3.2. % 1'lik RPMI 1640 Besiyerinin Hazırlanışı

- 495 ml RPMI 1640 besiyeri içerisine, 5 ml FBS, 200 mM L-glutaminden 10 ml, 100 IU/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin karışımından 10 ml eklenerek %1'lik RPMI 1640 besiyeri hazırlandı.

3.3.3. Hücre Lizis Solüsyonunun Hazırlanışı

- 10X olarak ticari şekilde satılan hücre lizis solüsyonundan (Roche, Almanya) 1 ml alarak, 9 ml distile su ile 1X yapıldı.

3.3.4. Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF)

- Hassas terazide 0.3484 gr PMSF tartılarak, 10 ml etanol içerisinde çözüldü.

3.3.5. KH₂PO₄ (Potasyum Dehidrojen Fosfat) Solüsyonunun Hazırlanışı

- Hassas terazide 4.8 gr KH₂PO₄ tartılarak, 500 ml içerisinde çözüldü.

3.3.6. Na₂HPO₄ (disodyum fosfat) Solüsyonunun Hazırlanışı

- Hassas terazide 5.33 gr Na₂HPO₄ tartılarak, 500 ml içerisinde çözöldü.

3.3.7. Tuz Sodyum Sitrat Solüsyonu (20 X SSC)

- Hassas terazide 175.3 gr sodyum klorür (NaCl) ve 88.2 gr sodyum sitrat (Na₃C₆H₅O₇.H₂O) tartılarak 100 ml distile su içerisinde çözöldü ve ph'sı 7.4'e ayarlandı.

3.3.8. Fosfat Tampon (fiksasyon) Solüsyonu

- Hassas terazide 0.8 gr sodyum klorür (NaCl), 0.034 gr potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄), 0.21 gr dipotasyum fosfat (K₂HPO₄) tartıldı. Karışım 100 ml distile su içerisinde çözöldü ve ph'sı 7.0'a ayarlandı.

3.3.9. Sodyum Sitrat,Triton-X 100 Solüsyonu

- Hazırlanan 20 X SSC solüsyonundan 100µl ve Triton X-100' den 100µl mikropipet yardımı ile alınarak, 500 ml distile su içerisinde çözölmesi sağlandı.

3.4. LNCaP Hücre Hattı

Bu çalışmadaki, LNCaP ve PC3 insan prostat hücre hatlarımız, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Levent TÜRKERİ' den temin edilmiştir.

3.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Ambresco, ABD)
- RPMI-1640 besiyeri (Gibco, ABD)
- Fetal sığır serumu (FBS) (inaktif) (HyClone, Thermo, ABD)
- Penisilin/Streptomisin (HyClone, Thermo, ABD)
- Glutamin (HyClone, Thermo, ABD)
- Tripsin-EDTA (HyClone, Thermo, ABD)
- Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) (Roche, Almanya)
- Primer (GAPDH, STAT3, VEGFA, VEGFC, VEGFR2, MCL1, MMP2, CASP8, CASP9) (Alfa DNA, Almanya)
- Etanol (Sigma, ABD)
- Hücre Lizis Solüsyonu (Roche, Almanya)
- JAK inhibitör Tyriphostin-AG490 (Bioshop, ABD)
- Rekombinant İnsan IL-6 (Raybiotech, ABD)
- STAT3 inhibitör S3I-201 (Calbiochem, Ukrayna)
- TRAIL sentetik peptit (ABR, Thermo, ABD)

3.6. Kullanılan Kitler

- Hücre Proliferation Kiti I (WST-1) (Roche, Almanya)
- High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche, Almanya)
- PathScan® pSTAT Sandwich ELISA Kit (try 705)
- TaqMan Master Mix (Roche, Almanya)
- Transcriptor high fidelity cDNA Sentez Kiti (Roche, Almanya)
- BCA protein tayin kiti (Thermo, USA)
- Apoptoz kiti (İn situ Cell death Detection Kit, Flourescein)(Roche, Almanya)

3.7. Yöntemler

3.7.1. Hücre Kültürü

LNCaP hücreleri, %10'luk RPMI-1640 besiyerinde %95 nem ve %5 CO₂'li ortamda 37°C'de kültüre edilerek çoğaltıldı.

Hücreler 1 ng/ml, 2.5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml ve 100 ng/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde IL-6 ile 24, 48, 72 saat inkübe edildi. DMSO çözücü kontrolü olarak kullanıldı ve aynı süre için inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında yapılan analizler sonucunda IL-6' nın her bir dozdaki proliferatif etkisi belirlendi. Her bir konsantrasyon için 4 ayrı kültür yapılarak deney tekrarlandı.

Hücreler 1 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM 100 µM konsantrasyonlarda olacak şekilde AG490 ile 24 ve 48 saat inkübe edildi. DMSO çözücü kontrolü olarak kullanıldı ve aynı süre için inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında yapılan analizler sonucunda AG490'nın her bir dozdaki sitotoksik ve apoptotik etkileri belirlendi. Her bir konsantrasyon için 4 ayrı kültür yapılarak deney tekrarlandı.

Hücreler 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M konsantrasyonlarda olacak şekilde STAT3 inhibitör S3I-201 ile 24 ve 48 saat inkübe edildi. DMSO çözücü kontrolü olarak kullanıldı ve aynı süre için inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında yapılan analizler sonucunda IL-6' nın her bir dozdaki sitotoksik ve apoptotik etkileri belirlendi. Her bir konsantrasyon için 4 ayrı kültür yapılarak deney tekrarlandı.

Hücreler 0, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde TRAIL ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. LNCaP hücrelerine inkübasyon sonrasında yapılan analizler sonucunda TRAIL' in her bir dozdaki apoptotik etkileri belirlendi. Her bir konsantrasyon için 4 ayrı kültür yapılarak deney tekrarlandı.

Hücreler 0, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, konsantrasyonda olacak şekilde TRAIL, 25 ng/ml IL-6, 50 μ M AG490 ve 300 μ M S3I-201 ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. LNCaP hücrelerine inkübasyon sonrasında yapılan analizler sonucunda TRAIL'in, IL-6, AG490 ve S3I-201 ile kombinasyonunda apoptotik etkileri belirlendi. Her bir konsantrasyon için 3 ayrı kültür yapılarak deney tekrarlandı.

3.7.2. WST-1 Sitotoksite Deneyi

LNCaP hücrelerinde IL-6, AG490 ve S3I-201 uygulamasının hücrelerin canlılığı üzerine olan etkilerinin belirlenmesi için kolorimetrik WST-1 yöntemi kullanıldı. Bu yöntem, metabolik olarak aktif olan

hücrelerin mitokondrilerinde, pembe renkli tetrazolyum tuzu olan WST-1 molekülünün parçalanıp sarı renkli formazan oluşturmasını temel almaktadır. Bu dönüşüm sadece canlı hücrelerde olur. Oluşan çözünmüş haldeki formazan boyası doğrudan spektrofotometrik olarak okunur. Canlı hücrelerin sayısındaki artış, absorbans düzeyi ile belirlenen sarı renkli formazan miktarı ile uyum gösterir. LNCaP hücrelerinde IL-6, S3I-201, AG490, IL-6 + AG490 , IL-6 + S3I-201, TRAIL + IL-6 , TRAIL + AG490, TRAIL + S3I-201, TRAIL + AG490 + IL-6 ve TRAIL + S3I-201 + IL-6 kombinasyonlarının hücrelerin canlılığı üzerine olan etkilerinin belirlenmesi için WST-1 kolorimetrik kiti (Roche, Germany) kullanıldı. Aynı pasaj numarasına sahip LNCaP hücreleri, hücre kültür kaplarının %70'ini kapladığında besiyerleri uzaklaştırıldı. Tripsin-EDTA karışımı kullanılarak hücrelerin tabandan ve birbirlerinden ayrılması sağlandı. 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra pelet üzerine %1 FBS içeren RPMI-1640 eklendi. Daha sonra hücreler hücre sayım cihazı (Cedex XS Innovatis, Roche) ile sayıldı. Hücreler, hücre sayısının sabit kalarak kuyucuklara yapışması için, %1 FBS içeren RPMI-1640 içerisinde homojen süspansiyon haline getirildikten sonra her kuyucuğa 5000 hücre / 100µL çekilerek 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. Hücreler 37°C ve %5 CO₂'li etüvde bir gece inkübe edildikten sonra besiyerleri uzaklaştırıldı. Belirtilen dozlarda LNCaP hücrelerine sırasıyla IL-6, S3I-201, AG490, IL-6 + AG490, IL-6 + S3I-201, TRAIL + IL-6, TRAIL + AG490 ve TRAIL + S3I-201, TRAIL + AG490 + IL-6, TRAIL + S3I-201 + IL-6 ilave edilerek %1'luk FBS içeren besiyerinde, 24, 48 ve 72 saat süreyle 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Belirtilen sürelerin sonunda her bir kuyucuktaki besiyeri uzaklaştırılıp yerine 100 µL fenol redsiz RPMI-1640 besiyeri ve 10 µL WST-1 eklendi. Formazan ürününün oluşturduğu renk değişimi 4 saat sonunda mikroparka ELIZA okuyucu ile 450 nm dalga boyu aralığında belirlendi. Negatif kontroller sıfır absorbans değeri olarak kullanıldı.

3.7.3. Protein İzolasyonu

IL-6, IL-6 + AG490, IL-6 + S3I-201, AG490, TRAIL ve S3I-201' in belirli dozları ile inkübe edilen LNCaP hücrelerinde inkübasyon sürelerinin dolmasının ardından aşağıda yer alan basamaklar uygulandı.

- 1- Hücreler tripsin ile kaldırıldı.
- 2- Falkona alınan hücreler 1200 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi.
- 3- Falkonun üzeri döküldü ve 1mM PMSF içeren 500 µl hücre lizis solüsyonu (CLB) eklenerek 1,5 ml'lik ependorflara alındı.
- 4- Buz üzerinde 5 dakika bekletildi ve 10000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi.
- 5- 20 saniye 10 MHz' de sonikasyon yapıldı.
- 6- Hücreler tekrar 10 dakika 10000 rpm' de santrifüj edildi.
- 7- Süpernatant protein olarak ayrı bir ependorfa alındı.

3.7.4. Protein Miktar Tayini

İnkübasyon süresi sonunda steril flasklarda ekili bulunan hücrelerden protein izolasyonu, "BCA (biçinkonik asit) Protein Ölçüm Kiti" kullanılarak ve aşağıda yazılı olan basamaklar takip edilerek yapıldı. Kontaminasyonu engellemek amacı ile saflaştırma işlemi biyogüvenlik kabininin içinde gerçekleştirildi.

- 1- Kit içerisinde bulunan albümin ile 2, 1, 0.5; 0.25; 0.125 ve 0 konsantrasyonlarda PBS (Fosfat tampon solüsyonu) kullanılarak standartlar hazırlandı.

- 2- Örnekler ve standart 96'lık mikrolakanın her bir kuyucuğuna 25 µl eklendi.
- 3- Reaktif B:reaktif A, 1:50 olacak şekilde sulandırıldı.
- 4- Her bir kuyucuğa sulandırılan reaktiften 200 µl eklendi.
- 5- Mikrolaka 37°C' lik inkübatörde 30 dakika bekletildikten sonra 450 nm dalga boyunda ELIZA cihazı ile okundu.

3.7.5. FosfoSTAT-3 (pSTAT3) Düzeyinin ELIZA Yöntemi ile Belirlenmesi

LNCaP hücrelerinin belirlenen doz ve sürede inkübasyonlarının ardından, reaksiyon sonlandırılıp protein izolasyonları yapıldı. BCA kiti ile protein miktarları belirlendikten sonra protein örnekleri fosfoSTAT-3 (Tyr705) sandwich ELIZA kiti kullanılarak pSTAT3 miktar tayini aşağıdaki basamaklara göre yapıldı.

- 1- Örnek dilüsyon solüsyondan 100 µl, örnekten 100 µl alınarak, örnekler dilüe edildi. Dilüe edilen karışımdan 100 µl alınarak STAT3 tavşan monoklonal antikor ile kaplı mikro kuyucuklara eklendi.
- 2- Kuyuların üzeri bir bant yardımıyla sıkıca kapatılarak bir gece +4 °C'de beklemeye bırakıldı.
- 3- Kuyuların içeriği boşaltıldıktan sonra 4'er defa 200 µL 1X yıkama tamponu ile yıkandı.
- 4- FosfoSTAT-3 (Tyr 705) primer antikor 100 µl her bir kuyucuğa eklendi. Kuyuların üzeri bir bant yardımıyla sıkıca kapatılarak 1 saat 37 °C' de inkübasyona bırakıldı.
- 5- Belirlenen süre dolduğunda, dört defa 200 µL 1X yıkama tamponu ile yıkandı.

- 6- Anti fare IgG HRP-bağlı ikincil antikordan 100 µl her bir kuyucuğa eklendi. Kuyuların zeri bir bant yardımıyla sıkıca kapatılarak 30 dakika 37 ° C' de bekletildi.
- 7- Belirlenen süre dolduğunda, dört defa 200 µL 1X yıkama tamponu ile yıkandı.
- 8- Her bir kuyucuğa 100 µl TMB substrat eklendi. Kuyuların zeri bir bant yardımıyla sıkıca kapatılarak 10 dakika 37 ° C' de bekletildi.
- 9- Renksiz olan TMB eklendikten sonra peroksidaz tepkimesinin belirteci olan mavi renk dönüşümü gerçekleşti.
- 10- Belirlenen süre dolduğunda, mikrolaka çıkarılarak 100 µl durdurma solüsyonu eklendi ve 450 nm dalga boyunda ELIZA cihazında okuma yapıldı.

3.7.6. Aktif Kaspaz 3 Düzeyinin ELIZA Yöntemi ile Belirlenmesi

1. LNCaP hücre hatları 6 kuyulu kültür kaplarında her bir kuyuya 10⁶ hücre gelecek şekilde ekildi. Hücelere daha önce belirtilen miktarda IL6, AG490, S3I-201 ve TRAIL verilerek uygun sürelerde inkübe edildi. Her bir konsantrasyon için deney iki tekrarlı yapıldı.
2. Elde edilen hücre lizatlarından protein izolasyon yöntemi yapıldı.
3. Elde edilen hücre lizatlarından 100 µL antikor ile kaplanmış mikrolaka kuyularına dağıtıldı.
4. Kuyuların zeri bir bant yardımıyla sıkıca kapatılarak, 4°C'de bir gece bekletildi.
5. Kuyuların içeriği boşaltıldıktan sonra 4'er defa 200 µL 1X yıkama tamponu ile yıkandı.

6. Her bir kuyucuğa 100 µL primer antikör eklendi. Kuyucukların üzeri bir bant yardımıyla sıkıca kapatıldı. 37 °C'de 1 saat süreyle bekletildi.
7. Dört defa 200 µL 1X yıkama tamponu ile yıkandı.
8. Örneklerin üzerine 100 µL yaban turpu peroksidazı (HRP) bağlanmış ikincil antikör eklendi. Kuyucukların üzeri bir bant yardımıyla sıkıca kapatıldıktan sonra 37 °C'de 30 dk süreyle inkübe edildi.
9. Örnekler 4 defa 200 µL 1X yıkama tamponu ile yıkandı.
10. Her bir kuyuya 100 µL TMB substratı eklendi. Kuyucukların üzeri bir bant yardımıyla sıkıca kapatılıp 37 °C'de 10 dk süreyle inkübe edildi.
11. Renksiz olan TMB eklendikten sonra peroksidaz tepkimesinin belirteci olan mavi renk dönüşümü gerçekleşti.
12. Her bir kuyucuğa 100 µL durdurucu solüsyon eklendi. Durdurucu solüsyonun eklenmesinden bir süre sonra mavi olan rengin sarı renge dönüştüğü gözlemlendi.
13. Sarı renk oluşumu görüldükten sonra mikropilaya okuyucu ile 450 nm dalga boyundaki absorbans değerleri okundu.
14. İlaç uygulanmamış hücrelerden elde edilen absorbans değeri bir olarak kabul edilip ilaç uygulanan hücrelerdeki aktif kaspaz 3 miktarı belirlendi.

3.7.7. Hücre Kültüründen Total RNA Saflaştırılması

İnkübasyon süresi sonunda steril flasklarda ekili bulunan hücrelerden RNA izolasyonu, "High Pure RNA Isolation Kiti" kullanılarak, aşağıda yazılı olan protokole göre yapıldı. Kontaminasyonu engellemek amacı ile saflaştırma işlemi biyogüvenlik kabininin içinde gerçekleştirildi.

- 1- Hücrelerin üzerine 200 µl PBS ve 400 µl Lizis tamponu eklenip 15 saniye vortekslendi.
- 2- Filtre, toplama tüpüne yerleştirilip tüm karışım filtre üstüne aktarıldı. 9000 rpm' de 15 saniye santrifüj edildi.
- 3- Toplama tüpünde toplanan sıvı atılıp filtre aynı tüpe tekrar yerleştirildi.
- 4- Her bir örnek için 90 µl DNaz İnkübasyon tamponu steril tüpe alındı ve 10 µl DNaz I eklendi. Pipetaj ile karıştırıldıktan sonra karışım filtrenin ortasına bırakıldı. 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 5- Birinci yıkama tamponu filtre üzerine 500 µl eklendi ve 9000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Filtre altında toplanan kısım atıldıktan sonra aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
- 6- İkinci yıkama tamponu filtre üzerine 500 µl yerleştirildi ve 15 saniye 9000 rpm' de santrifüj edildi. Filtre altında toplanan kısım atıldıktan sonra aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
- 7- Üçüncü yıkama tamponu filtre üzerine 200 µl eklendi ve 3 dakika 13500 rpm'de santrifüj edildi.
- 8- Toplama tüpü atıldı. Filtre, steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- 9- Filtre üzerine 20 µl örnek seyrelti çözeltisi eklendi ve 9000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 10- Elde edilen RNA' ların miktarları ve saflığı "NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre" cihazında ölçülerek RT-PCR' da kullanılabilecek kadar - 80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.7.8. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Elde edilen RNA'lar spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlendi. Primer

olarak random hekzamerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 1'de verilmiştir. cDNA için PCR karışımı ince çeperli 0.2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine dağıtıldıktan sonra saflaştırılan total RNA eklendi.

Tablo 1: RT-PCR tepkime karışımı.

	Son Konsantrasyon	Hacim
Steril H ₂ O-PCR grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu	1x (8mM MgCl ₂)	4Ml
Dntp	1Mm	2Ml
Random hekzamer primeri	60µM	2µL
RNaz inhibitörü	20 ünite	0.5µL
Transcriptor Ters Transkriptaz	10 ünite	0.5µL
Total RNA	1µg	1µg olacak şekilde

3.7.9. cDNA Ters Transkriptaz PCR (RT-PCR) Programı

Otomatik ısı döngüsü cihazı, Tablo 2'de belirtilen programa ayarlanarak cDNA ters transkripsiyon polimeraz zincir tepkimesi uygulandı.

Tablo 2. Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program.

	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Primer Bağlanması	25°C	10dk	1
Ters transkripsiyon	50°C	60dk	1
İnaktivasyon	85°C	5dk	1
Soğutma	4°C	-	1

Reaksiyon sonucu cDNA örnekleri Real-Time PCR' da kullanılıncaya kadar -20°C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.7.10. Gen İfadesinin Real-Time PCR İle Belirlenmesi

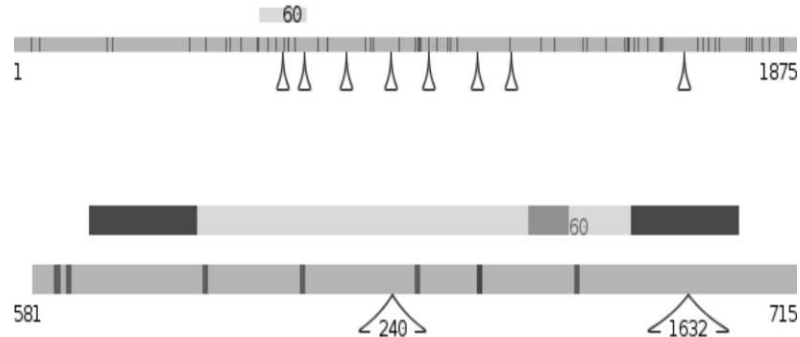
GAPDH, VEGFA, VEGFC, VEGFR2, STAT3, MMP2, MCL1, CASP8 ve CASP9 genlerinin mRNA miktarları, Real-Time PCR yöntemi ile Light Cycler (LC) 480 cihazı kullanılarak belirlendi. Amplifikasyonlar 20 µL toplam tepkime hacmi içerisinde; cDNA, mRNA' ya özgü primerler, UPL probu, LightCycler TaqMan Master karışımı ve distile su kullanılarak gerçekleştirildi. VEGFA, VEGFC, VEGFR2, STAT3, MMP2, MCL1, CASP8 ve CASP9 gen ifade miktarlarını normalize etmek için GAPDH mRNA düzeyi referans olarak alındı.

3.7.10.1. GAPDH Primer ve Probenun cDNA Üzerindeki Yerleşimi

GAPDH genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin cDNA' daki yerleşimi ise Şekil 11'de gösterildi.

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	20	591 - 610	59	60	gctctctgctcctcctgttc
Right	20	686 - 705	59	50	acgaccaaatacgttgactc

Şekil 10. GAPDH primer dizaynı



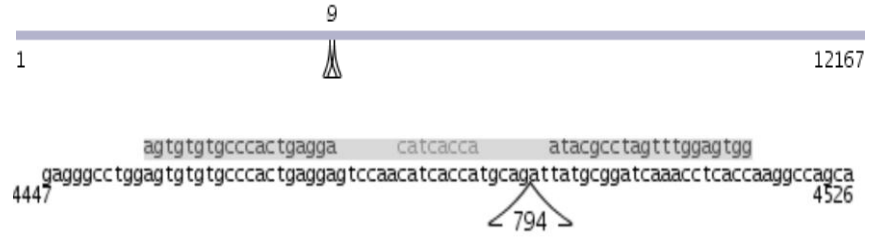
Şekil 11. GAPDH mRNA' sının belirlenmesinde kullanılan primerlerin cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000229239.5 giriş no'lu dizi)

3.7.10.2. VEGFA Primer ve Probenin cDNA Üzerindeki Yerleşimi

VEGFA genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin cDNA' daki yerleşimi ise Şekil 13'de gösterildi.

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	19	4457 - 4475	60	58	agtgtgtgcccactgagga
Right	20	4497 - 4516	60	50	ggtgaggtttgatccgcata

Şekil 12. VEGFA primer dizaynı



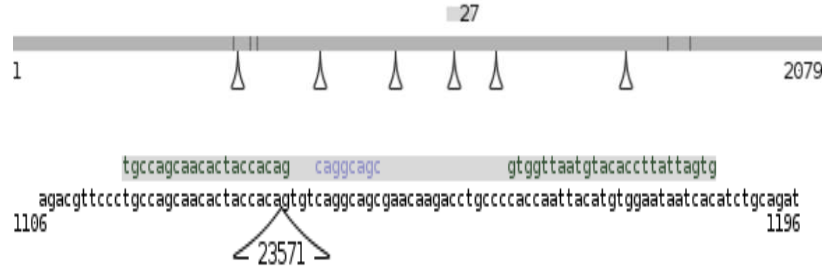
Şekil 13. VEGFA mRNA' sının belirlenmesinde kullanılan primerlerin cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans:ENST00000480614.1 giriş no' lu dizi)

3.7.10.3. VEGFC Primer ve Probenin cDNA Üzerindeki Yerleşimi

VEGFC genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin yerleşimi ise Şekil 15' de gösterildi.

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	20	1116 - 1135	60	55	tgccagcaacactaccacag
Right	25	1162 - 1186	59	36	gtgattattccacatgtaattggtg

Şekil 14. VEGFC primer dizaynı



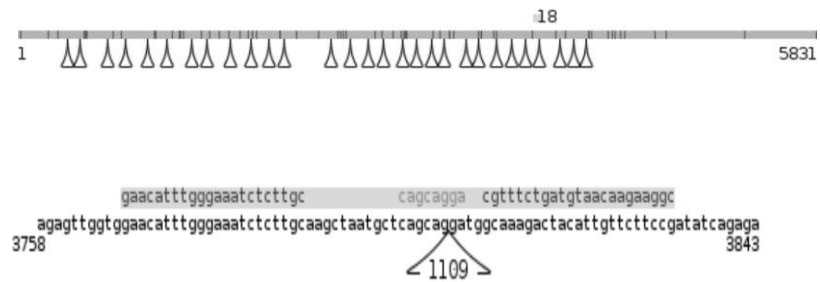
Şekil 15. VEGFC mRNA' sının belirlenmesinde kullanılan primerlerin cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000280193.1 giriş no' lu dizi)

3.7.10.4. VEGFR2 Primer ve Probenun cDNA Üzerindeki Yerleşimi

VEGFR2 genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin yerleşimi ise Şekil 17'de gösterildi.

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	22	3768 - 3789	59	41	gaacatttgggaaatctcttgc
Right	23	3811 - 3833	60	43	cggaagaacaatgtagtcttgc

Şekil 16. VEGFR2 primer dizaynı



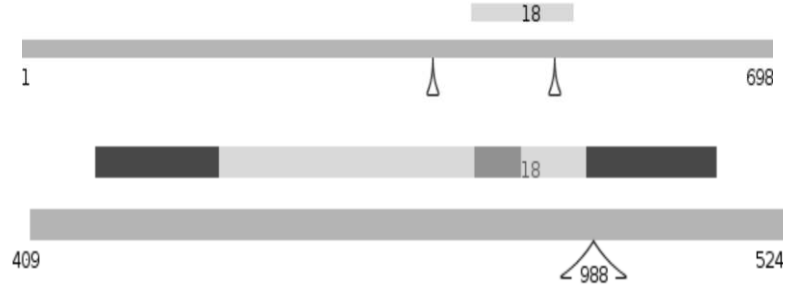
Şekil 17. VEGFR2 mRNA' sının belirlenmesinde kullanılan primerlerin cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000263923.4 |ENSG00000128052.7 giriş dizi)

3.7.10.5. STAT3 Primer ve Probunun cDNA Üzerindeki Yerleşimi

STAT3 genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin yerleşimi ise Şekil 19’da gösterildi.

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	20	419 - 438	59	45	ccccgcactttagattcatt
Right	21	494 - 514	59	52	catgtcaaaggtgagggactc

Şekil 18. STAT3 geninin primer dizaynı



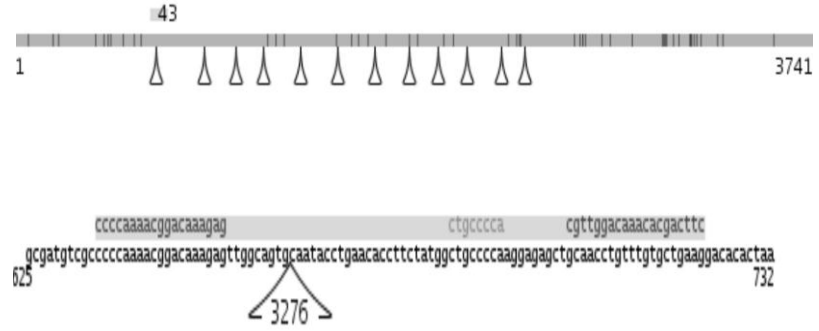
Şekil 19. STAT3 mRNA’sının belirlenmesinde kullanılan primerlerin cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000462269.1 giriş dizi)

3.7.10.6. MMP2 Primer ve Probunun cDNA Üzerindeki Yerleşimi

MMP2 genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin yerleşimi ise Şekil 21’de gösterildi.

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	19	635 - 653	60	53	ccccaaaacggacaaagag
Right	20	703 - 722	59	50	cttcagcacaaacaggttgc

Şekil 20. MMP2 geninin primer dizaynı



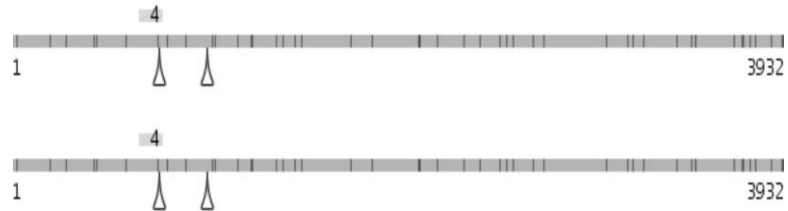
Şekil 21. MMP2 mRNA' sının belirlenmesinde kullanılan primerlerin cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000219070.4giriş dizi)

3.7.10.7. MCL1 Primer ve Probenin cDNA Üzerindeki Yerleşimi

Anti-apoptotik MCL1 genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin yerleşimi ise Şekil 23'de gösterildi.

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	18	649 - 666	60	56	aagccaatgggcaggtct
Right	19	751 - 769	59	47	tgteccagtttcgaagcat

Şekil 22. MCL1 geninin primer dizaynı:



Şekil 23. MCL1 mRNA' sının belirlenmesinde kullanılan primerlerin cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans:ENST00000369026.2 giriş dizi)

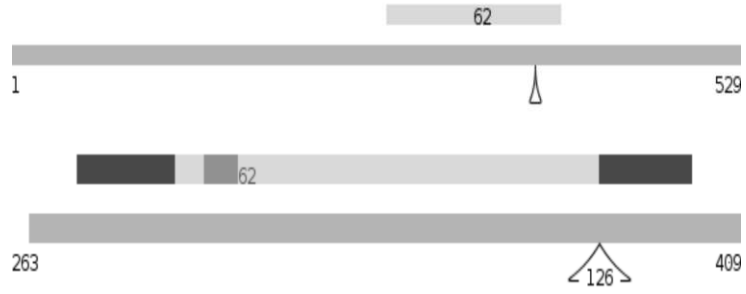
3.7.10.8. CASP8 Primer ve Probonun cDNA Üzerindeki

Yerleşimi:

CASP8 genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin yerleşimi ise Şekil 25’de gösterildi.

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	21	273 - 293	59	38	gcatttccaattctctggttttg
Right	20	380 - 399	59	60	ctctggaggctcaaggagac

Şekil 24. CASP8 geninin primer dizaynı



Şekil 25. CASP8 mRNA’ sının belirlenmesinde kullanılan primerlerin cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000490965.1|ENSG00000003402.10)

3.7.10.9. CASP9 Primer ve Probonun cDNA Üzerindeki

Yerleşimi

CASP9 genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin yerleşimi ise Şekil 27’de gösterildi.

CASP9 Forward primer: 5'-CCATATGATCGAGGACATCCA-3'

CASP9 Reverse primer: 5'-GACTCCCTCGAGTCTCCAGAT-3'

27 numaralı prob dizisi: 5'-CAGGCAGC-3'

Şekil 26. CASP9 geninin primer dizaynı

5' -CCATATGATC

61 CAGGTGGACCAGCTCTGGGACGCCCTGCTGAGCCGCGAGCTGTTTCAGGCCCATATGATC

GAGGACATCCA-3' 5' -CAGGCAGC-3'

121 GAGGACATCCAGCGGGCAGGCTCTGGATCTCGGCGGGATCAGGCCCAGGCAGTGATCATA

3' -TAGACCTCTGAGCTCCCTCAG-5'

181 GATCTGGAGACTCGAGGGAGTCAGGCTCTTCCTTTGTTTCATCTCCTGCTTAGAGGACACA

3.7.11. GAPDH, VEGFA, VEGFC, VEGFR2, STAT3, MMP2, MCL1, CASP8, CASP9 Genleri için Real Time PCR Tepkime Karışımları

Tablo 3: GAPDH, VEGFA, VEGFC, VEGFR2, STAT3, MMP2, MCL1, CASP8 ve CASP9 Real-Time PCR tepkime karışımı:

3.7.12. Light Cyclers (LC) 480 Deney Programı

Real-Time PCR karışımları hazırlandıktan sonra 96'lık çok kuyucuklu plakalara dağıtıldı ve üzerine cDNA' lar eklendi. Üzeri şeffaf kapatıcı ile kapatıldı ve cihaza yerleştirildikten sonra Tablo 4'de belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. GAPDH, VEGFA, VEGFC, VEGFR2, STAT3, MMP2, MCL1, CASP8 ve CASP9 genleri için aynı program kullanıldı.

Reaksiyon sonucu, GAPDH, VEGFA, VEGFC, VEGFR2, STAT3, MMP2, MCL1, CASP8 ve CASP9 genlerinin mRNA ifade düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri belirlendi. VEGFA, VEGFC, VEGFR2, STAT3, MMP2, MCL1, CASP8 ve CASP9 ifade düzeyleri GAPDH ifade düzeyine göre normalize edildi.

Tablo 4: GAPDH, VEGFA, VEGFC, VEGFR2, STAT3, MMP2, MCL1, CASP8 ve CASP9 genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı.

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)				
Program Verisi		Değer		
Döngüler		1		
Analiz Modu		-		
Sıcaklık Hedefleri		Kısım 1		
Hedef Sıcaklık (°C)		95		
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)		10:00dk		
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)		4.40		
Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)				
Program Verisi		Değer		
Döngüler		50		
Analiz Modu		Çoğalma		
Sıcaklık Hedefleri		Kısım 1	Kısım 2	Kısım3
Hedef Sıcaklık (°C)		95	60	60
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)		10sn	20sn	1
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)		4.40	2.20	4.40
Program 3. Soğutma				
Program Verisi		Değer		
Döngüler		1		
Analiz Modu		-		
Sıcaklık Hedefleri		Kısım 1		
Hedef Sıcaklık (°C)		40		
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)		30sn		
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)		2.20		

3.7.13. Tunel ile Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesi

LNCaP insan prostat hücre hatlarına IL-6, IL-6+AG490, IL-6+S3I-201, IL-6+AG490+TRAIL ve IL-6+S3I-201+TRAIL belirlenen dozlarda ve belirlenen saat süresince 37° C' de inkübe edildi.

1. Hücreler 5 dakika PBS solüsyonu ile muamele edildi.
2. Buz içerisindeki sodyum sitrat-triton X-100 solüsyonu içerisinde 2 dakika muamele edildi.
3. Preparat kurumaya bırakıldı.
4. Deneyin bu aşamasından sonra karanlıkta devam edildi.
5. Preparata 50 µl TUNEL karışımı eklenip lamel ile kapatıldıktan sonra 1 saat 37° C de bekletildi.
6. Üç defa 3 dakika PBS ile yıkama yapıldı.
7. Preparat kurumaya bırakıldı.
8. Preparat kuruduktan sonra 10 µl DAPI eklenerek lamel ile kapatıldı ve 10 dakika +4° C de bekletilmesinin ardından floresan mikroskopunda hücrelerin analizi yapıldı.

3.7.14. Gimza ile Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesi

LNCaP insan prostat hücre hatlarına IL-6, IL-6+AG490, IL-6+S3I-201, IL-6+AG490+TRAIL ve IL-6+S3I-201+TRAIL belirlenen dozlarda ve belirlenen saat süresince 37° C' de inkübe edildi.

1. Belirlenen süre sonunda hücreler tripsin ile kaldırıldı.
2. 1500 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi.
3. Üst sıvı döküldü ve hücreler PBS ile 2 defa yıkandı.
4. Asetik asit/Metanol fiksatif ile hücreler soğuk lam üzerine fikse edildi.
5. Preparat kurumaya bırakıldı ve Gimza boyası ile 5 dk. muamele edildi.
6. Üç defa distile su ile yıkanarak kurumaya bırakılmasının ardından floresan mikroskopunda hücrelerin analizi yapıldı.

3.8. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

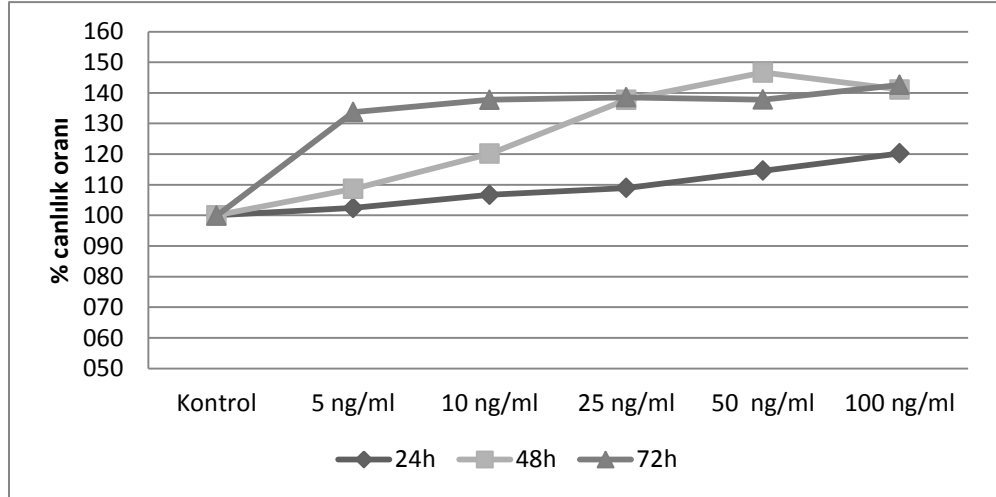
Doza ve zamana bağılı olarak değişen, VEGFA, VEGFC, VEGFR2, STAT3, MMP2, MCL1, CASP8 ve CASP9 mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar “REST (2009 V2.0.13)” istatistik programı ile karşılaştırıldı ⁷⁰. Hücre canlılığı ve apoptozis oranlardaki değişimler ise “tek yönlü Anova” testiyle karşılaştırıldı. Veriler “SPSS 15.0” istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. 0.05’den küçük olan p değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığı Sonuçlarının Değerlendirilmesi

24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda LNCaP hücrelerinin IL-6' ya olan cevabının hücre canlılığı üzerine etkisi Grafik 1'de gösterilmiştir. Buna göre IL-6 ile muamele edilmiş LNCaP hücrelerinin doza ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu artırdığı belirlenmiştir.

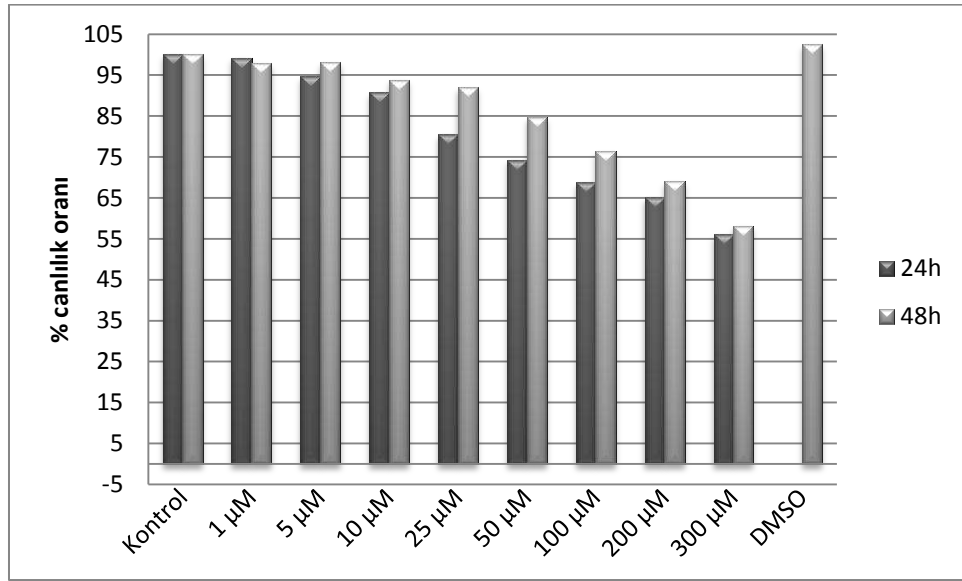
Kullandığımız 25 ng/ml IL-6 konsantrasyonunun, LNCaP hücrelerinin hücre canlılığını 24'üncü saatte %20 arttırdığı, 48. saatte %41 arttırdığı, 72. saatte ise %42 arttırdığı görülmektedir. Sonuçlarımıza göre IL-6 için 24 saat süre de 50ng/ml proliferasyonu sağlarken, 48 ve 72 saat süre de 25 ng/ml' nin proliferasyonu sağladığı belirlendi.



Grafik 1. LNCaP hücrelerinin (5.000 hücre/kuyu) IL-6 ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları

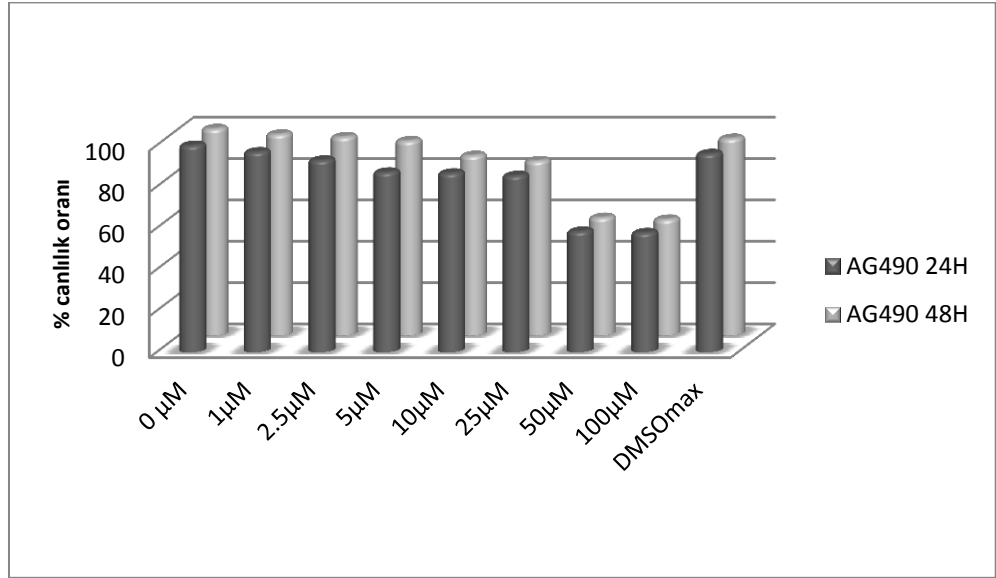
Grafik 2'de LNCaP hücrelerinde STAT3 inhibitörü olan S3I-201'in 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri sonucunda hücre canlılığı

üzerine olan etkisi gösterilmektedir. Buna göre, 24 saatte en yüksek konsantrasyondaki (300 μ M) hücre canlılığı %56.11 bulundu. 48 saat süreli inkübasyon sonucunda en yüksek konsantrasyondaki hücre canlılık oranı %58.1 olarak bulundu. Sonuçlarımıza göre S3I-201 için 24 ve 48 saat için IC₅₀ dozunun 300 μ M olduğu belirlendi (Grafik 2).



Grafik 2. LNCaP hücrelerinin (5.000 hücre/kuyu) S3I-201 ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları.

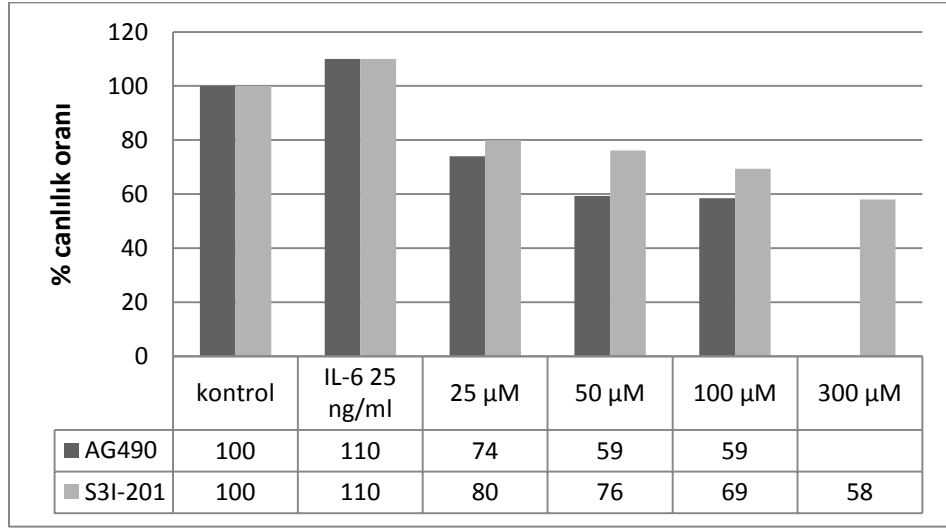
Grafik 3’de 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonucunda hücrelerin JAK2 inhibitörü AG490’ a cevabı gözlenmektedir. Buna göre, 50 μ M konsantrasyondaki hücre canlılığı %58.4 bulundu. 48 saat süreli inkübasyon sonucunda hücre canlılık oranı %57.1 olarak bulundu (Grafik 3). Sonuçlarımıza göre AG490 için 24 ve 48 saatlik süre de IC₅₀ dozunun 50 μ M olduğu belirlendi.



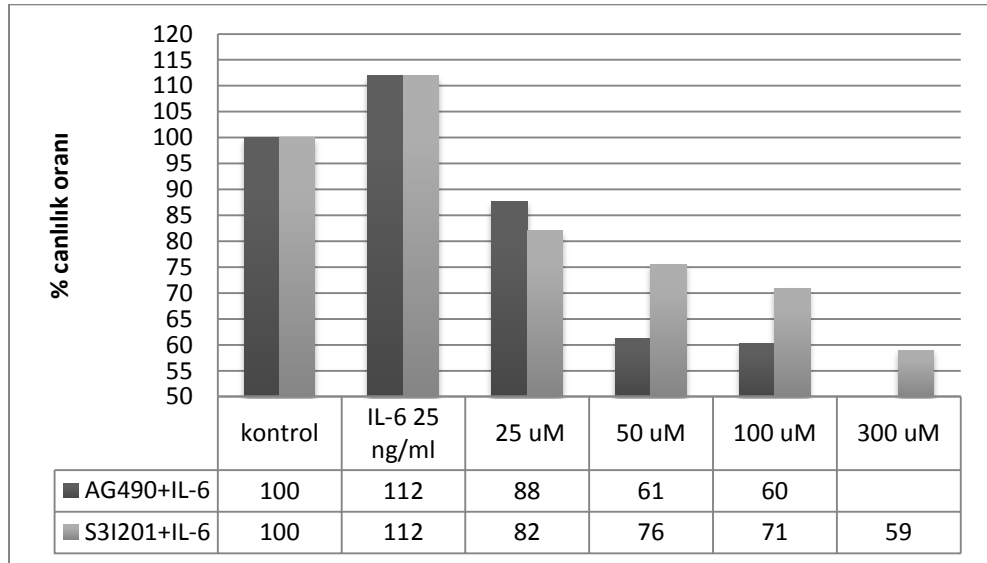
Grafik 3. LNCaP hücrelerinin (5.000 hücre/kuyu) AG490 ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları

Grafik 4 ve 5’ de 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonucunda hücrelerin JAK2 inhibitörü AG490’a ve IL-6’ya cevabı gözlenmektedir. Buna göre 24 saat uygulanan 50 µM konsantrasyondaki AG490 ve 25 ng/ml IL-6’ nın hücre canlılığı %59.3 bulundu (Grafik 4). 48 saatlik uygulamada ise hücre canlılığı %61 bulundu (Grafik 5).

Grafik 4 ve 5’de 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonucunda hücrelerin STAT3 inhibitörü S3I-201’e ve IL-6’ya cevabı gözlenmektedir. Buna göre, LNCaP hücrelerine 24 saatte en yüksek konsantrasyondaki (300 µM) S3I-201 ve 25 ng/ml IL-6’ nın hücre canlılığı %58 bulundu (Grafik 4). 48 saatlik uygulamada ise %59 olarak bulundu (Grafik 5).



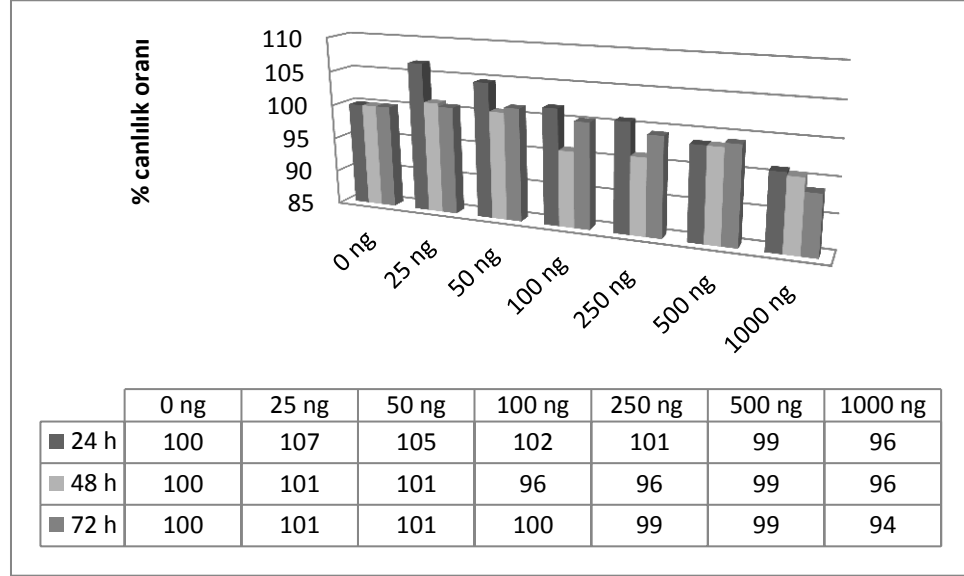
Grafik 4. LNCaP hücrelerinin (5.000 hücre/kuyu) belirlenen dozlarda IL-6+AG490 ve IL-6+S3I-201 ile 24 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları



Grafik 5. LNCaP hücrelerinin (5.000 hücre/kuyu) belirlenen dozlarda IL-6+AG490 ve IL-6+S3I-201 ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları

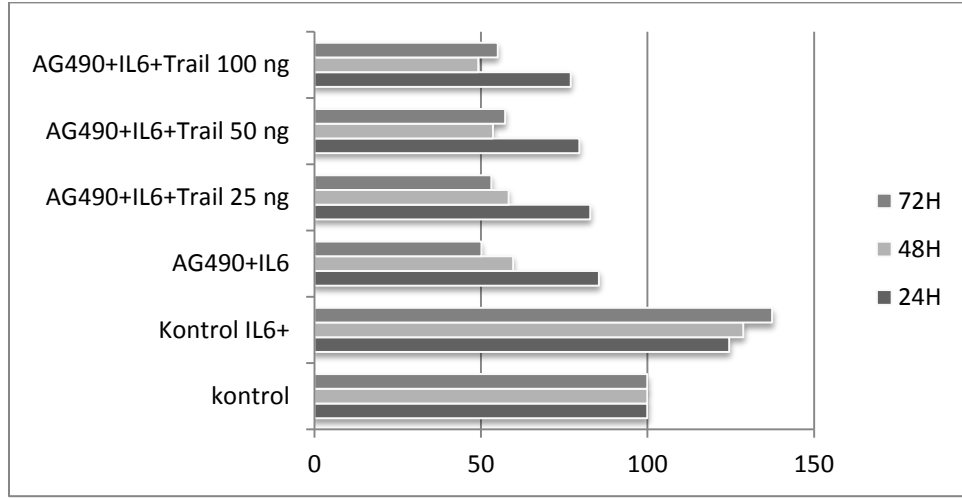
0, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde TRAIL ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen LNCaP hücrelerinin cevabı grafik 6'da gözlenmektedir. Buna göre, 24 saatte en yüksek konsantrasyondaki (1000 µM) hücre canlılığı %96.03 bulundu. 48 saat süreli inkübasyon sonucunda en yüksek

konsantrasyondaki hücre canlılık oranı %95.59, 72 saat süreli inkübasyon sonucunda en yüksek konsantrasyondaki hücre canlılık oranı %93.7 olarak bulundu (Grafik 6).



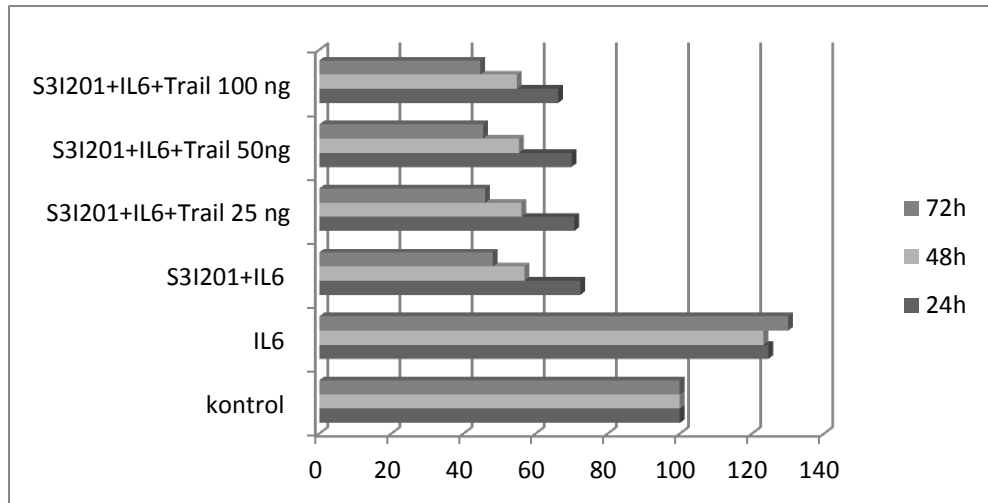
Grafik 6. LNCaP hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat süre ile TRAIL ile kombinasyonu sonucunda belirlenen hücre canlılık oranları

Grafik 7’de 24, 48, 72 saat inkübasyon süresi sonucunda hücrelerin IL-6, AG490 ve TRAIL kombinasyonuna olan cevabı gözlenmektedir. Buna göre, 24 saatte 50 μ M AG490, 25 ng/ml IL-6 ve 100 ng/ml TRAIL dozunun hücre canlılığı %77 bulundu. 48 saatte en yüksek konsantrasyondaki TRAIL dozunun hücre canlılığı %49 bulunurken, 72 saatte en yüksek konsantrasyondaki TRAIL dozunun hücre canlılığı %55 bulundu (Grafik 7).



Grafik 7. LNCaP hücrelerinin (5.000 hücre/kuyu) belirlenen dozlarda IL-6, AG490 ve TRAIL ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları

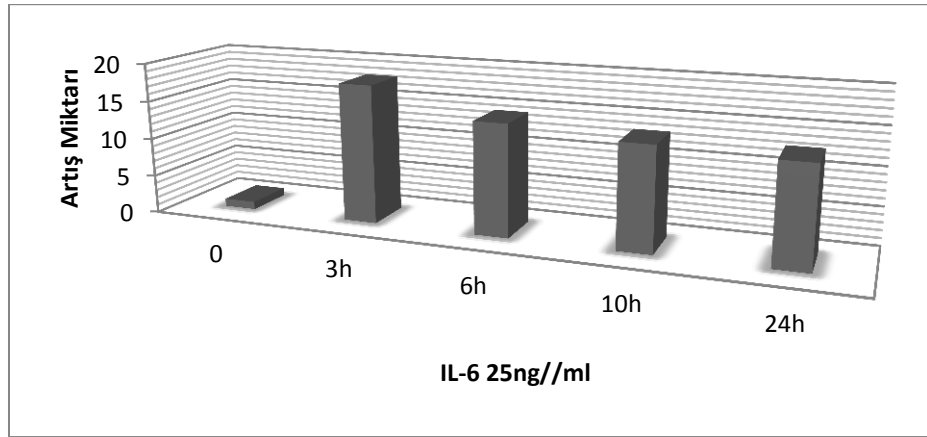
Grafik 8'de 24, 48, 72 saat inkübasyon süresi sonucunda hücrelerin IL-6, S3I-201 ve TRAIL kombinasyonuna olan cevabı gözlenmektedir. Buna göre, 24 saatte en yüksek konsantrasyondaki (300 μ M) S3I-201, 25 ng/ml IL-6 ve 100 ng/ml TRAIL dozlarının hücre canlılığı %66 bulundu. 48. saatte en yüksek konsantrasyondaki TRAIL dozunun hücre canlılığı %55 bulundu, 72. saatte ise en yüksek konsantrasyondaki TRAIL dozunun hücre canlılığı %45 bulundu (Grafik 8).



Grafik 8. LNCaP hücrelerinin (5.000 hücre/kuyu) belirlenen dozlarda IL-6, S3I-201 ve TRAIL ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları

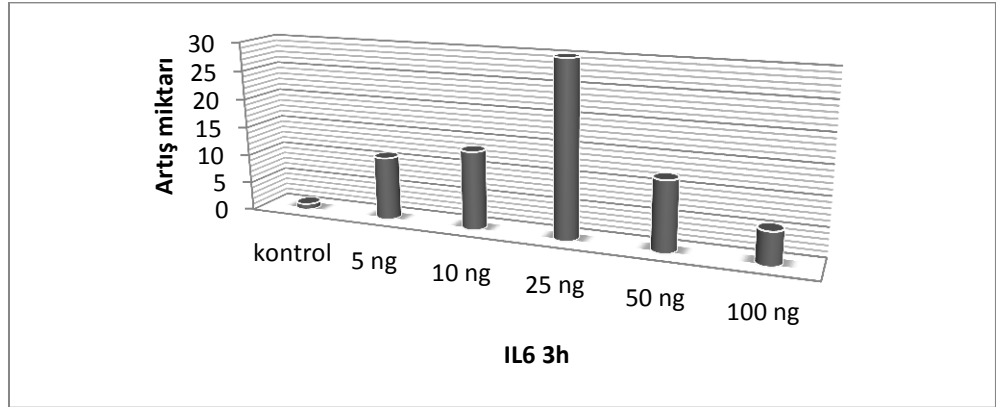
5.2. FosfoSTAT-3 Düzeyinin ELIZA Yöntemi ile Belirlenmesi

LNCaP hücreleri 0, 3, 6, 10 ve 24 saat sürelerde WST-1 ile belirlediğimiz 25 ng/ml IL-6 verilerek inkübe edildikten sonra, hücrelerde ilaca verilen proliferatif cevap sırasında oluşan fosfoSTAT-3 düzeyi ELIZA yöntemini kullanarak belirlendi. Çalışılan dozlar arasında en yüksek fosfoSTAT-3 düzeylerine 3. saatte erişildiği bulundu (Grafik 9). Kontrole göre 3. saatte fosfoSTAT-3 düzeyinde 18 kat artma olduğu bulundu.



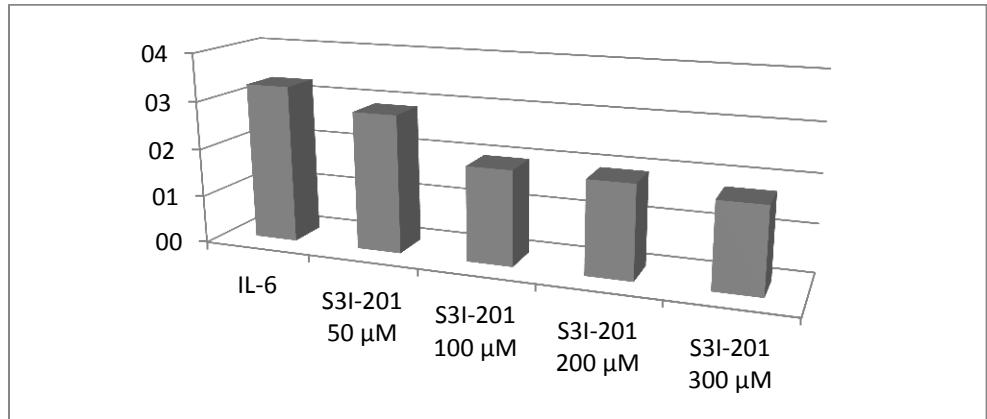
Grafik 9. LNCaP hücrelerinin (10^6 hücre/kuyu) 25 ng/ml IL-6 ile inkübasyonu sonunda gösterilen fosfoSTAT-3 düzeyi

LNCaP hücreleri 0, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml IL-6 ile 3 saat süre ile inkübe edildikten sonra, hücrelerde ilaca verilen proliferatif cevap sırasında oluşan fosfoSTAT-3 düzeyi ELIZA yöntemini kullanarak belirlendi. Çalışılan dozlar arasında en yüksek fosfoSTAT-3 düzeylerine 25 ng/ml' de erişildiği bulundu (Grafik 10). Kontrole göre 25 ng/ml' de fosfoSTAT-3 düzeyinin 30 kat arttığı bulundu. WST-1 ile bulduğumuz doz doğrulandı.



Grafik 10. LNCaP hücrelerinin (10^6 hücre/kuyu) belirlenen dozlarda 3 saat inkübasyonu sonunda gösterilen fosfoSTAT-3 düzeyi

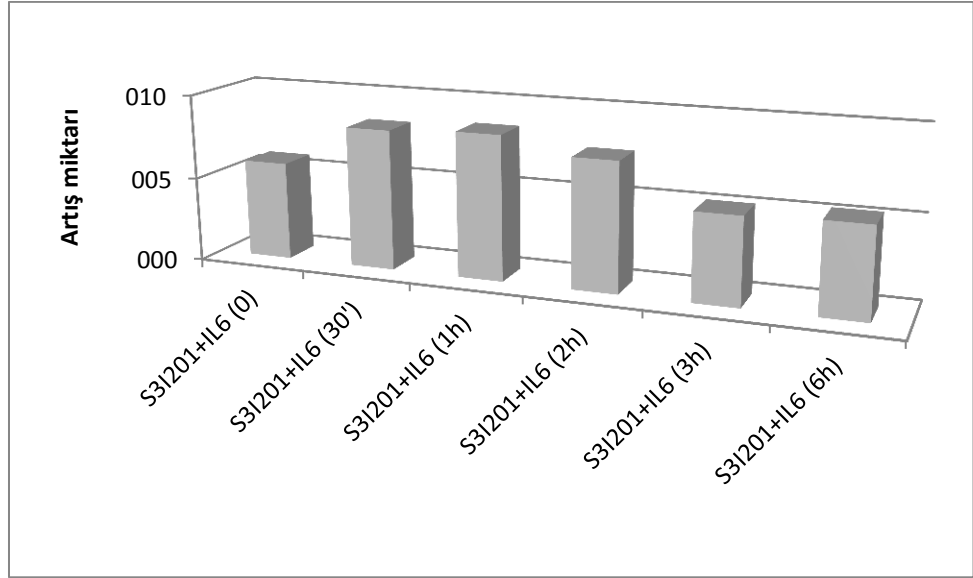
LNCaP hücreleri 25 ng/ml IL-6 ve sırasıyla 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M S3I-201 ile 3 saat inkübe edildikten sonra 25 ng/ml IL-6 ile birlikte muamele edildi. Hücrelerde ilaca verilen cevap sırasında oluşan fosfoSTAT-3 düzeyi ELIZA yöntemini kullanarak belirlendi. Çalışılan dozlar arasında en düşük fosfo STAT-3 düzeyinin 300 μ M konsantrasyonunda bulundu (Grafik 11).



Grafik 11. LNCaP hücrelerinin (10^6 hücre/kuyu) farklı dozlarda 24 saat inkübasyonu sonunda gösterilen fosfoSTAT-3 düzeyi

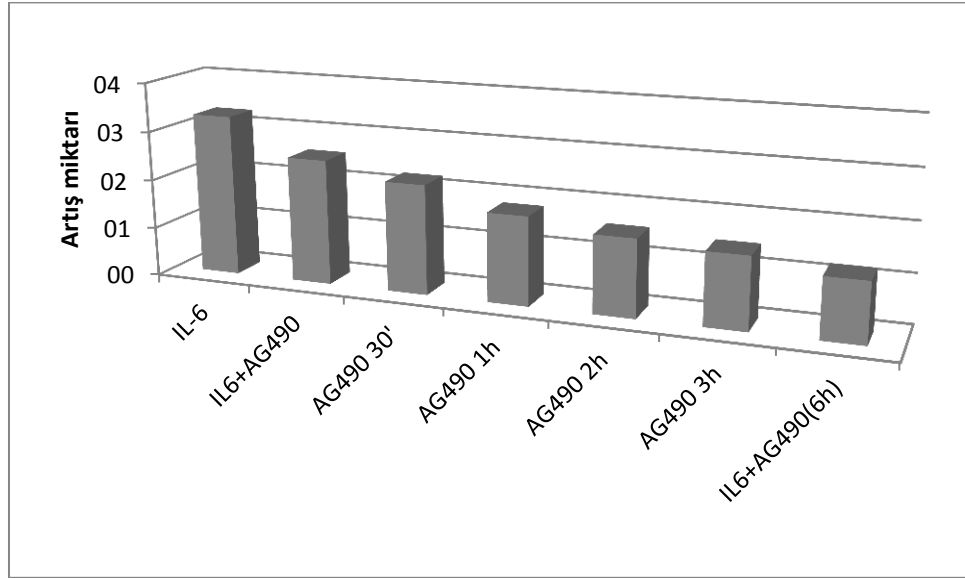
LNCaP hücreleri 30', 1, 2, 3, 6 saat süre ile 25 ng/ml IL-6 ve 300 μ M S3I-201 ile inkübe edildikten sonra, hücrelerde ilaca verilen cevap sırasında oluşan fosfoSTAT-3 düzeyi ELIZA yöntemi kullanarak belirlendi.

Çalışılan dozlar arasında en düşük fosfoSTAT-3 düzeyi 3. saatte saptanmıştır (Grafik 12).



Grafik 12. LNCaP hücrelerinin (10^6 hücre/kuyu) 300 μ M S3I-201 ve 25 ng/ml IL-6 ile inkübasyonu sonunda gösterilen fosfoSTAT-3 düzeyi

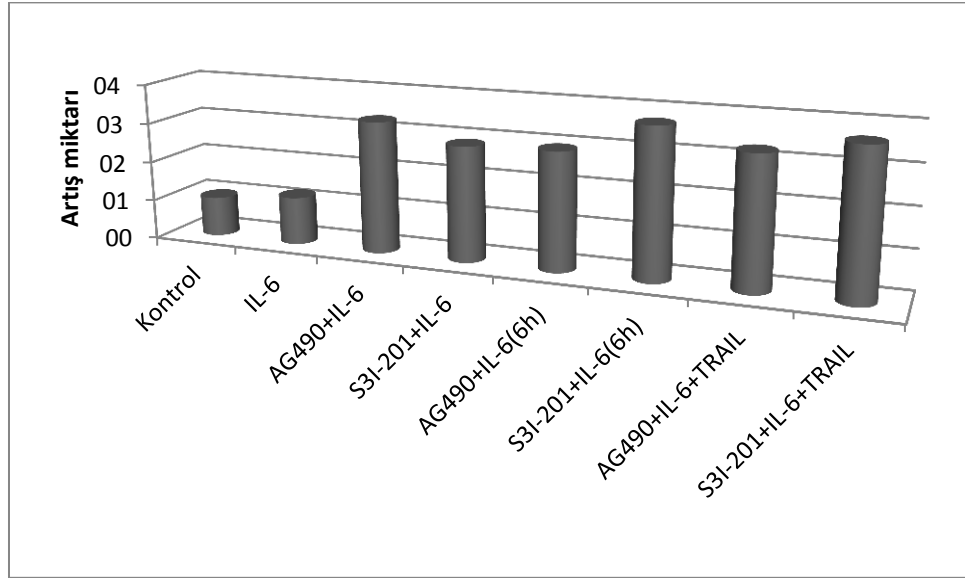
LNCaP hücreleri 25 ng/ml IL-6 ve 0, 30', 1, 2, 3, 6 saat süre 50 μ M AG490 ile inkübe edildikten sonra, hücrelerde ilaca verilen cevap sırasında oluşan fosfoSTAT-3 düzeyi ELIZA yöntemi kullanılarak belirlendi. Çalışılan dozlar arasında en düşük fosfoSTAT-3 düzeyi 6. Saatte saptanmıştır (Grafik 13).



Grafik 13. LNCaP hücrelerinin (10^6 hücre/kuyu) 50 μ M AG490 ve 25 ng/ml IL-6 ile inkübasyonu sonunda gösterilen fosfoSTAT-3 düzey

5.3. Aktif Kaspaz 3 Düzeyinin ELIZA Yöntemi ile Belirlenmesi

LNCaP hücreleri kontrol, AG490+IL-6, S3I-201+IL-6, AG490+IL-6 (6h), S3I-201+IL-6 (6h), AG490+IL-6+TRAIL, S3I-201+IL-6+TRAIL kombinasyonları ile inkübe edildikten sonra, hücrelerde ilaca verilen apoptotik cevap sırasında oluşan aktif kaspaz 3 düzeyi ELIZA yöntemini kullanarak belirlendi. Buna göre, belirlenen aktif kaspaz 3 miktarının doza ve zamana bağlı olarak artma eğiliminde olduğu belirlendi ($p<0.05$)(Grafik 14). En yüksek aktif kaspaz 3 düzeyi S3I-201+IL-6+TRAIL ve S3I-201+IL-6 kombinasyonlarında bulundu.

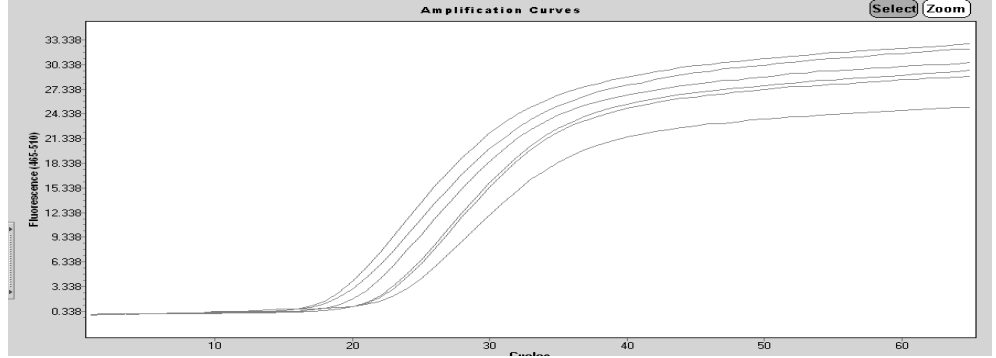


Grafik 14. LNCaP hücrelerinin (10^6 hücre/kuyu) 50 μ M AG490, 25 ng/ml IL-6, 300 μ M S3I-201 ve 250 ng/ml TRAIL ile yapılan ELIZA sonrasında aktif kaspaz 3 oranları.

5.4. Gen İfade Düzeyinin Kantitatif Belirlenmesi

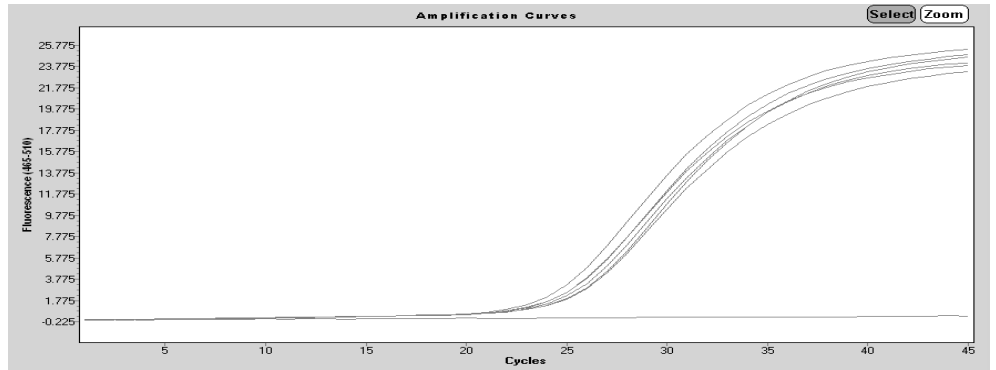
VEGFA, VEGFC, VEGFR2, STAT3, MMP2, MCL1, CASP8 ve CASP9 genlerinin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi için Light Cycler 480 cihazı kullanıldı. LNCaP hücre hattından elde edilen cDNA' larda VEGFA, VEGFC, VEGFR2, STAT3, MMP2, MCL1, CASP8 ve CASP9, bu genlerin normalizasyonu için seçilen GAPDH genlerine özgül primerler ve UPL LNA problemleri kullanılarak çalışıldı.

GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 28'de gösterildi.



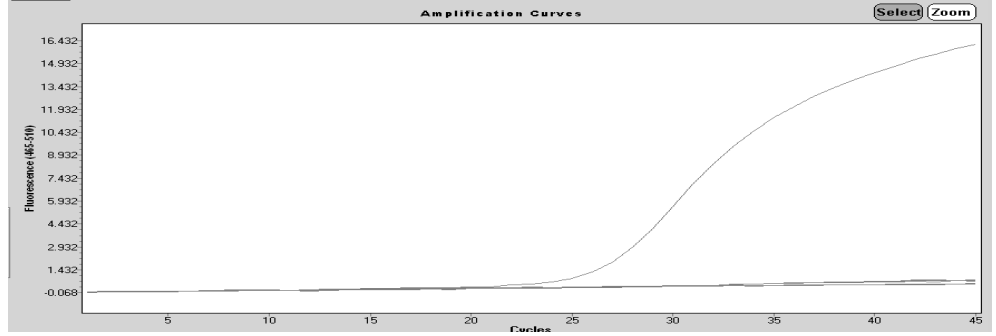
Şekil 28. GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. GAPDH geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

VEGFA geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 29’da gösterildi.



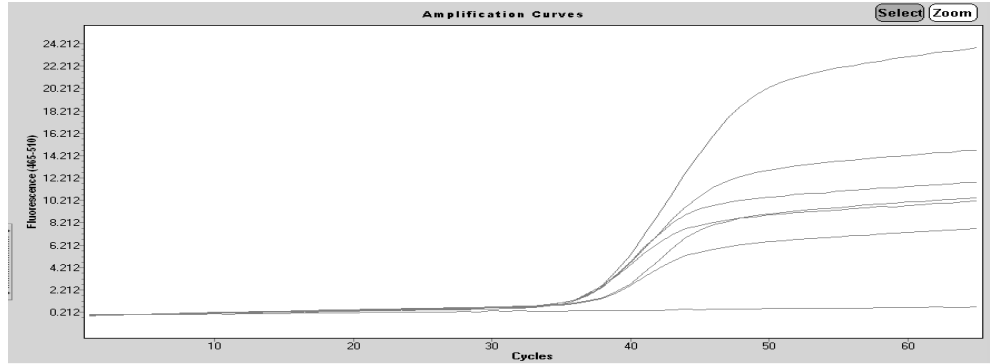
Şekil 29. VEGFA geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. VEGFA geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir. Caki-2 hücresi pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

VEGFC geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 30’da gösterildi.



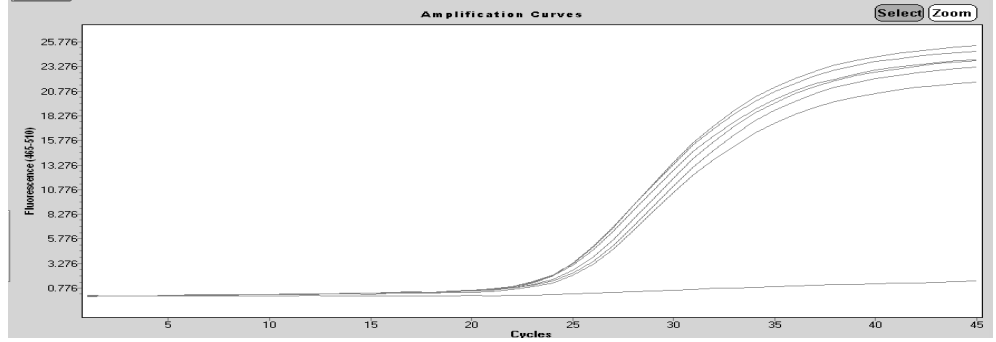
Şekil 30. VEGFC geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. VEGFC geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir. Caki-2 hücresi pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

VEGFR2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 31’de gösterildi.



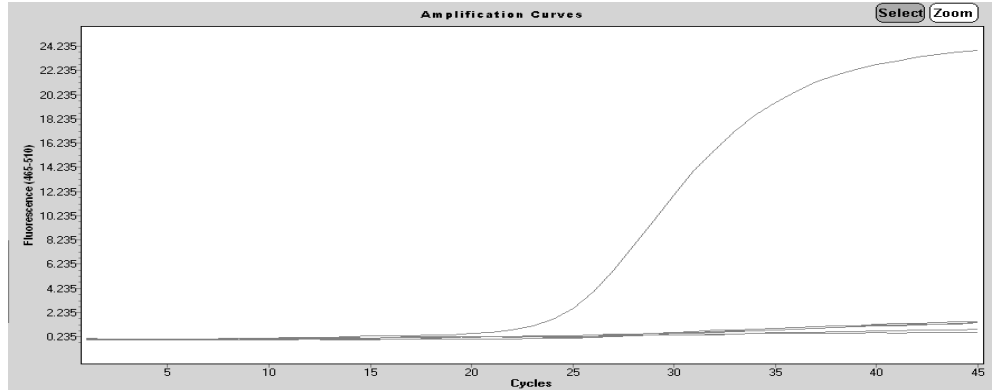
Şekil 31: VEGFR2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. VEGFR2 geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir. Caki-2 hücresi pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

STAT3 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 32’de gösterildi.



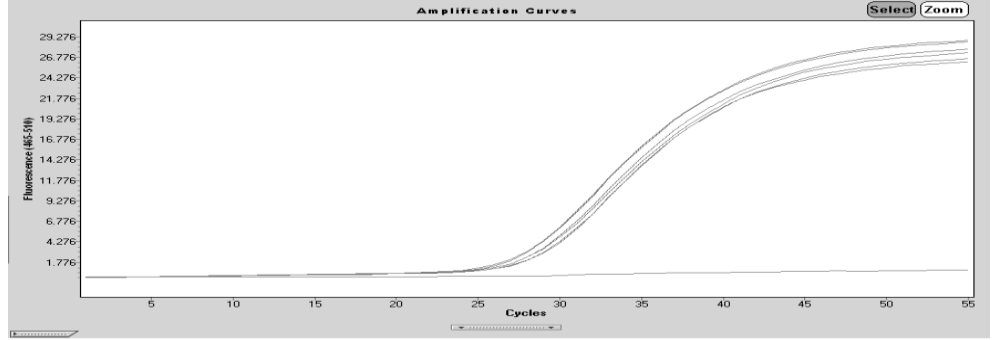
Şekil 32. STAT3 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. STAT3 geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir. Caki-2 hücresi pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

MMP2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 33'de gösterildi.



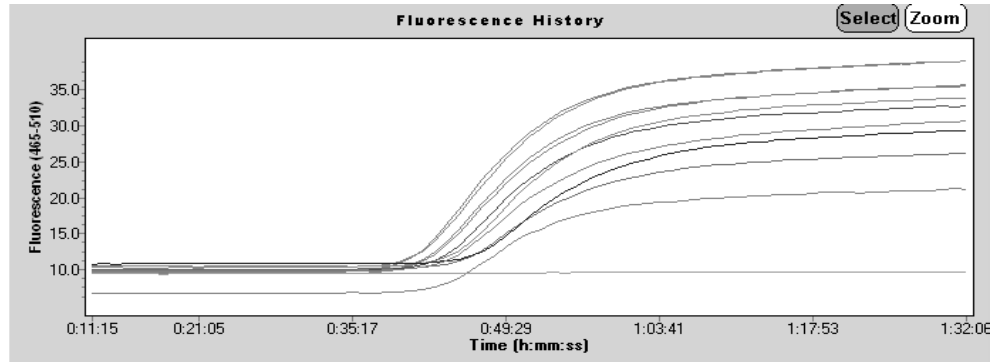
Şekil 33. MMP2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. MMP2 geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir. Caki-2 hücresi pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

MCL1 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 34'de gösterildi.



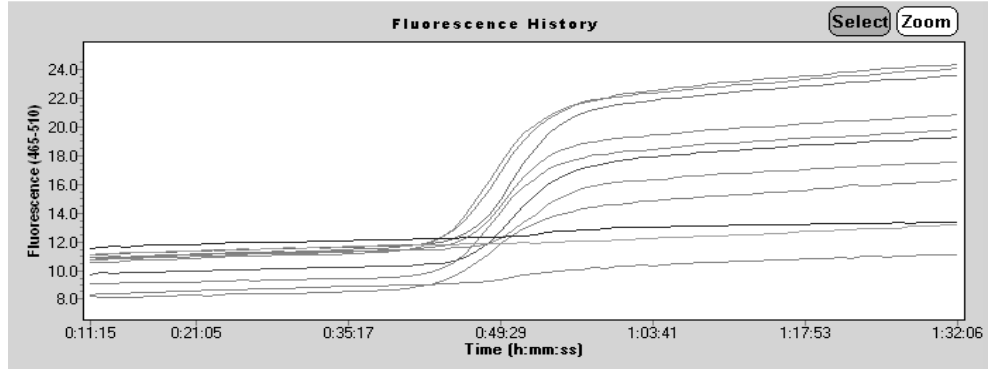
Şekil 34. MCL1 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. MCL1 geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir. Caki-2 hücresi pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

CASP8 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 35’de gösterildi.



Şekil 35. CASP8 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. CASP8 geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir

CASP9 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 36’da gösterildi.



Şekil 36. CASP9 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. CASP9 geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir

Göreceli gen ifadesi sonuçları REST programı kullanılarak “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplandı. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir.

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

Eşitlikte belirtilen Ct, tepkime sırasında oluşan floresan sinyalin eşik değeri geçtiği andaki döngü sayısını ifade etmektedir. Ct değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır. ΔC_t değeri ise kontrol ile örneklerin Ct değerleri arasındaki farkı göstermektedir. Eşitlikte belirtilen E, PCR etkinliğini, elde edilen R ise ifade oranını göstermektedir.

4.5. Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırması

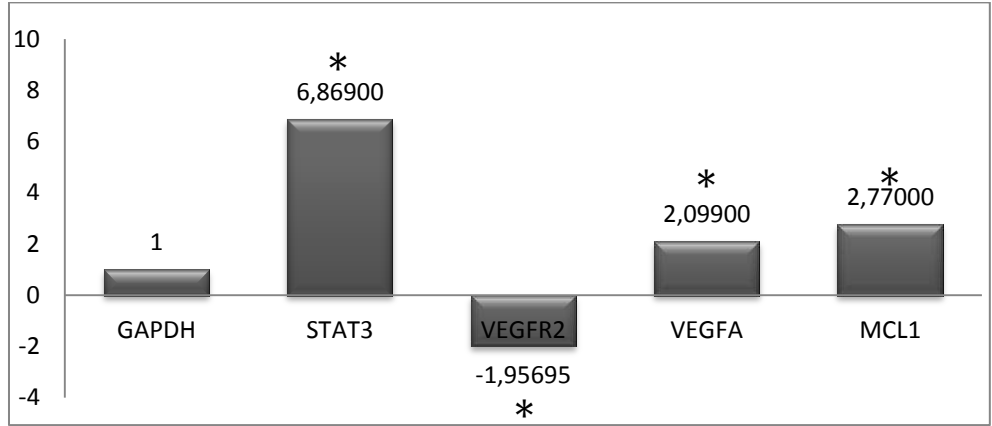
LNCaP hücrelerine IL-6 tek başına uygulandığında 24 ve 48. saatler sonunda VEGFA, VEGFC, VEGFR2, STAT3, MMP2, MCL1, CASP8 ve CASP9 mRNA ifade düzeyleri araştırıldığında, her bir doz ve süre için STAT3, MCL1 ve VEGFA mRNA' sında kontrole göre anlamlı bir

artış olduğu ve bu artışın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulundu ($p<0.05$)(Grafik 15-18). Ancak VEGFR2 mRNA' sının ise genel olarak uygulanan IL-6 konsantrasyonlarında bir azalma eğilimi gösterdiği belirlendi ($p>0,05$)(Grafik 15-18). Pozitif kontrol olarak Caki-2 hücresi kullanıldı.

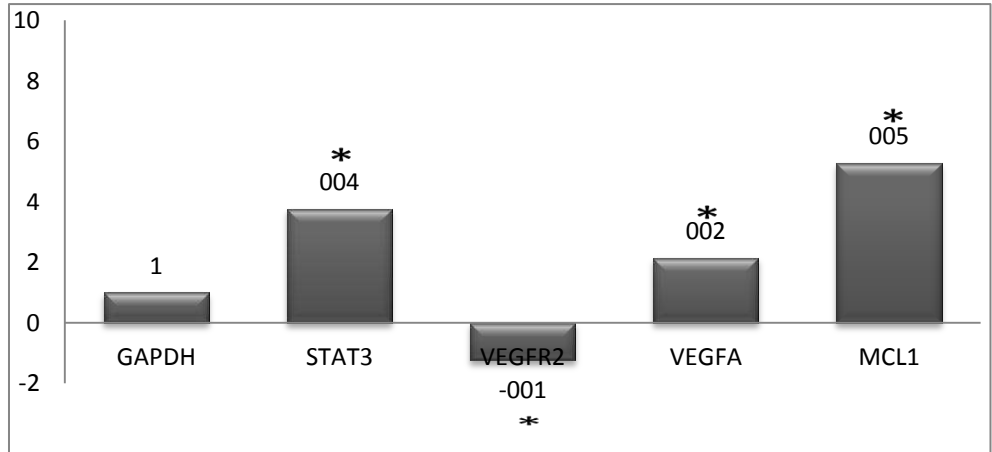
En yüksek STAT3 mRNA ifade artışı 24 saatlik IL-6 uygulamasından sonra görüldü. 24 saatlik IL-6 uygulamasında VEGFA, MCL1 genlerinde de anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi fakat bu genlerdeki artışın 48 saatlik inkübasyona nazaran daha az olduğu gözlemlendi. 24 saatlik IL-6 uygulamasında VEGFR2 geninde anlamlı bir düşüş olduğu bulundu. 48 saatlik IL-6 uygulandığında VEGFA, MCL1 mRNA' sının kontrole göre arttığı görüldü ($p<0.05$). Aynı süre ve konsantrasyon için VEGFR2 mRNA ifade düzeyine baktığımızda ise 48 saat için 1.23 kat azalma görüldü ($p>0.05$). Pozitif kontrol olarak Caki-2 hücresi kullanıldı.

LNCaP hücrelerine uygulanan 24 ve 48 saatlik 25 ng/ml IL-6, CASP8 ve CASP9 genlerinin mRNA seviyelerinde anlamlı şekilde azalma gözlemlendi ($p>0,05$). Ancak S3I-201+IL-6, AG490+IL-6, AG490+IL-6+TRAIL' ın 24 ve 48 saatlik uygulamalarında CASP8 ve CASP9 mRNA seviyelerinde anlamlı bir artma gözlemlendi ($p<0.05$). LNCaP hücrelerine tek başına TRAIL uygulandığında 24 saatlik sürede CASP8 ve CASP9 mRNA düzeylerinde anlamlı bir değişiklik bulunamadı. 48 saatlik uygulamada ise sadece CASP9 geninin mRNA seviyesinde anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0.05$).

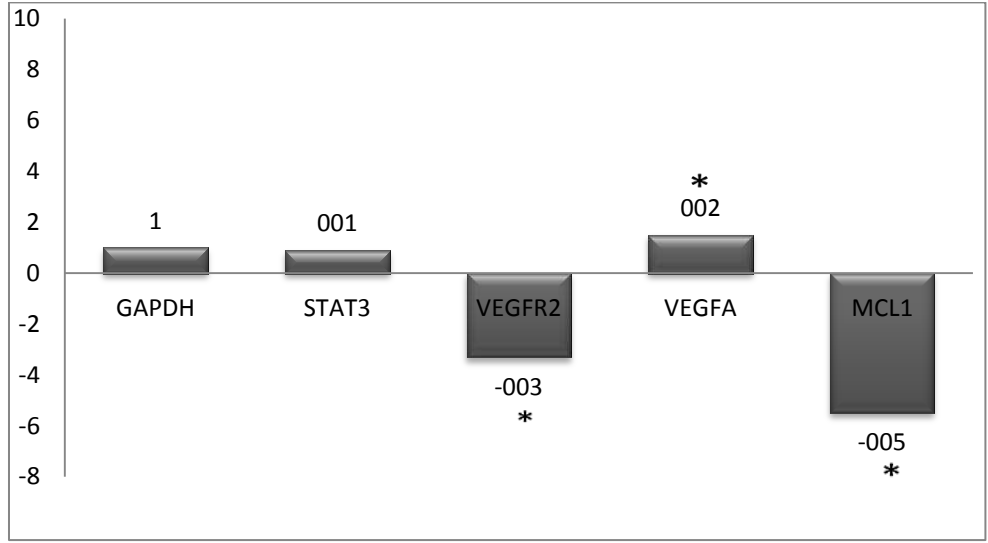
MMP2 ve VEGFC mRNA seviyelerinde kontrole göre istatistiksel açıdan herhangi bir farklılık oluşmadığı gözlemlendi, pozitif kontrol olarak Caki-2 hücresi kullanıldı.



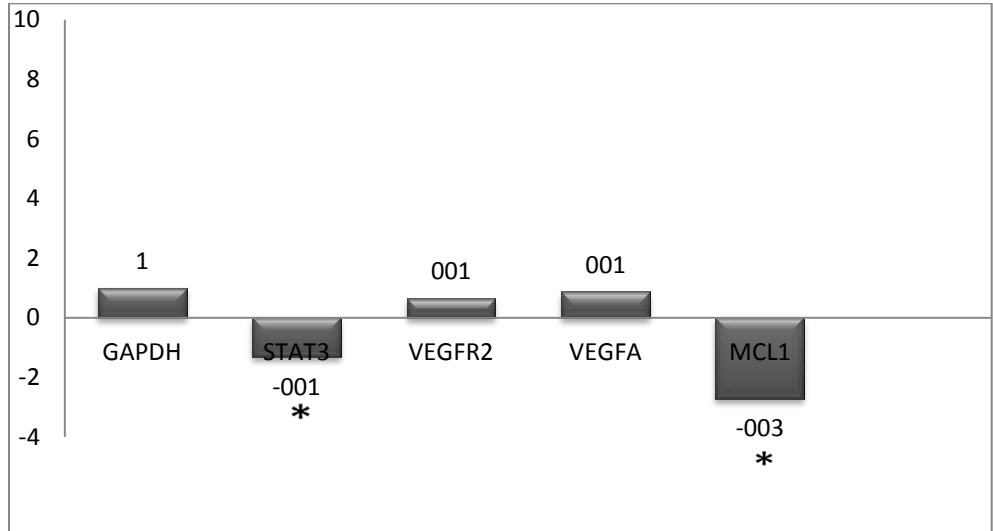
Grafik 15. LNCaP hücrelerinin 24 saat 25 ng/ml IL-6 uygulaması sonrasında STAT3, VEGFR2, VEGFA, MCL1 genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi *; $p < 0.05$.



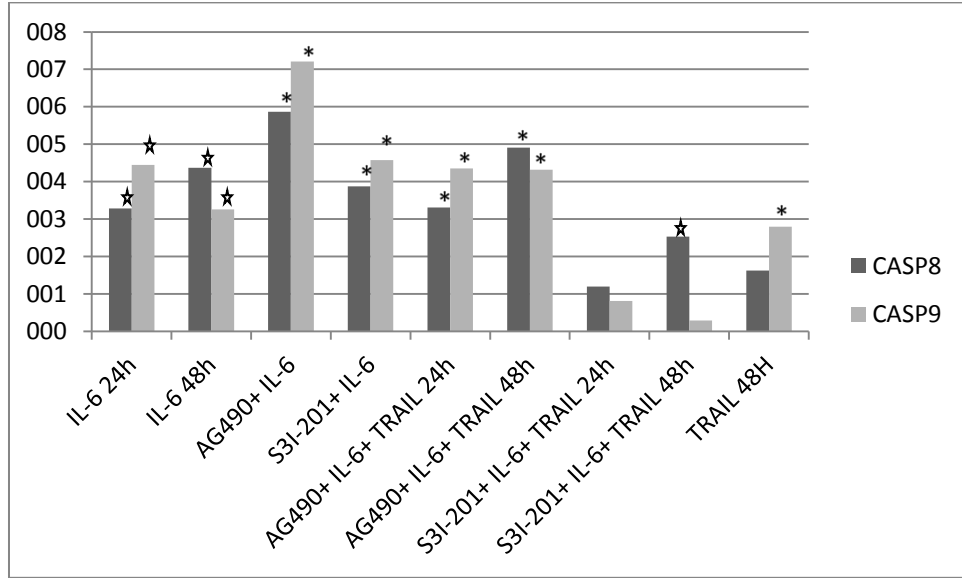
Grafik 16. LNCaP hücrelerinin 48 saat 25 ng/ml IL-6 uygulaması sonrasında STAT3, VEGFR2, VEGFA, MCL1 genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi *; $p < 0.05$.



Grafik 17. LNCaP hücrelerinin 48 saat 25 ng/ml IL-6 ve 50 µM AG490 uygulaması sonrasında STAT3, VEGFR2, VEGFA, MCL1 genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi *; $p < 0.05$.



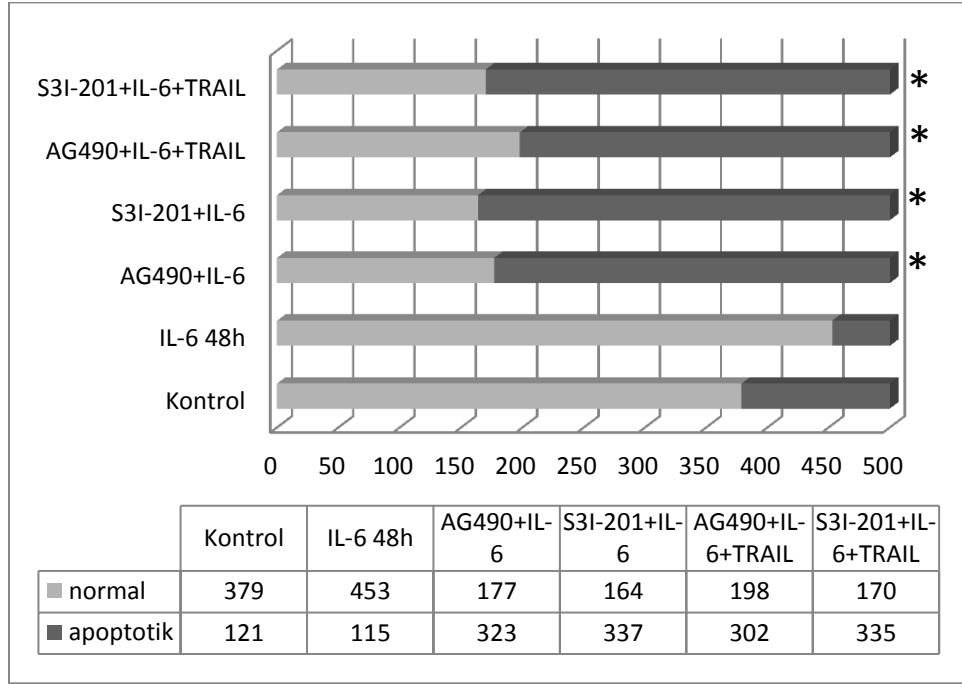
Grafik 18. LNCaP hücrelerinin 48 saat 25 ng/ml IL-6 ve 300 µM S3I-201 uygulaması sonrasında STAT3, VEGFR2, VEGFA, MCL1 genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi *; $p < 0.05$.



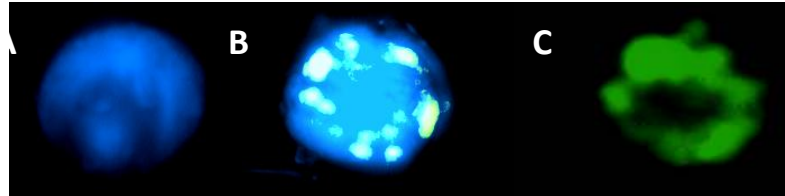
Grafik 19. LNCaP hücrelerinin 24 ve 48 saat 25 ng/ml IL-6, 50 μ M AG490, 250 ng/ml TRAIL ve 300 μ M S3I-201 uygulaması sonrasında CASP8 ve CASP9 genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi *; $p < 0.05$, ☆; $p > 0.05$.

4.6. TUNEL ve Gimza ile Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesi

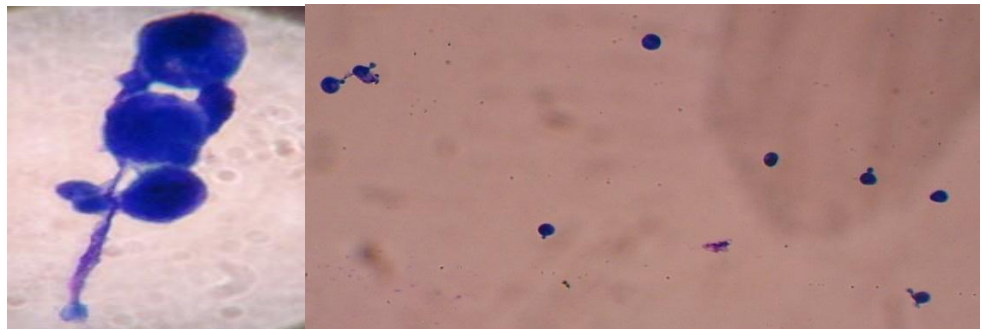
AG490, S3I-201, TRAIL ve IL-6'nın LNCaP hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin belirlenmesi için TUNEL ve Gimza yöntemi kullanıldı. LNCaP hücreleri gimza ile boyamadan sonra ışık mikroskopunda, TUNEL ile boyamadan sonra ise floresan mikroskopunda analiz edildi. Kontrol hücresi ve IL-6 arasında istatistiksel bir fark bulunamazken, AG490+IL-6, S3I-201+IL-6, TRAIL+AG490+IL-6, TRAIL+S3I-201+IL-6 kombinasyonları ile yapmış olduğumuz analizde kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ve AG490 ve S3I-201 inhibitörlerinin apoptozu indüklediği gösterildi ancak TRAIL'in LNCaP hücrelerinde apoptoz üzerine etkisinin anlamlı bir fark oluşturmadığı gösterildi. TUNEL sonuçlarımız gimza ile doğrulandı.



Grafik 20. LNCaP hücrelerinin (10^6 hücre/kuyu) AG490, S3I-201 ve TRAIL ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen Canlı ve Apoptotik hücre oranları. *; $p<0.05$ (ilaç uygulaması yapılmayan kontrol hücreleri ile ilaç uygulanan hücrelerde belirlenen apoptotik hücrelerin karşılaştırılması)



Şekil 37. TUNEL ile boyanan LNCaP hücrelerinde normal (A), pro-apoptotik (B) ve apoptotik (C) hücrelerin görünümü



Şekil 38. Gimza boyası ile boyanan LNCaP hücrelerinde apoptozun gösterilmesi

5. TARTIŞMA

JAK/STAT3 sinyal yolağı, hücre döngüsü, apoptozis, tümör anjiyojenezi gibi tümöröenez oluşumunda yer alan birçok yolağın düzenlenmesinde görev almaktadır^{71,35}. Yapılan son çalışmalarda prostat kanser hücre göçünü arttırmak suretiyle STAT3'ün prostat kanser metastazında rol oynadığı gösterilmiştir^{72,73}. JAK/STAT3 sinyal yolağı IL-6, interferon gibi sitokinler veya EGF, PDGF gibi çok çeşitli büyüme faktörleri aracılığıyla da uyarılmaktadır⁷². IL-6'nın hücre yüzey reseptörü olan tirozin kinaza bağlanmasıyla JAK'lar aktive olur. Aktive olan JAK, STAT3 proteinini fosforile ederek STAT3'ün dimerizasyonunu sağlar. Dimerize olan STAT3 çekirdekte DNA'da bulunan STAT3 cevap elementlerine bağlanmak suretiyle ilgili genlerin ifadenmelerini uyarır^{72,74}.

Malign oluşum süresince STAT3'ün aşırı ifadenmesi sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Son zamanlarda STAT3'ün anjiyojenezdeki rolünü aydınlatmaya yönelik çalışmalar hız kazanmıştır⁷⁵. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda STAT3'ün hedef genleri arasında anjiyogenik faktör VEGF gösterilmektedir. Ancak halen tam olarak STAT3'ün anjiyogenik hedef genleri ve anjiyojenez yolağındaki rolü tam olarak açıklanabilmiş değildir. STAT3'ün anjiyojenezdeki rolünü araştırmaya yönelik olarak çalışmamızda VEGFA, VEGFC, VEGFR2, MMP2 ve anti-apoptotik MCL1 genlerinin ifadenmelerini mRNA düzeyinde inceledik.

IL-6 aracılığıyla LNCaP ve DU145 hücre hatlarının proliferasyonu artmaktadır⁷⁶. IL-6'nın doz ve zamana bağlı olarak STAT3 fosforilasyonunu indüklediği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir^{77,78}. Bu nedenle çalışmamızda STAT3 aktivasyonunun sağlanması için IL-6 ile LNCaP hücreleri muamele edildi. En yüksek pSTAT3 düzeyi, 25 ng/ml'de

ve 3. saat sonunda gözlemlendi. Bununla birlikte, prostat kanser hücre hatlarında yapılan çalışmada, (LNCaP, PC3, DU145) çalışmamızla paralel olarak IL-6 aracılığıyla pSTAT3 aktivasyonunun artışı gösterilmiştir. Ancak, zamana bağlı olarak IL-6 aktivasyonunun prostat kanser hücre hatlarında azaldığını ve böylece pSTAT3 düzeyinde azalma olduğu gösterilmiştir⁷⁹. Bu çalışma ile uyumlu olarak, çalışmamızda 25 ng/ml, 0-24. saatler arasında IL-6 uygulanan LNCaP hücre hatlarında en yüksek pSTAT3 düzeyine 3.saatte ulaşıldığı belirlendi. Ayrıca 3.saatten sonra zamana bağlı olarak pSTAT3 düzeyinde azalma gözlemlendi.

AG490'ın IL-6 aracılığıyla uyarılan STAT3 aktivasyonunu inhibe ettiğine dair pekçok çalışma bulunmaktadır³¹. Çalışmamızda JAK/STAT3 yolağı inaktif olan LNCaP prostat kanser hücre hatlarına 25 ng/ml IL-6 vermek suretiyle JAK/STAT3 yolağı aktive edildi. 50 µM AG490 aracılığıyla IL-6 aracılı indüklenmiş olan JAK/STAT3 yolağı inhibe edildi. AG490 bu etkisini STAT3'ün DNA'ya bağlanma aktivitesini azaltmak suretiyle gerçekleştirmektedir³⁵. AG490 inhibitörünün benzer etkisi 300 µM konsantrasyonda uyguladığımız S3I-201 ile de gözlemlendi. S3I-201, AG490 gibi STAT3'ün DNA'ya bağlanma aktivitesini azaltmanın yanı sıra STAT3 tirozin fosforilasyonunda azalmaktadır⁷⁷.

S3I-201, karaciğer hücrelerinde preklinik çalışmalar için kullanılmaktadır. Klinik çalışmalar henüz başlamamıştır^{80,81}. AG490'nın klinik çalışmaları devam etmektedir. AG490'nın analogu olan LS104 akut lenfositik lösemi tedavisinde klinik denemelerde faz 2 aşamasına girmiştir²⁹.

VEGF, tümör anjiyogenezinde, yayılımında ve metastazında önemli rol oynayan potansiyel bir anjiyogenik mitojendir^{71,82}. VEGF, potansiyel olarak tümör ilerlemesi süresince endotel hücre

proliferasyonunu ve göçünü aktive eder. Metastatik prostat kanser hücrelerinde yüksek derecede ifade edilmektedir⁵². JAK/STAT3 yolağının anjiyogenezdeki rolünü araştırmaya yönelik yapılan çalışmalarda pSTAT3 aracılığıyla VEGFA ifadenme düzeyinin kontrol edildiği gösterilmiştir. IL-6 aracılığıyla indüklenen VEGF ifadenmesinin, AG490 ile önemli derecede azalmaya neden olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır^{74,86}. Çalışmamızda literatürle uyumlu olacak şekilde LNCaP hücrelerinin IL-6 ile muamele edilme süresine bağlı olarak proliferasyonunun arttığı gözlemlendi. AG490 ve S3I-201 inhibitörlerinin uygulanması sonucunda ise VEGFA ifadenme düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı. IL-6 sitokinini salgılayan PC3 hücrelerinde STAT3 ifadenmesi saptanamamış olmasına rağmen, IL-6 uygulanmamış LNCaP hücreleri ile aynı miktarda VEGFA ifadenmesi görülmüştür. IL-6 aracılığıyla VEGFA'nın ifadenme düzeyinin artışı bize göstermektedir ki, STAT3 VEGFA ifadenmesi için majör bir faktör olmasına karşın PC3'de VEGFA ifadenmesi sadece STAT3'le değil aynı zamanda farklı hücresel yollarla da aktive olabileceğini göstermektedir.

IL-6 uygulanan ve uygulanmayan LNCaP hücrelerinde VEGFC ifadenmesini tespit edemezken, pozitif kontrol olarak kullanmış olduğumuz PC3 hücre hatlarında ise STAT3 ifadenmesi olmaksızın VEGFC ifadenmesi tespit edilmiştir. Li ve arkadaşlarının çalışmalarında bulgularımızla uyumlu olarak PC3 hücrelerinde VEGFC ifadenmesi tespit etmelerine karşın, LNCaP hücrelerinde VEGFC ifadenmesi bazal düzeyde tespit edilmiştir⁸³. Çalışmamız, LNCaP hücre hattında VEGFC ifadenmesi tespit edilememiş olması, STAT3 noksan olan PC3 hücre hatlarında VEGFC'nin aşırı ifadenmesinin pSTAT3' e bağlı olmadığını ve farklı bir yolak üzerinden ifadenmesinin kontrol edilebildiğini göstermiştir.

Pankreatik kanser hücre hatlarında yapılan bir çalışmada, STAT3'ün aktivasyonunda veya sonrasında yolağın bloke edilmesi ile

VEGF ve MMP2 genlerinin ifadenme düzeylerinin etkilendiği gösterilmiştir. Ayrıca STAT3'ün anormal aktivasyonunun pankreatik kanser yayılımı ve metastazında önemli rol oynadığını ifade etmişlerdir ⁷¹. Bu sonuçlardan VEGF ifadenme düzeyi STAT3'ün aktivasyonuna ve inaktivasyonuna bağlı olarak benzer şekilde değişmesine rağmen, bizim IL-6 aracılığıyla JAK/STAT3 yolağı uyarılan LNCaP hücre serisinde MMP2 ifadenmesi tespit edilememiştir.

Yapılan bir çalışmada LNCaP, PC3, C4-2, C4-2B, ARCAPM-C2 hücreleri ile prostat kanser hücre hatlarında VEGFR1 ifadenmesi tespit edilemezken, yalnızca bir hücre hattında (ARCAPM-C2) VEGFR2'in düşük ifadelendiğini bulunmuştur⁵². Bu çalışma ile uyumlu olarak çalışmamızda LNCaP hücrelerinde VEGFR2'in düşük ifadelendiğini bulduk. Ayrıca bu çalışmada prostat kanser hücrelerinde VEGF'in otokrin etkisi için klasik VEGF reseptörleri olan VEGFR1 ve VEGFR2 yerine majör reseptörün NRP1 (Neuropilin-1) olabileceği ifade edilmiştir^{52,84}.

Çalışmamızda AG490 ve S3I-201 inhibitörlerinin IL-6 ile uyarılmış LNCaP hücrelerine verilmesi sonrasında doz ve zaman artışına bağlı olarak hücre canlılık oranlarında azalma saptandı. Hücre canlılığı testi WST-1 sonucuna göre IC50 değeri olarak AG490 dozunun LNCaP hücre hatlarında 50 µM, S3I-201 dozunun ise 300 µM konsantrasyonda olduğu gösterildi. Bu azalmanın temelinde yatan moleküler mekanizmanın, hücrelerin apoptoza mı yoksa nekroza mı girmesinden kaynaklı olduğunu göstermek için hücrelerde Gimza boyama, TUNEL, CASP8 ve CASP9 ifadenme düzeyleri ve aktif kaspaz 3 miktarları araştırıldı. Gimza ve TUNEL sonucunda kontrol ve IL-6 uygulanmış LNCaP hücreleri, AG490 ve S3I-201 uygulanmış LNCaP hücreleri ile karşılaştırıldığında inhibitör uygulanmış hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı oranda apoptozun arttığı gözlemlenmiş olup bu sonuçlarımız WST-1 sonuçlarımızla da uyumlu bulundu ($p<0.05$).

Birçok kimyasal ajana karşı duyarlı olan LNCaP hücreleri TRAIL aracılı apoptoza karşı direnç göstermektedir. Çalışmamızda 0-1000 ng/ml değişen konsantrasyonlarda TRAIL proteini uygulamamıza karşın literatürle uyumlu olarak LNCaP hücrelerinin TRAIL dirençli olduğu saptandı. LNCaP hücrelerinin TRAIL dirençli olmasının çok çeşitli nedenleri bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, c-FLIP, Bcl-2 ve XIAP gibi apoptoz baskılayıcı proteinlerin aşırı ifadenmesidir⁸⁵. İkincisi ise PI3K aracılı Akt aktivasyonu sonucunda pro-apoptotik Bid kesimlenmesinin engellenmesidir⁸⁶.

IL-6 yalnızca JAK/STAT3 yolağını değil aynı zamanda mitojen aktive eden protein kinaz kinazı (MAPK) ve fosfoinozitol 3 kinaz (PI3K) yollarını aktive eden bir sitokin olmasından dolayı LNCaP hücrelerine IL-6 uygulanması TRAIL direncini arttırmaktadır^{83,87}. Ayrıca, yapılan bir çalışmada LNCaP-IL+ hücrelerde SOCS3 proteininin aşırı aktivasyonu sonucunda TRAIL reseptörü olan DR4'ün ubiquitin-proteozom kompleksi tarafından parçalanmasına neden olarak TRAIL direncine katkı sağlamaktadır⁸⁸.

Çalışmamızda LNCaP hücre hatlarına AG490 veya S3I-201 uygulanarak apoptoz gözlemlendiği halde TRAIL ile kombinasyonların da TRAIL'in etkinliğini arttırmadığı tespit edildi. AG490, STAT3'ün hedef genlerinden birisi olan MCL1 geninin ifadenme düzeyinin azalmasına yol açmaktadır. MCL1 apoptoz üzerindeki anti-apoptotik etkisini içsel yolak üzerinden göstermesine karşın⁸⁹, LNCaP hücrelerinde TRAIL aracılı apoptoz kaspaz 8 ve kaspaz 9 ile karakterize edilmektedir⁹⁰.

TRAIL'in kemoterapotik ajanlarla birlikte kombine kullanımının kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin arttığına dair pek çok çalışma bulunmaktadır⁹¹. Lanuti ve arkadaşlarının yapmış

oldukları çalışmalarında insan lösemi hücre serilerinde JAK/STAT3 yolağını inhibe etmek için kullanmış oldukları AG490 ile TRAIL'in birlikte ve ayrı ayrı kullanımlarının apoptoz üzerine olan etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında TRAIL'in AG490 ile birlikte kombinasyonunun TRAIL'in tek başına kullanımına oranla anlamlı derecede apoptotik etkisini arttırdığını saptamışlardır. Ancak bizim çalışmamızda TRAIL dirençli olan LNCaP hücrelerinde JAK/STAT3 yolağını inhibe etmek için kullanmış olduğumuz AG490 ve S3I-201'in tek başlarına ve TRAIL ile kombine edildiğinde TRAIL'in apoptotik etkisini arttığına dair istatistiksel olarak önemli bir artış saptanamamıştır.

AG490 ve S3I-201 uygulanmış LNCaP hücrelerinde kaspaz 8 ve kaspaz 9 ifadenme düzeylerinde artış saptanmıştır. S3I-201+IL6+TRAIL kombinasyonu uygulanmış hücrelerde kaspaz 8 ifadenme düzeyinde düşme saptanmıştır. AG490 ile muamele edilmiş hücrelerde TRAIL aracılı apoptotik yolakta fonksiyon gören kaspaz 8 ve kaspaz 9 ifadenme düzeyinde artış görülmüştür. TRAIL ile kombine edildiğinde tek başına AG490 ile muamele edilen hücrelere nazaran anlamlı bir artış olmaması bize TRAIL direnç gelişiminde TRAIL reseptörlerinin ifadenme düzeylerinde azalmanın olabileceğini düşündürmektedir. S3I-201 ve TRAIL kombine edilen hücrelerde ise kaspaz 8 ifadenme düzeyinin azalması LNCaP hücrelerinde TRAIL direncini arttırmaktadır. Benzer sonuçları aktif kaspaz 3 düzeyinde de gözlemlendi. AG490 ve S3I-201'in tek başlarına uygulandıklarında kontrole nazaran ilk 9 saat içerisinde aktif kaspaz 3 düzeyini 2 kat arttırdıkları saptandı. TRAIL ile kombinasyonları tek başlarına kombinasyonları ile karşılaştırıldığında önemli derecede bir artış saptanamadı. Bu sonuç bize TRAIL'in AG490 veya S3I-201 ile kombinasyonu sonucunda JAK/STAT3 yolağının inhibitörlerinin LNCaP hücrelerinde TRAIL aktivitesi üzerinde hiçbir etkileri olmadığını göstermektedir.

STAT3 aktivasyonu tümör hücrelerinin anjiyojenik potansiyelini arttırmasının yanında Bcl-x ve MCL1 gibi anti-apoptotik genlerin aktivasyonunu sağlayarak tümorogenezde rol oynamaktadır^{69,92}. Ayrıca MCL1'in aşırı ifadelenmesi birçok insan kanserinde kemoterapiye direnç gelişimi ile ilişkilidir⁵². Zhang ve arkadaşlarının çalışmalarında, insan prostat kanser hücrelerinde, MCL1'in aşırı ifadelenmesinin özellikle CaP'da kemik metastazı ile korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca pSTAT3 aracılığıyla uyarılan MCL1'in tümör hücrelerinde apoptozu engellediği gösterilmiştir. Epling-Burnette ve arkadaşlarının çalışmalarında olduğu gibi, çalışmamızda AG490 aracılığıyla STAT3 inaktivasyonu sonucunda MCL1 ifadelenmesinde istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma olduğu tespit edildi⁶⁹. Bu sonuç bize kullanılan inhibitörlerin MCL1 ifadelenme düzeyini azaltarak LNCaP hücrelerin başlıca içsel apoptotik yolağı kullandığını düşündürmektedir.

Elde ettiğimiz bulgular JAK/STAT3 yolağının anjiyojenezisteki rolünü birincil olarak izleyen anjiyojenik faktörün VEGFA olduğunu ve aktivasyonunu VEGFR2 üzerinden gerçekleştirmediğini göstermiştir. LNCaP hücrelerinin kullandığımız JAK2 inhibitörü olan AG490 ve STAT3 inhibitörü olan S3I-201 ile muamelesi sonucunda apoptoz oranlarının anlamlı şekilde artması, anti-apoptotik genlerde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı azalış, bize bu inhibitörlerin CaP'in tedavisinde anti-anjiyojenik hedefli olarak klinikte kullanılmasında konvansiyonel tedavilerle kombine kullanılacak potansiyeli olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇ

Çalışmamızda prostat kanser hücre hatlarında JAK/STAT3 yolağı aracılığıyla aktive olan anjiyojenik faktörler VEGFA, VEGFC, VEGFR2, MMP2 ve anti-apoptotik faktör olan MCL1 genlerinin ifadenme düzeylerini araştırdık. Ayrıca, bu genler aracılığıyla inaktive olan genlerin TRAIL aracılı apoptotik yollar üzerine etkilerinin CaP'in gelişiminde, metastazında ve anjiyojenezindeki rollerini araştırdık.

LNCaP hücre hatlarında JAK inhibitörü AG490 ve STAT3 inhibitörü S3I-201'in apoptozu artırdığı belirlendi. İnhibitör uygulamasından sonra anjiyojenik, anti ve pro-apoptotik genlerin mRNA seviyesindeki değişiklikler belirlenerek, anjiyojenik ve anti-apoptotik genlerin mRNA seviyelerinin azaldığı belirlendi ($p>0,05$). Buna karşı pro-apoptotik genlerin düzenlenmesinin arttığı belirlendi ($p<0,05$).

Sonuç olarak, JAK/STAT3 yolağının CaP'deki ve anjiyojenezdeki rolünün belirlenmesi ve JAK/STAT3 yolağı inhibitörleri AG490 ve S3I-201'in prostat kanser hücre hattındaki etkilerinin belirlenmesinin, CaP'in tedavi yöntemlerine ışık tutacağı gibi, bu kanserin sebebiyet verdiği metastazın moleküler yollarını belirleyerek daha hızlı ve etkin tedavinin gerçekleşmesini sağlayabilecektir. Ayrıca elde ettiğimiz bulgular, JAK/STAT3 yolağının inhibisyonunda kullanılan AG490 ve S3I-201'in *in vivo* ve *in vitro* moleküler destekli çalışmalarla, kullanım şekli, dozu ve kısıtlamalarının belirlenmesinin ardından, özellikle diğer kemoterapötik ajanlarla düşük dozlu birlikteliklerinde daha etkili olarak, CaP tedavilerinde apoptozu uyaran çok yönlü moleküler hedefe sahip bir terapötik ajan potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

7. ÖZET

Prostat Hücre Hattında JAK/STAT3 Yolağının Anjiyogenezdeki Rolü

Prostat kanseri, erkeklerde en sık görülen genitoüriner kanserler içerisinde ilk sırada yer almaktadır ve anjiyogenez hastalığının ilerlemesinde rol oynamaktadır. Anjiyogenez, çok sayıdaki sinyal iletim yolları tarafından düzenlenen kompleks çok aşamalı bir süreçtir. STAT3, kritik çoklu fonksiyonu olan bir aracıdır. VEGF, MCL1 ve MMP' ler gibi bazı anjiyogenik faktörleri düzenleyen genlerin ifadenmelerini uyarır.

Bu araştırmada, JAK/STAT3 aracılığıyla aktive olan VEGFA, VEGFC, VEGFR2, MMP2 ve antiapoptotik faktör, MCL1'in ifadenme düzeylerini ve JAK/STAT3 yolağı aracılığıyla inaktive olan genlerin etkilerinin prostat kanserinin gelişiminde, metastazında ve anjiyogenezindeki rollerini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda, LNCaP insan prostat hücre hatlarında çeşitli doz ve inkübasyon sürelerinde AG490, S3I-201 ve TRAIL' in sitotoksik ve apoptotik etkileri morfolojik, DNA, RNA (mRNA) ve protein düzeylerinde araştırıldı.

Çalışmamızda, JAK/STAT3 yolağının, inhibisyonunun, kaspaz 3 kaskadını aktive ettiğini, bu yolla LNCaP hücrelerini apoptoza yönlendirdiğini ve JAK2 inhibitör AG490 veya STAT3 inhibitör S3I-201'in TRAIL ile birlikte kullanımının bu etkiyi artırmadığını gösteren ilk çalışmadır. Sonuç olarak çalışmamız, JAK/STAT3 yolağı hedefli kanser tedavisinde, AG490 ve S3I-201'in sitotoksitesi yüksek kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanılmasının, uygun apoptotik etkiye düşük doz ve sürede ulaştırabilmesine bağlı olarak, klinik açıdan yararlı olabileceğine

dikkat çekmektedir. Ayrıca, JAK/STAT3 yolağının moleküler etkilerinin tam olarak belirlenmesi prostat kanserinin tedavisi için yeni moleküler hedeflerin tanımlanmasına olanak sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Prostat Kanseri, JAK/STAT Yolağı, Anjiyogenezis

8. SUMMARY

A role of JAK/STAT3 Pathway on Angiogenesis in Prostate Cell Line

Prostate cancer constitutes the first most common type of cancer among men with genitourinary cancers and angiogenesis plays a role in disease progression. Angiogenesis is a complex multistage process regulated by a number of signal transduction pathways. STAT3 is a critical multifunctional mediator and induces expression of genes that regulate some angiogenic factors such as, VEGF, MCL1 and MMPs.

In the present research, it is aimed at analysis in prostate cell line, the expression levels of VEGFA, VEGFC, VEGFR2, MMP2 and antiapoptotic factor, the MCL1, which the activated factors through JAK/STAT3 pathway and effects of these genes on inactivation in the development, metastasis and angiogenesis of prostate cancer.

In our study, we explored on the LNCaP human prostate cancer cell line, the cytotoxic and apoptotic effects of AG490, S3I-201 and TRAIL on morphological, DNA, RNA (mRNA) and protein levels and for various doses and incubation time

This is the first study showing that JAK/STAT3 pathway of inhibition, activates the caspase 3 cascade and stimulates apoptosis of the LNCAP cells. It further shows that use of JAK2 inhibitor AG490 or STAT3 inhibitor S3I-201 and TRAIL combination not increase this effect. In conclusion, our study draws attention to the possible clinical effectiveness of use of AG490 or S3I-201 together with chemotherapeutic agents with high cytotoxicity due to the opportunity to attain suitable apoptotic effect with reduced dose and time in cancer treatment targeting JAK/STAT3

pathway. Also, determination of the exact molecular effects of JAK/STAT3 pathway would allow us to identify new molecular targets for the treatment of the prostate cancer

Keywords; Prostate Cancer, JAK/STAT Pathway, Angiogenesis

9. KAYNAKLAR

1. National Cancer Institute, what is cancer [online]. Aralık 2010 Elektronik adresi URL: http://www.cancer.gov/cancer_topics/cancer_library/what-is-cancer.
2. De Marzo AM, DeWeese TL, Platz EA, Meeker AK, Nakayama M, Epstein JI, Isaacs WB, Nelson WG. Pathological and molecular mechanisms of prostate carcinogenesis: implications for diagnosis, detection, prevention, and treatment. J Cell Biochem.2004 15;91(3):459-77
3. Rentsch CA, Cecchini MG, Thalmann GN. Loss of inhibition over master pathways of bone mass regulation results in osteosclerotic bone metastases in prostate cancer. Swiss Med Wkly. 2009 18;139(15-16):220-5
4. Hsing AW, Tsao L, Devesa SS. International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. Int J Cancer. 2000 1;85(1):60-7.
5. Wingo PA, Tong T, Bolden S. Cancer statistics, 1995. CA Cancer J Clin. 1995 Jan-Feb;45(1):8-30. Erratum in: CA Cancer J Clin 1995 45(2):127-8.
6. Sağlık Bakanlığı Kanserele Savaş Dairesi Başkanlığı 2005 yılı Türkiye kanser istatistikleri [online]. Ocak 2006. Elektronik adresi URL: <http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-7179/eski2yeni.html>.

7. S Koochekpour. Genetic and Epigenetic Changes in Human Prostate Cancer. Department of Urology and Stanley S. Scott Cancer Center, School of Medicine, Louisiana State University, Health Sciences Center, New Orleans, USA. Iran Red Crescent Med J 2011; 13(2):80-98
8. Domińska K, Piastowska AW, Rebas E, Lachowicz-Ochedalska A. The influence of peptides from the angiotensin family on tyrosine kinase activity and cell viability in a human hormone-dependent prostate cancer line. Endokrynol Pol. 2009;60(5):363-9.
9. LNCaP cell line. [internette]. [05.05.2011 tarihinde okundu]. Elektronik adres URL: <http://lncap.com/>
10. Hermann RM, Schwarten D, Fister S, Grundker C, Rave-Frank M, Nitsche M, Hille A, Thelen P, Schmidberger H, Christiansen H. No supra-additive effects of goserelin and radiotherapy on clonogenic survival of prostate carcinoma cells in vitro. Radiat Oncol. 2007 26;2:31
11. Foley R, Hollywood D, Lawler M. Molecular pathology of prostate cancer: the key to identifying new biomarkers of disease. Endocr Relat Cancer. 2004;11(3):477-88.
12. Divrik, T. Prostat kanseri için koruyucu ilaç yaklaşımları 'chemoprevention-ilaçlar'. 2005. Üroonkoloji bülteni. 2005, Sayı 1, 012-015
13. Türkeri, L. Kronik prostatit, enflamasyon ve prostat kanseri. Üroloji bülteni Eylül 2007, Sayı 3, 011-015

14. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev.* 2010;24(18):1967-2000.
15. Amanatullah DF, Reutens AT, Zafonte BT, Fu M, Mani S, Pestell RG. Cell-cycle dysregulation and the molecular mechanisms of prostate cancer. *Front Biosci.* 2000;5:D372-90.
16. Shand RL, Gelmann EP. Molecular biology of prostate-cancer pathogenesis. *Curr Opin Urol.* 2006;16(3):123-31.
17. Tam L, McGlynn LM, Traynor P, Mukherjee R, Bartlett JM, Edwards J. Expression levels of the JAK/STAT pathway in the transition from hormone-sensitive to hormone-refractory prostate cancer. *Br J Cancer.* 2007;97(3):378-83.
18. Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.* 2000
19. Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2010 10(7):505-14.
20. Jacobs EJ, Hsing AW, Bain EB, Stevens VL, Wang Y, Chen J, Chanock SJ, Zheng SL, Xu J, Thun MJ, Calle EE, Rodriguez C. Polymorphisms in angiogenesis-related genes and prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(4):972-7.
21. Au P, Tam J, Duda DG, Lin PC, Munn LL, Fukumura D, Jain RK. Paradoxical effects of PDGF-BB overexpression in endothelial cells

on engineered blood vessels in vivo. *Am J Pathol.* 2009;175(1):294-302.

22. Hanrahan EO, Lin HY, Kim ES, Yan S, Du DZ, McKee KS, Tran HT, Lee JJ, Ryan AJ, Langmuir P, Johnson BE, Heymach JV. Distinct patterns of cytokine and angiogenic factor modulation and markers of benefit for vandetanib and/or chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(2):193-201.25.
23. Duda DG, Jain RK, Willett CG. Antiangiogenics: the potential role of integrating this novel treatment modality with chemoradiation for solid cancers. *J Clin Oncol.* 2007;25(26):4033-42.
24. Holaday JW, Berkowitz BA. Antiangiogenic drugs: insights into drug development from endostatin, avastin and thalidomide. *Mol Interv.* 2009;9(4):157-66.
25. Midgley R, Kerr D. Bevacizumab--current status and future directions. *Ann Oncol.* 2005;16(7):999-1004.
26. Medinger M, Mross K. Clinical trials with anti-angiogenic agents in hematological malignancies. *J Angiogenes Res.* 2010;2:10.
27. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003;374(Pt 1):1-20.
28. Schindler C, Plumlee C. Interferons and the JAK-STAT pathway. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(4):311-8.

29. Jatiani SS, Baker SJ, Silverman LR, Reddy EP. JAK/STAT Pathways in Cytokine Signaling and Myeloproliferative Disorders: Approaches for Targeted Therapies. *Genes Cancer*. 2010;1(10):979-993.
30. Fuke H, Shiraki K, Sugimoto K, Tanaka J, Beppu T, Yoneda K, Yamamoto N, Ito K, Masuya M, Takei Y. Jak inhibitor induces S phase cell-cycle arrest and augments TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;363(3):738-44.
31. Seo IA, Lee HK, Shin YK, Lee SH, Seo SY, Park JW, Park HT. Janus Kinase 2 Inhibitor AG490 Inhibits the STAT3 Signaling Pathway by Suppressing Protein Translation of gp130. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2009;13(2):131-8.
32. Chaix A, Lopez S, Voisset E, Gros L, Dubreuil P, De Sepulveda P. Mechanisms of STAT protein activation by oncogenic KIT mutants in neoplastic mast cells. *J Biol Chem*. 2011;286(8):5956-66.
33. Shea-Donohue T, Fasano A, Smith A, Zhao A. Enteric pathogens and gut function: Role of cytokines and STATs. *Gut Microbes*. 2010;1(5):316-324.
34. Flowers LO, Subramaniam PS, Johnson HM. A SOCS-1 peptide mimetic inhibits both constitutive and IL-6 induced activation of STAT3 in prostate cancer cells. *Oncogene*. 2005;24(12):2114-20.
35. Klampfer L. Signal transducers and activators of transcription (STATs): Novel targets of chemopreventive and chemotherapeutic drugs. *Curr Cancer Drug Targets*. 2006;6(2):107-21.

36. Lee J, Kang WK, Park JO, Park SH, Park YS, Lim HY, Kim J, Kong J, Choi MG, Sohn TS, Noh JH, Bae JM, Kim S, Lim do H, Kim KM, Park CK. Expression of activated signal transducer and activator of transcription 3 predicts poor clinical outcome in gastric adenocarcinoma. *APMIS*. 2009;117(8):598-606.
37. Zhang X, Yue P, Fletcher S, Zhao W, Gunning PT, Turkson J. A novel small-molecule disrupts Stat3 SH2 domain-phosphotyrosine interactions and Stat3-dependent tumor processes. *Biochem Pharmacol*. 2010;79(10):1398-409.
38. Sherry MM, Reeves A, Wu JK, Cochran BH. STAT3 is required for proliferation and maintenance of multipotency in glioblastoma stem cells. *Stem Cells*. 2009;27(10):2383-92.
39. Siddiquee K, Zhang S, Guida WC, Blaskovich MA, Greedy B, Lawrence HR, Yip ML, Jove R, McLaughlin MM, Lawrence NJ, Sefti SM, Turkson J. Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(18):7391-6.
40. Rakesh K, Agrawal DK. Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors. *Biochem Pharmacol*. 2005;70(5):649-57.
41. Pawson T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer*. 2002;38 Suppl 5:S3-10.
42. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 2001 17;411(6835):355-65.

43. Brakensiek K, Länger F, Schlegelberger B, Kreipe H, Lehmann U. Hypermethylation of the suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1) in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 2005;130(2):209-17.
44. Lou W, Ni Z, Dyer K, Tweardy DJ, Gao AC. Interleukin-6 induces prostate cancer cell growth accompanied by activation of stat3 signaling pathway . *Prostate.* 2000;42(3):239-42.
45. Johan MF, Bowen DT, Frew ME, Goodeve AC, Reilly JT. Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A, SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2005;129(1):60-5.
46. Brantley EC, Benveniste EN. Signal transducer and activator of transcription-3: a molecular hub for signaling pathways in gliomas. *Mol Cancer Res.* 2008;6(5):675-84.
47. Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(11):900-11.
48. Neuwirt H, Pühr M, Santer FR, Susani M, Doppler W, Marcias G, Rauch V, Brugger M, Hobisch A, Kenner L, Culig Z. Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 is expressed in human prostate cancer and exerts growth-inhibitory function through down-regulation of cyclins and cyclin-dependent kinases. *Am J Pathol.* 2009;174 (5) :1921-30
49. Aragon-Ching JB, Dahut WL. VEGF inhibitors and prostate cancer therapy. *Curr Mol Pharmacol.* 2009;2(2):161-8.

50. Chen SH, Murphy DA, Lassoued W, Thurston G, Feldman MD, Lee WM. Activated STAT3 is a mediator and biomarker of VEGF endothelial activation. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(12):1994-2003.
51. Zhang Q, Guo R, Lu Y, Zhao L, Zhou Q, Schwarz EM, Huang J, Chen D, Jin ZG, Boyce BF, Xing L. VEGF-C, a lymphatic growth factor, is a RANKL target gene in osteoclasts that enhances osteoclastic bone resorption through an autocrine mechanism. *J Biol Chem.* 2008;283(19):13491-9
52. Zhang S, Zhau HE, Osunkoya AO, Iqbal S, Yang X, Fan S, Chen Z, Wang R, Marshall FF, Chung LW, Wu D. Vascular endothelial growth factor regulates myeloid cell leukemia-1 expression through neuropilin-1-dependent activation of c-MET signaling in human prostate cancer cells. *Mol Cancer.* 2010;9:9.
53. Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D, Heller R, Ellis LM, Karras J, Bromberg J, Pardoll D, Jove R, Yu H. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene.* 2002;21(13):2000-8
54. Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Sayama K, Hanakawa Y, Detmar M, Hashimoto K. Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for vascular endothelial growth factor-induced human dermal microvascular endothelial cell migration and tube formation. *J Biol Chem.* 2003;278(41):40026-31.
55. Cantarella G, Risuglia N, Dell'eva R, Lempereur L, Albini A, Pennisi G, Scoto GM, Noonan DN, Bernardini R. TRAIL inhibits angiogenesis

stimulated by VEGF expression in human glioblastoma cells. *Br J Cancer*. 2006;94(10):1428-35.

56. Aoki Y, Feldman GM, Tosato G. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood*. 2003;101(4):1535-42.
57. Bhattacharya S, Ray RM, Johnson LR. STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells. *Biochem J*. 2005;392(Pt 2):335-44.
58. Yuan G, Qian L, Shi M, Lu F, Li D, Hu M, Yu M, Shen B, Guo N. HER2-dependent MMP-7 expression is mediated by activated STAT3. *Cell Signal*. 2008;20(7):1284-91.
59. Trudel D, Fradet Y, Meyer F, Harel F, Têtu B. Significance of MMP-2 expression in prostate cancer: an immunohistochemical study. *Cancer Res*. 2003;63(23):8511-5.
60. Huang W, Yu LF, Zhong J, Wu W, Zhu JY, Jiang FX, Wu YL. Stat3 is involved in angiotensin II-induced expression of MMP2 in gastric cancer cells. *Dig Dis Sci*. 2009;54(10):2056-62.
61. Liu H, Chen A, Guo F, Yuan L. A short-hairpin RNA targeting osteopontin downregulates MMP-2 and MMP-9 expressions in prostate cancer PC-3 cells. *Cancer Lett*. 2010;295(1):27-37.
62. Ross JS, Kaur P, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RA Jr, Kallakury BV. Prognostic significance of matrix metalloproteinase 2 and tissue

inhibitor of metalloproteinase 2 expression in prostate cancer. *Mol Pathol.* 2003;16(3):198-205.

63. Tomatır, A. (2003). Apoptoz; programlı hücre ölümü. *T. Klin. J. Med. Sci* 2003: 499-508.
64. Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *FASEB J.* 2009;23(6):1625-37.
65. Gloire G, Charlier E, Piette J. Regulation of CD95/APO-1/Fas-induced apoptosis by protein phosphatases. *Biochem Pharmacol.* 2008;76(11):1451-8.
66. Mahmood Z, Shukla Y. Death receptors: targets for cancer therapy. *Exp Cell Res.* 2010;316(6):887-99.
67. Son JK, Varadarajan S, Bratton SB. TRAIL-activated stress kinases suppress apoptosis through transcriptional upregulation of MCL-1. *Cell Death Differ.* 2010;17(8):1288-301.
68. Tanai M, Grambihler A, Higuchi H, Werneburg N, Bronk SF, Farrugia DJ, Kaufmann SH, Gores GJ. Mcl-1 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in human cholangiocarcinoma cells. *Cancer Res.* 2004;64(10):3517-24.
69. Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, Turkson J, Oshiro M, Kothapalli R, Li Y, Wang JM, Yang-Yen HF, Karras J, Jove R, Loughran TP Jr. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest.* 2001;107(3):351-62.

70. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002 30(9):e36.
71. Huang C, Yang G, Jiang T, Huang K, Cao J, Qiu Z. Effects of IL-6 and AG490 on regulation of Stat3 signaling pathway and invasion of human pancreatic cancer cells in vitro. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010 19;29:51.
72. Chau MN, Banerjee PP. Development of a STAT3 reporter prostate cancer cell line for high throughput screening of STAT3 activators and inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;377(2):627-31.
73. Abdulghani J, Gu L, Dagvadorj A, Lutz J, Leiby B, Bonuccelli G, Lisanti MP, Zellweger T, Alanen K, Mirtti T, Visakorpi T, Bubendorf L, Nevalainen MT. Stat3 promotes metastatic progression of prostate cancer. *Am J Pathol.* 2008;172(6):1717-28.
74. Pang M, Ma L, Gong R, Tolbert E, Mao H, Ponnusamy M, Chin YE, Yan H, Dworkin LD, Zhuang S. A novel STAT3 inhibitor, S3I-201, attenuates renal interstitial fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 2010;78(3):257-68.
75. Sun M, Liu C, Nadiminty N, Lou W, Zhu Y, Yang J, Evans CP, Zhou Q, Gao AC. Inhibition of Stat3 activation by sanguinarine suppresses prostate cancer cell growth and invasion. *Prostate.* 2011 2. doi: 10.1002/pros.21409.

76. Santer FR, Malinowska K, Culig Z, Cavarretta IT. Interleukin-6 trans-signalling differentially regulates proliferation, migration, adhesion and maspin expression in human prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(1):241-53.
77. Watanabe S, Mu W, Kahn A, Jing N, Li JH, Lan HY, Nakagawa T, Ohashi R, Johnson RJ. Role of JAK/STAT pathway in IL-6-induced activation of vascular smooth muscle cells. *Am J Nephrol*. 2004;24(4):387-92.
78. Kim O, Jiang T, Xie Y, Guo Z, Chen H, Qiu Y. Synergism of cytoplasmic kinases in IL6-induced ligand-independent activation of androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene*. 2004 23(10):1838-44.
79. Bellezza I, Neuwirt H, Nemes C, Cavarretta IT, Puhr M, Steiner H, Minelli A, Bartsch G, Offner F, Hobisch A, Doppler W, Culig Z. Suppressor of cytokine signaling-3 antagonizes cAMP effects on proliferation and apoptosis and is expressed in human prostate cancer. *Am J Pathol*. 2006;169(6):2199-208.
80. Lachenmayer A, Alsinet C, Chang CY, Llovet JM. Molecular approaches to treatment of hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis*. 2010;42 Suppl 3:S264-72
81. Ara T, Declerck YA. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur J Cancer*. 2010;46(7):1223-31.
82. Grunstein J, Roberts WG, Mathieu-Costello O, Hanahan D, Johnson RS. Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor

is a critical factor in tumor expansion and vascular function. *Cancer Res.* 1999;59(7):1592-8.

83. Li J, Wang E, Rinaldo F, Datta K. Upregulation of VEGF-C by androgen depletion: the involvement of IGF-IR-FOXO pathway. *Oncogene.* 2005;24(35):5510-20.
84. Badache A, Hynes NE. Interleukin 6 inhibits proliferation and, in cooperation with an epidermal growth factor receptor autocrine loop, increases migration of T47D breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001 61(1):383-91.
85. Kang J, Bu J, Hao Y, Chen F. Subtoxic concentration of doxorubicin enhances TRAIL-induced apoptosis in human prostate cancer cell line LNCaP. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2005;8(3):274-9.
86. Nesterov A, Lu X, Johnson M, Miller GJ, Ivashchenko Y, Kraft AS. Elevated AKT activity protects the prostate cancer cell line LNCaP from TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2001;276(14):10767-74.
87. Zhang H, Zhang D, Luan X, Xie G, Pan X. Inhibition of the signal transducers and activators of transcription (STAT) 3 signalling pathway by AG490 in laryngeal carcinoma cells. *J Int Med Res.* 2010 38(5):1673-81.
88. Horndasch M, Culig Z. SOCS-3 antagonizes pro-apoptotic effects of TRAIL and resveratrol in prostate cancer cells. *Prostate.* 2011;9. doi: 10.1002/pros.21353.

89. Jee SH, Chiu HC, Tsai TF, Tsai WL, Liao YH, Chu CY, Kuo ML. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal pathway is involved in interleukin-6-mediated Mcl-1 upregulation and anti-apoptosis activity in basal cell carcinoma cells. *J Invest Dermatol.* 2002;119(5):1121-7.
90. Steiner H, Berger AP, Godoy-Tundidor S, Bjartell A, Lilja H, Bartsch G, Hobisch A, Culig Z. An autocrine loop for vascular endothelial growth factor is established in prostate cancer cells generated after prolonged treatment with interleukin 6. *Eur J Cancer.* 2004;40(7):1066-72.
91. Lanuti P, Bertagnolo V, Pierdomenico L, Bascelli A, Santavenere E, Alinari L, Capitani S, Miscia S, Marchisio M. Enhancement of TRAIL cytotoxicity by AG-490 in human ALL cells is characterized by downregulation of cIAP-1 and cIAP-2 through inhibition of Jak2/Stat3. *Cell Res.* 2009;19(9):1079-89.
92. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernández-Luna JL, Nuñez G, Dalton WS, Jove R. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity.* 1999;10(1):105-15.

10. EKLER

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında, bilgi ve önerileri ile yardımlarını esirgemeyen, bilim yolunda ilerlemenin ilk tohumlarını atarken yolumuza ışık tutan, danışmanlığını aldığım süre boyunca özveri ve sevgiyle bize yaklaşan, sabırlı ve güleryüzlü hocam danışmanım Sayın Doç. Dr. Ece KONAÇ' a en içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Her insanın bir ideali, hayatında mutlaka olmak istediği bir yer vardır. Ben her zaman bilim adına görev yapan, emek veren bilim insanlarının yer aldığı zincirde bir halka olmak istedim. Bu amacıma ulaşmamı sağlayacak şansı bana sunan, her zaman desteğini ve sevgisini hissettiğim değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Ceyhan' a bütün içtenliğimle sonsuz teşekkür ediyorum. Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerinden büyük fayda gördüğüm hocalarım Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Sevda MENEVŞE' ye, Sayın hocam Prof. Dr. Adnan MENEVŞE' ye ve Sayın hocam Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ' ye minnettar olduğumu söyler, eğitim hayatında da bir aile olunabileceğini bana gösterdikleri için çok teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimimde desteğini ve bilgisini her zaman hissettiğim, değerli arkadaşım Nuray VAROL'a ve çalışma arkadaşım A. Emre AYCAN'a sonsuz teşekkür ederim. Manevi olarak desteklerini ve sevgilerini benden esirgemeyen Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında görev alan bütün çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Ve en önemlisi benim bugünlere gelmemde en büyük emek sahibi olan benim için değerini kelimelerle ifade edemeyeceğim ailem; annem, babam, ablam, kardeşim ve biricik yeğenim Yusuf'um, hayatımda oldukları için, desteklerini ve sevgilerini esirgemedikleri için sonsuz teşekkür ederim.

11. ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: VENHAR GÜRBÜZ

DOĞUM YERİ ve TARİHİ: Ankara, 1982

TABİYETİ: T.C.

TELEFON: İş: 0-312-305-11-66

Ev: 0312-328-79-93

Cep: 0-544-818-71-06

e-POSTA: venhar@hacettepe.edu.tr

venhargurbuz@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

İlkokul: Ülviye Fenmen İlköğretim Okulu

1988-1996

Lise: Keçiören Laboratuvar Sağlık Meslek Lisesi

1996-2000

Önlisans: Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Laboratuvar Bölümü

2001-2003.

Lisans: Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi

Biyoloji Bölümü 2003-2006

ŞU ANDAKİ GÖREVİ:	Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi Moleküler Analiz Araştırma Laboratuvarında Biyolog Olarak Çalışmaktayım.
DERECELER:	Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü 2005-2006 Öğretim Yılında Sınıf 3. sū Olarak Tamamladım
KATILDIĞI KURSLAR	1. Aplıed maths DNA dendogram, Belçika. 2. TÜBA I. Kök hücre kursu ve sempozyumu, 24-25 Haziran 2010
KONGRELER	1. Gurbuz V. , A. Yılmaz, O. Gokce ve E. Konac, "Apoptotic effects of cisplatin on human colon cancer cell line (HT29)", <i>9th International Meeting of the International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX)</i>, Istanbul, Turkey, September 04-08, 2010. 2. Gokce O., A. Yılmaz, V. Gurbuz, E. Konac ve A. Ekmekci, "Vinorelbine's effects on the cell cycle progression in HeLa Cell Line", <i>9th International Meeting of the International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX)</i>, Istanbul, Turkey, September 04-08, 2010.
YAYINLAR	1. Gürbüz V., A. Yılmaz, Gökçe Ö. ve E. Konaç, "İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattında (HT29) Sisplatin'in Apoptotik Etkisi", <i>Marmara Medical Journal</i>, Basımda, (2011). 2. Gökçe Ö., A. Yılmaz, V. Gürbüz, E. Konaç ve A. Ekmekçi, "İnsan Servikal Kanseri HeLa Hücrelerinde Vinorelbin'in Apoptotik Etkisi", <i>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi</i>, 25 (1), 1-10 (2011).